

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie appliquée

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne et Bioprocédés.

N° d'ordre :98/D3C/2022

N° de série :02/BA/2022

Intitulé :

Recherche et isolement de bactéries du genre *Bacillus* de différents écosystèmes particuliers algériens : étude de potentialités probiotiques et enzymatiques

Présentée par : Baraa REHAMNIA

Le 17/12/2022

Devant le jury :

Président :	KHEDARA Abdelkarim	MCA	Université Frères Mentouri, Constantine 1.
Directeur de thèse :	KACEM CHAOUICHE Noredidine	Professeur	Université Frères Mentouri, Constantine 1.
Co-directeur de thèse :	LEE Natuschka	Professeur	Umea University, Sweden.
Examineur 1 :	MIHOUBI Ilhem	Professeur	Université Frères Mentouri, Constantine 1.
Examineur 2 :	AITKAKI Asma	MCA	Université de Boumerdes.

Année universitaire 2022- 2023

DEDICACE

Je veux poser ces mots

Pour Dieu porteur de force et de lumière,

Détenteur du savoir et du mystère

Pour Dieu à qui un merci éternel

Je veux poser ces mots

Aux Piliers de ma vie, mes chers parents,

À toi, ma douce mère, ma porte d'espoir ;

À toi mon père, porteur de raison et ombre de mes décisions ;

À la Force de mon esprit mon frère Monder qui croyait toujours en moi

À mon petit frère Adb El-Raouf ;

À la Lumière et au bonheur de mes jours, Aboura ;

À tous les membres de ma famille

*Joie de vie, sourire des fleurs et parfum des temps durs à vous mes
amis en particulier, Mounia, un don du ciel*

*Leila, Sabrina, Soumia et Amel, une relation d'amitié aussi douce que le
miel*

À Redouane, Oumeima, Hanene,

*À mes entraîneurs Tonton Mourad, Mr Chaouki, Hadjer, Amir et Hamid,
qui sans eux ce travail ne sera jamais réalisé*

*Aux membres du club de spéléologie et sport de montagne de Bejaia et de
Constantine pour les moments qu'on a partagé ensemble ;*

À vous tous,

Je pose ces mots

Pour vous dédier ce modeste travail.

BARAA

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à remercier en premier lieu 'ALLAH' le bon Dieu, le Miséricordieux de nous avoir donné la force, la volonté, et la patience d'achever cette modeste thèse.

*Je remercie monsieur **KACEM CHAOUCHEN**, pour avoir accepté de diriger et assuré la direction scientifique de ce travail,*

*Je remercie madame **Natuschka Lee** de l'université d'Umea (Suède) de son accueil dans son laboratoire et de son soutien,*

*Je remercie également madame **Anita Sellstedt** de l'université d'Umea, pour son soutien et aide durant mon séjour de stage et madame **Ramune Kuktaite** de l'université d'Alnarp pour la collaboration fructueuse.*

Nos remerciements sont également adressés aux membres de jury :

*Monsieur **KHEDARA** d'avoir acceptée de présider le jury et madame **MIHOUBI.I, AITKAKI.A** d'avoir acceptées d'examiner ce travail,*

Je remercie également le ministère d'enseignement supérieur de m'avoir garanti le séjour de mobilité avec Programme National Exceptionnel.

Un grand merci à toute l'équipe des clubs de sports de montagne de Bejaïa et de Constantine de nous avoir aidé à la réalisation de cette recherche, très sincères remerciements,

Je remercie très chers parents, frères et sœur qui ont toujours été là pour moi,

Mes remerciements les plus sincères à tous mes amis pour leurs encouragements et pour l'ambiance agréable tout au long de cette période.

TABLE DE MATIERE

INTRODUCTION	1
--------------------	---

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Spéléologie Algérienne et microbiologie	4
1.1.1. Potentiel spéléologique du continent Africain et de l'Algérie	4
1.1.2. Historique des explorations des grotte en Algérie	5
1.1.3. Géologie de l'Algérie	6
1.1.4. Microbiologie des grottes	7
1.2. Probiotique	8
1.2.1. Généralité sur les probiotiques	8
1.2.2. Effet bénéfiques suggérés des probiotiques	9
1.2.2.1. Rémission des maladies inflammatoires de l'intestin	10
1.2.2.2. Diarrhée	11
1.2.2.3. Constipation	11
1.2.2.4. Prévention et rémission du syndrome de l'intestin irritable (IBS)	11
1.2.2.5. Prévention de la colonisation et de la croissance des microorganismes pathogènes	11
1.2.2.6. Modulation du système immunitaire	12
1.2.2.7. Intolérances alimentaire	12
Intolérances au lactose	12
Intolérances au gluten	13
1.2.3. Critères de sélection des souches probiotiques	14
1.2.3.1. Critères de sécurité	14
Identification de la souche	14
Innocuité	14
1.2.3.2. Critères technologiques	15
1.2.3.3. Critères fonctionnels	15
1.2.4. Mécanisme d'action des probiotiques	15
1.2.4.1. Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhésion	19
1.2.4.2. Production de substances antimicrobienne	19
1.2.4.3. Simulation des mécanismes de défense immunitaire	20
1.2.4.4. Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments	20
1.2.5. Effets secondaires associés à la consommation des probiotiques	21

1.2.5.1. Infections	22
1.2.5.2. Effet métabolique	22
1.2.5.2. Transfert de gènes	22
1.2.6. Sol comme source non-conventionnelle des probiotiques	23
1.2.7. Bactéries du genre <i>Bacillus</i> comme probiotiques	25

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Collection des échantillons	30
2.2. Etude des paramètres physico chimiques des grottes	32
2.2.1. Mesure de la température et l'humidité de l'air des grottes.....	32
2.2.2. Etude pédologique des sédiments	33
2.2.2.1. Traitement et préparation de l'échantillon du sol	33
2.2.2.2. Mesure du pH.....	33
2.2.2.3. Conductivité électrique (CE)	33
2.2.2.4. Matière organique	33
2.2.2.4. Calcaire total	33
2.3. Isolement des bactéries sporulées.....	34
2.3.1. Traitement thermique.....	34
2.3.2. Isolement des microorganismes.....	34
2.3.3. Purification de souches bactériennes obtenues	34
2.4. Evaluation préliminaire de l'innocuité des isolats (SASS)	34
2.4.1. Recherche de l'activité hémolytique.....	34
2.4.2. Recherche de l'activité lécithinase	35
2.4.3. Sensibilité enzymatique	35
2.5. Sélection des isolats à potentialités enzymatiques	35
2.5.1. Mise en évidence de pouvoir de dégradation de gliadine	35
2.5.1.1. Extraction de la gliadine	35
2.5.1.2. Dégradation de la gliadine sur boîte	36
2.5.2. Mise en évidence de l'activité bêta-galactosidase	36
2.5.3. Dosage de l'activité enzymatique de bêta-galactosidase	36
2.5.4. Dégradation de gliadine en solution	37
2.5.5. Dégradation de gliadine sur gel	38
2.5.5. Mise en évidence de l'activité enzymatique de la protéase	39
2.6. Evaluation <i>in vitro</i> de quelques aptitudes probiotiques	39
2.6.1. Aptitude des isolats à survivre dans des conditions gastriques simulées.....	39

2.6.2. Aptitude des isolats à survivre dans des conditions intestinales simulées.....	40
2.6.3. Propriété de surface et adhérence cellulaire.....	40
2.6.3.1. Adhérence aux solvants	40
2.6.3.2. Détermination de l'Auto-agrégation chez les isolats sélectionnés	41
2.6.3.2. Détermination de la co-agrégation chez les isolats sélectionnés	41
2.7. Analyse statistique	41
2.8. Méthodes moléculaires	41
2.8.1. Hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	41
2.8.2. Identification moléculaire des isolats sélectionnés	42
2.8.2.1. Extraction de l'ADN	42
2.8.2.2. Amplification des gènes étudiés par PCR	43
2.8.2.3. Purification des produits PCR.....	43
2.8.2.4. Electrophorèse des acides nucléiques	45
2.8.2.5. Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences	45

RÉSULTATS

3.1. Etude des paramètres physico-chimiques des grottes	48
3.2. Isolement et purification des bactéries sporulées	48
3.3. Evaluation préliminaire de l'aspect sécuritaire des isolats.....	48
3.4. Sélection des isolats à potentiel enzymatiques.....	48
3.5. Dosage enzymatique de bêta-galactosidase	49
3.6. Dégradation de gliadine en solution.....	49
3.7. Dégradation de gliadine sur gel.....	49
3.8. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques in vitro	54
3.8.1. Sensibilité aux antibiotiques	54
3.8.2. Aptitude des isolats sélectionnés à survivre dans les conditions gastro-intestinales simulées	54
3.8.2. Propriétés de surface et adhésion cellulaire	55
3.8.2.1. Auto-agrégation et co-agrégation	55
3.8.2.1. Adhérence aux solvants	55
3.9. Identification des isolats sélectionnées	57
3.9.1. Identification de pureté des isolats sélectionnés et leur affiliation taxonomique <i>in situ</i> via l'hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	57
3.9.2. Caractères phénotypiques.....	57
3.9.3. Analyse phylogénétique	62

DISCUSSION	79
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	85
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86
ANNEXES	103
RESUMÉS	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Les grande unités géologiques d'Algérie. A : Limite méridionales des nappes telliennes. B : Flexures sud atlassique. C : Crétacé supérieur saharien. D : Meseta oranaise. E : Carbonifère de Bechar (d'après Bernard Collignon, 1991).	8
Figure 2 Présentation des effets bénéfiques des probiotiques (Saarela et al., 2000). MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, SCFA: short chain fatty acid	14
Figure 3 Diagramme d'aspects de sélection, in vitro, des souches microbiennes à propriétés probiotique (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization 2001).....	17
Figure 4 Synthèse des mécanismes d'action suggérés des probiotiques.....	19
Figure 5 Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques.	19
Figure 6 Mécanisme d'inhibition des pathogènes par production des substances antibactérienne.	21
Figure 7 Mécanismes de stimulation de défense immunitaire par production de : phosphate alcalin, lipopolysaccharides, défensines et lysozyme.	22
Figure 8 Compétition sur l'adhésion et les nutriments.....	22
Figure 9 Diagramme présentant les différentes sources d'isolement des probiotiques	25
Figure 10 Localisations géographique des lieux de prélèvements (Google maps)	31
Figure 11 Les trois zones d'une grotte (entrée, twilight, noir).....	31
Figure 12 Echantillonnage à partir de grottes (GharDbaa, Constantine)	32
Figure 13 Schéma des principales étapes de zymographie	39
Figure 14 Résumé des méthodes utilisées dans matériel et méthodes	46
Figure 15 Pourcentages des résultats de test de sélection de l'activité enzymatique.....	51
Figure 16 Résultats de l'activité hémolytique pour les isolats ; J1, J2, J3, J4, Y7, Y8 et Y9, développant des zones d'hémolyse ; A : α -hémolyse (coloration verdâtre, isolat Y9), B : β -hémolyse (zone transparente, isolat Y7) et C : γ -hémolyse (pas de réaction, isolat Y8). présentant les différentes sources d'isolement des probiotiques.....	51
Figure 17 Résultats de test lécithinase sur 9 isolats (F7, F10, F11, F12, D1, D2, D3, D4 et P.C); A: Coloration reste jaune: pas de réaction (lécithinase négatif) (les isolats F10), B: Coloration rose avec un halo autour de la colonie (lécithinase positif) (isolat D1), P.C: Control Positif : <i>B. cereus</i>	52
Figure 18 Exemples de test de sélection des isolats à activité gliadinase of gliadinase sur 7 isolats (BS14, D7, F10, J4, Y4, Y5, Y6). A : pas de dégradation de gliadine (isolat Y5), B : halo transparent autour des colonies (les isolats BS14, D7, J4 et F10) montre une dégradation de la gliadine	52
Figure 19 Résultats de test de sélection des isolats à activité bêta-galactosidase sur 23 isolats (J1, J2, J3, J4, Y3, Y4, Y6, A1, A2, A3, A4, A5, D1, D2, D3, B1, B2, B3, B4, B6, F10, F11 et F12) ; A : Pas de production de beta-galactosidase, B : Coloration des colonies en bleu : production de bêta-galactosidase (les isolats J4, D3 et F10).présentant les différentes sources d'isolement des probiotiques.....	52

Figure 20 Exemples de résultats positifs du dosage de bêta-galactosidase (les isolats J4, A9, BS14 et BS13). P.c: Control positif (<i>E. coli</i> (ATCC25922)). présentant les différentes sources d'isolement des probiotiques.....	53
Figure 21 Exemples des profils de SDS-PAGE de dégradation de gliadine des isolats F10 et J4. La gliadine présente la seule source d'azote dans le milieu. L'intensité des bandes entre ~ 30 to ~50 (repressentant α -, β -, et γ - gliadines) a diminué considérablement, d'autre part, une dégradation plutôt basse entre le poids moléculaire de ~50~100 (présentant les ω gliadines) a été noté. L'isolat (Y5) qui n'a pas montré une capacité à dégrader la gliadine sur boite a été utilisée entant que control négatif	53
Figure 22 Zymogramme de Gliadine pour les isolats (A8, A9, F9, F10, Dj16, Dj17, D3, BS13, BS14, BS16, J4, SSI5, T1 and Y5). Le gel contient la gliadine comme substrat. L'hydrolyse a été observé par la présence de bandes transparentes après coloration par Coomassie brillant. Les lignes vertical présentent des zones transparentes où des bandes transparentes individuelles sont absentes.....	54
Figure 23 Pourcentages d'auto-agrégation et de co-agrégation des isolats sélectionnées	60
Figure 24 Pourcentages d'adhésion au xylène et au chloroforme des isolats sélectionnés	61
Figure 25 Résultats de FISH	64
Figure 26 Arbre phylogénétique (non raciné) des souches bactériennes sélectionnées et les plus proches quinze souches (se basant sur 16S rRNA) de la base de données des microorganismes cultivables de LTP (version 132).....	77
Figure 27 de la base de données des micro-organismes non cultivable de SSU Silva et de REFNR version 138.1.	78

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Principales grandes grottes en Algérie	5
Tableau 2 Espèces du genre <i>Bacillus</i> utilisées comme probiotiques	27
Tableau 3 Principaux produits commerciaux contenant une ou plusieurs souches de <i>Bacillus</i> probiotique (d'après Cutting 2011).	28
Tableau 4 Régions, sites d'échantillonnage et caractéristiques des lieux de prélèvement des échantillons.....	32
Tableau 5 Réactifs utilisés pour la réaction PCR.....	44
Tableau 6 Programme d'amplification du gène ADNr 16S sur thermocycleur	44
Tableau 7 Résultats des paramètres physico-chimiques des sédiments de grottes	50
Tableau 8 Résultats d'antibiogramme des isolats sélectionnées.....	56
Tableau 9 <i>In vitro</i> acid tolerance and survival rates after exposure to simulated gastric juice for thirteen selected strains.....	58
Tableau 10 <i>In vitro</i> tolerance and survival rates after exposure to simulated intestinal fluid for thirteen selected strains	59

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : One-way analysis of variance

BATS: Bacterial adhesion to solvents

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

BSA : Bovine Sérum Albumine

CHISAM: Chloroform:Isoamyl alcohol

CTAB: Cetrimonium bromide

d'EDTA (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

DMSO : dimethyl sulfoxide

DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EFSA : European Food Safety Authority

FAO: Food and Agriculture Organization

GRAS : Generally Recognized As Safe

GRAS: Generally Recognized As Safe

HCl : acide chlorhydrique

IBS : syndrome de l'intestin irritable

ISO : Organisation Internationale de Normalisation

K_2HPO_4 : phosphate de potassium dibasique

KDa : Kilodalton

LB : Luria Bretani

M : Molaire

$MgCl_2$: Chlorure de Magnésium

MU: Unités de Miller

NCBI : National Center for Biotechnology Information

Nm :

OD: Optical density

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBP : Penicillin binding proteins

PBS : Phosphate Buffer salin

PBS: phosphate buffered saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel d'hydrogène

QSP : Qualified Presumption of Safety

Rpm : Rotation par minute

rpm : rotation par minute

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

Taq : de *Thermus aquaticus*

TCA : Tricholoaceticacid

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

UFC : Unités Formant Colonie

INTRODUCTION

Introduction

La microbiologie des grottes a gagné plus d'intérêt au sein de la communauté scientifique au cours de la dernière décennie. Les écosystèmes souterrains, considérés comme milieux extrêmes, sont un environnement sous-exploré, isolé de la surface, limité en éléments nutritifs et caractérisé par des températures constantes et un manque de lumière (Sugita et al. 2005; Bastian et al. 2010). Malgré les conditions extrêmement oligotrophe, les micro-organismes des systèmes souterrains sont remarquablement diversifiés et présentent des adaptations élevées aux restrictions environnementales (Schabereiter-Gurtner et al. 2004; Barton and Jurado 2007).

Les stratégies de survie microbienne dans un environnement oligotrophe (potentiels enzymatiques, compétition et production d'antibiotique pour prévenir l'exclusion des nutriments) peuvent augmenter les chances de produire des métabolites secondaires diversifiés et de nouveaux composés bioactifs pouvant être utiles pour les industries pharmaceutiques et alimentaires (Bhullar et al. 2012; Berendonk et al. 2015; Frère and Rigali 2016). Bien que les potentialités enzymatiques de microbiote des grottes ont été moins abordées, les études effectuées jusqu'à présent ont révélé une gamme d'activités enzymatiques diverses y compris des amylases (Enache, M., & Faghi 1999; Rautela et al. 2017), des lipases (Tomova et al. 2013; Rautela et al. 2017), des protéases, des cellulases (Tomova et al. 2013; Rautela et al. 2017), des uréases (Armstrong et al. 2016), des enzymes de catabolisme des carbohydrates (Tomova et al. 2013; Ahamada Rachid and Doğruöz Güngör 2022), des glycosidases et des phytases (Tomova et al. 2013). En outre, (De Mandal et al. 2017) a étudié les gènes microbiens codant pour les enzymes impliqués dans la dégradation d'amidon (alpha-amylase, glucoamylase, neopullulanase et pullulanase), de la cellulose (alpha-glucosidase, endoglucanase, beta-glucanase, beta-glucosidase), de d'hémicellulose (arabinofuranosidase, xylanase, et mannanase), de la chitine et pectine (chitinase, beta-hexosaminidase, alpha-mannosidase et bêta-mannosidase acetyl-glucosaminidase, polygalacturonase) et d'autres dégradations des carbohydrates. Comme il a été établi que les micro-organismes extrémophiles spécifiques à ces milieux produisent des enzymes fonctionnelles dans des conditions extrêmes (Van den Burg 2003).

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui développent des effets bénéfiques pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization 2001). Ces effets se révèlent sur le tractus gastro-intestinal par la prévention, entre autres, des maladies

Introduction

diarrhéiques (Allen et al. 2009; Liu et al. 2017; Agamennone et al. 2019) et l'inhibition des micro-organismes pathogènes dans cet endroit (Muñoz-Quezada et al. 2013; Schoster et al. 2016). Ils peuvent aussi se manifester par la modulation du système immunitaire (Pelto et al. 1998; Angelis et al. 2006), la prévention et rémission du syndrome du côlon irritable (Pinto-Sanchez et al. 2017; Oh et al. 2019), la rémission des maladies inflammatoires de l'intestin (Garcia Vilela et al. 2008; Fedorak et al. 2015; Ganji-Arjenaki and Rafieian-Kopaei 2018), la promotion de la digestion du lactose dans le cas de l'intolérance au lactose (Sharma and Singh 2014; Son et al. 2017) et l'amélioration des symptômes de l'intolérance au gluten (Angelis et al. 2006; Rizzello et al. 2007; Zamakhchari et al. 2011; Kunduhoglu and Hacıoglu 2021).

Les probiotiques utilités chez l'Homme sont généralement isolées à partir de produits laitiers ou des sources intestinales humaines. Cependant, l'utilisation de sources non conventionnelles (produits alimentaires fermentés non laitiers, sources non intestinales) commence à susciter plus d'intérêt (Sornplang and Piyadeatsoontorn 2016). Aussi, certaines études ont permis de sélectionner des probiotiques utiles provenant de sources alternatives telles que ; les fruits et légumes (Vitali et al. 2012; Amorim et al. 2018), les aliments fermentés (Son et al. 2017; Zommiti et al. 2018), le poisson et fruits de mer (Aarti et al. 2017) les déchets alimentaires (Ashayerizadeh et al. 2017; Lee et al. 2017) et le sol (Bhakta et al. 2010; Matei et al. 2016; Mohkam et al. 2016; Siraj et al. 2017; Singhal et al. 2019).

Il a été démontré que les souches bactériennes du genre *Bacillus* sont des candidates potentiels pour les applications probiotiques car ils avaient été associées à une longue histoire d'utilisation saine dans le processus de fermentation des aliments traditionnels (aliments africains fermentés et fermentation du soja dans les pays asiatiques) (Tamang et al. 2016) et dans la production d'enzymes alimentaires (Schallmeyer et al. 2004; Cutting 2011). En effet, les êtres humains sont intrinsèquement exposés aux spores des *Bacillus* (Tam et al. 2006; Fakhry et al. 2008; Hong et al. 2009). Ces bactéries s'avèrent jouer un rôle bénéfique sur le tractus gastro-intestinal tels que ; le soulagement du syndrome du côlon irritable (Chun et al. 2018; Maity et al. 2020), la réduction du taux de cholestérol (Majeed et al. 2019), l'activité antimicrobienne et immunomodulatrice (Urdaci et al. 2004; Ritter et al. 2018; Shinde et al. 2019). Comme elles ont montré une capacité protéolytique appréciable sur une large gamme de substrats telles que ; la caséine, le collagène, la fibrine (Horikoshi 1999), la gliadine (Alvarez-Sieiro et al. 2015; Wagh et al. 2018; Rashmi et al. 2020). En raison de la stabilité de leurs spores, les bactéries du genre *Bacillus* peuvent survivre aux traitements appliqués aux aliments comme le traitement thermique et la lyophilisation, aux conditions du tractus gastro-intestinal et à une longue période de stockage (durée de conservation) (Hyronimus et al. 2000; Fares et

Introduction

al. 2015). De ce fait, ces bactéries sont, désormais, considérées comme un choix idéal pour apporter une contribution majeure au marché mondial des probiotiques (Elshagabee et al. 2017). Malgré cette avancée remarquable, le marché des probiotiques demeure dominé, sur le plan commercial, par des bactéries appartenant aux genres ; *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, tandis les bactéries du genre *Bacillus* reçoivent toujours moins d'attention car, parmi plus de 100 espèces connues, seules quelques-unes à savoir ; *B. clausii*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus* et *B. pumilus* sont commercialisées comme probiotiques destinés à la consommation humaine (Nithya and Halami 2013).

L'Afrique du nord est caractérisée par une grande diversité, sur le plan, ressources géologiques et minérales (Bouabdellah and Slack 2016). L'Algérie abrite la pluparts des grottes hypogènes connues en Afrique du Nord, peuplées par une faune très diversifiée (V. Decu, C. Jubethies, B. Collignon, Liberton 2001). Parmi ces grottes, se trouvent les deux plus profondes d'Afrique ; Anou ifflis (-1170m) et Anou Boussouil (-805m), le plus grand réseau souterrain du continent ; la grotte de Ghar Boumâaza (18600m), et une des plus profondes grottes de gypse au monde ; Ghar Kef (2450m long et -212m de profondeur) (Herrmann and Bucksch 2014). En outre, l'Algérie est tectoniquement très active et abrite des grottes de sources chaudes ; la région de Biban (Herrmann and Bucksch 2014) et de nombreuses autres grottes intéressantes sont encore inexplorées.

Après cette recherche, il est intéressant de signaler que, hormis le travail de (Belyagoubi et al. 2018), aucune recherche en Algérie sur la microbiologie des grottes, en particulier le volet probiotique, n'a été abordée. Par conséquent, la présente thèse avait comme but d'isoler, d'identifier et de répertorier les espèces du genre *Bacillus* à partir de différentes grottes en Algérie et de rechercher leurs potentialités probiotiques.

Pour ce faire, plusieurs étapes ont été développées pour la réalisation et l'organisation de cette thèse en particulier:

Une étude bibliographique approfondie sur les éléments du sujet ;

Une partie consacrée à la méthodologie et son matériel où les éléments techniques ont été abordés notamment : l'exploration écologique des grottes, l'étude de leurs caractéristiques et l'accent a été mis sur l'étude de leurs potentialités probiotiques ; présentation des résultats et leur discussion en annonçant enfin les perspectives par l'ouverture des fenêtres de recherches futures décollant de la conclusion.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Revue bibliographique

1.1. Spéléologie Algérienne et microbiologie

Cette section est consacrée à la présentation du potentiel spéléologique de l'Algérie ainsi qu'à la microbiologie des grottes.

1.1.1. Potentiel spéléologique du continent Africain et de l'Algérie

Le continent Africain en général est pauvre en présence de karsts, à l'exception du nord de continent qui se caractérise par une présence massive de calcaire. En effet, l'Egypte enregistre la présence de quelques grottes dans sa partie Nord Est et l'absence de karstification est due à son climat sec (Mostafa, 2012). La Lybie avec une seule exception d'un remarquable karst de gypse (Klimchouk *et al.*, 1996). En Tunisie, les informations disponibles révèlent la présence de quelques massifs karstifiés inconnus. Par ailleurs, au nord-Ouest du continent et précisément au Maroc et en Algérie on observe un potentiel spéléologique très important. En effet, le Maroc renferme de profonds gouffres intéressants, tel que Kef Toghobeit dont la profondeur est estimée à, -722 m et considéré, en conséquent, comme le troisième profond gouffre en Afrique et un des plus intéressants systèmes horizontaux « Wit Tamdouin », avec 17.5 km (Courbon, P. Chabert 1986).

L'Algérie est le pays Africain le plus riche en matière de son patrimoine spéléologique, présent sur de nombreux petits massifs calcaires karstifiables, bien repartis de l'Est à l'Ouest (Collignon 1992). Le plus important et le plus spectaculaire est le massif du Djurdjura (Courbon, P. Chabert 1986) avec des crêtes alpestres (2321 m) qui contient les deux plus profonds gouffres en Afrique en l'occurrence; Anou Ifflis (le gouffre du léopard), -1170 m de profondeur et Anou Boussouil, -805 m de profondeur. L'Algérie contient un nombre intéressant de différents types de grottes ; 1- gouffres, tel que ; Anou Timedouine de -476 m, Anou Achra Lemoun de -323 m et Takouatz (un développement de 800m et une dénivelée $+65/-123$ m) (Courbon, P. Chabert 1986), 2- grottes hydrothermales : les plus spectaculaires sont les grottes de la haute chaîne des Babors avec la présence de sources hydrothermales sous terraines (Aïn Ouarka, Hassi Dermam, Aïdour) (Qoiffait and Quinif 1977), 3- rivières sous terraines : le plus long système sous terrain en Afrique est la Tafna sous terraine (Gharbou Maza), 18.6 km, 4- grotte archéologique (historique) comme la grotte préhistorique de Gueldaman (Gouraya, Bejaia)(Collignon 1992) et les Cave wall paintings de Tassili N'Ajjer (au sud d'Algérie) (Gunn 2004).

1.1.2. Historique des explorations des grotte en Algérie

En Algérie, les grottes ont été utilisées par l'Homme depuis longues dates comme refuges, bergerie, abris, sanctuaire, où on trouve la plupart des sites archéologiques. Cette utilisation traditionnelle dure jusqu'à nos jours par des habitats connus sous le nom troglodyte (Aurès, monts de Tlemcen) (Collignon, 1992)

La spéléologie algérienne a été développée, au début du siècle, avec le travail des scientifiques (Jeannel, Arambourg, Racovitza, Peyerhimhoff, etc.). Après cette période, la spéléologie sportive a commencé à partir de 1930 et elle a duré jusqu'à 1954. Cette action a permis à la spéléologie algérienne d'enregistrer en 1948 ses premiers record avec la découverte d'Anou Bousouil 505 m, second gouffre du monde, et en 1933 la découverte de la Tafna sous terraine (3.9 km), plus long réseau d'Afrique. La synthèse de ces années d'exploration a été réalisée par Jean Birebent (Collignon 1991). Pendant la guerre de libération (1954-1962) ; les grottes algériennes n'ont jamais été aussi fréquentées, servant de comme cachettes, refuges, arsenaux et même de petits hôpitaux. Aussi, toutes les explorations sportives ont été suspendues(Collignon 1992).

Après l'indépendance, les explorations reprennent timidement et ce n'est qu'à partir de 1973 que les prospections systématiques ont repris. Ces explorations ont été menées souvent par des géologues (Quinifs, Coiffait, Fabriol, Collignon, Delail, le couple Pablo, le couple Lips). Ils organisent les premières grosses expéditions qui résultent de nouvelles découvertes importantes comme ; Anou Bousouil -805 ; Tafna 17.6 km ; Anou Ifflis, 1150m)(Collignon 1992).

À partir de l'année 1980, une participation, de plus en plus active, des Algériens dans l'exploration de ces sites par la création des clubs de spéléologie, en particulier la création d'un club à Bejaia et l'autre à Boufarik(Collignon 1992). Le tableau 1 récapitule les plus importantes grottes d'Algérie.

En 1990, et pour raison sécuritaire, toute activité d'exploration a été suspendue. Ce n'est que vers l'année 2006 que les explorations ont été reprises par des clubs de spéléologie Algériens tel que« Club de spéléologie de Bejaia » (Collignon 1992).

Tableau 1 Principales grandes grottes en Algérie

Grottes	Région	Profondeur
Anoufflis	Djudjura	-1170m
AnouBoussouil	Djudjura	-805m
RharBoumaza	Tlemcen	18600m
Kef El Kaous	Traras	4160m
Rhar Kef (Gypsum cave)	DjbelNador	-211m

1.1.3. Géologie de l'Algérie

Sur le plan géomorphologique, l'Algérie se compose de deux grandes zones géographiques :

- Relief méditerranéen, constitué du front nord du pays ;
- Relief saharien, composant le sud du pays et couvre les 2/3 de la superficie totale et dont le point culminant est à 3800m (Hoggar). Entre les deux zones se trouvent les hauts plateaux (H. Askri, A. Belmecheri, B. Benrabah, A. Boudjema, K. Boumendjel, M. Daoudi *et al.*, 2000).

Le nord du pays abrite l'Atlas Tellien : (Tell : terre cultivable) présente 10% du pays. Le domaine alpin est une zone profondément touchée par l'orogénèse alpine. Une région qui a été écaillée, plissée, faillée, soulevée tout au long de cénozoïque et quaternaire. Fait partie de la microplaque d'Alboran, située entre les grandes plaques tectoniques d'Eurasie et d'Afrique. Le domaine alpin est accolé au domaine africain le long d'un accident décrochant d'âge eocène supérieur (accident sud atlassique) (Collignon 1992; H. Askri, A. Belmecheri, B. Benrabah, A. Boudjema, K. Boumendjel, M. Daoudi *et al.*, 2000).

Le domaine alpin est classiquement divisé en deux grands ensembles :

- L'avant-pays : relativement peu déformé (hautes plaines et Atlas Saharien) :
 - Hautes Alpines : Région tabulaire et faillée, localement effondrée et recouverte de dépôts continentaux mésozoïques.
 - Atlas saharien : Chaîne fortement plissée à couverture jurassique et crétacée très épaisse ou les séries détritiques dominant.
- Tell : fortement charrié et écaillé qui constitue l'ensemble le plus typiquement alpin :
 - Tell septentrional (zone interne) : une chaîne calcaire, un Massif cristallin de Djurdjura, des terrains paléozoïque et d'autres formations méso et cénozoïque.

Elle est composée de vastes empilements de nappes de charriage à matériel marneux crétacé qui se sont mises en place au Miocène.

- Tell méridional (zone externe) : comprend la Meseta oranaise, une région dominante légèrement plissée dotée d'une assez épaisse couverture jurassique et crétacée ou les carbonates dominant.

Sahara : fait partie de la plaque africaine demeure extrêmement stable depuis le carbonifère. Seul de vaste mouvement de subsidence à l'échelle continentale y ont provoqué des transgressions marines dont la dernière remonte à l'Eocène. Il est recouvert en discordance de terrains plus récents (Cambrien à Eocène) peu plissés. C'est un territoire immense (1.800.000km² rien qu'en Algérie), mais peu peuplé. Les pluies sont presque inexistantes, les ressources agricoles sont concentrées aux grandes oasis mises en valeurs grâce au système de pompage en profondeur (ancien). Les karsts superficiels fonctionnels ne se forment pas à cause de précipitation presque inexistante. Les seules manifestations karstiques sont les aquifères de fissures de recharge lentes, recoupé par les fourrages profonds (Collignon 1992).

La figure (1) présente les grandes unités géologiques d'Algérie (Collignon 1992).

1.1.4. Microbiologie des grottes

Les études biologiques des grottes ont porté principalement sur les chauves-souris et les arthropodes (Ahamada and Doğruöz, 2022). En revanche,, les études sur la microorganismes jusqu'à un passé récent étaient très timides et limitées (Tomova *et al.*,2013). Au cours des dernières décennies, la microbiologie des grottes est devenue un domaine interdisciplinaire en pleine croissance, impliquant la géologie et la chimie pour comprendre le métabolisme des microorganismes des grottes et leur biogéochimie (Barton and Jurado, 2007). Les microorganismes des grottes peuvent survivre dans des conditions oligotrophes et sont métaboliquement versatiles et étonnamment divers (Barton and Jurado, 2007). L'intérêt , de l'étude microbiologique de l'environnement souterrain a été accordé à un nombre limité de pays comme l'Italie, l'Espagne, la Roumanie, la France et les Etats-Unis (Tomova *et al.*, 2013).

Les études dédiées à la microbiologie des grottes en Afrique sont très limitées (Belyagoubi *et al.*, 2018). En effet, jusqu'à présent seulement deux études ont été consacrées au microbiote cavernicole algérien. La première étude a été publié en 2018 (Belyagoubi *et al.*,2018) sur l'activité antibactérienne des champignons et actinomycètes de la grotte de Chaabe

(Telemcen, Algérie). La deuxième a été publiée en 2022, dans le but d'explorer les potentialités enzymatique et probiotique des bactéries sporulantes isolées à partir de différentes grottes algériennes (Rehamnia *et al.* 2022).

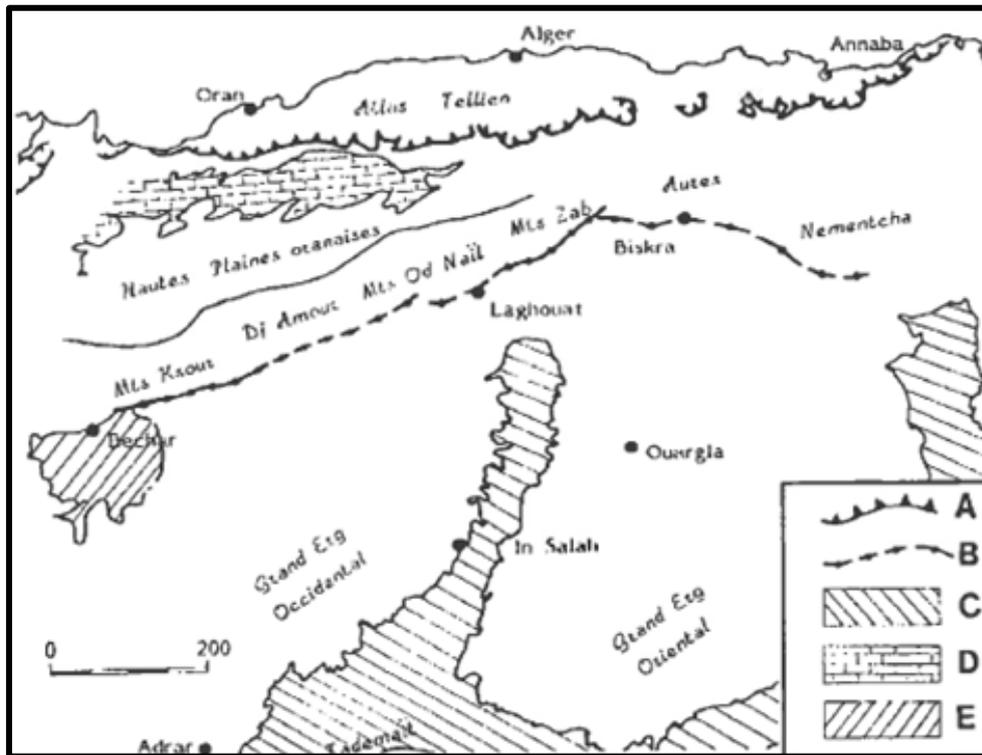


Figure 1 Les grande unités géologiques d'Algérie. A : Limite méridionales des nappes telliennes. B : Flexures sud atlasique. C : Crétacé supérieur saharien. D : Meseta oranaise. E : Carbonifère de Bechar (d'après Bernard Collignon, 1991).

1.2. Les Probiotiques

Cette section est consacrée à la présentation des probiotiques, à leur sélection, ainsi que, à leurs milieux d'isolement. Leurs interactions avec l'hôte ainsi que leurs différents modes d'action seront abordées et détaillées...

1.2.1. Généralités sur les probiotiques

Le terme probiotique est un mot grec qui signifie "en faveur de la vie" (pro : qui est positif et bios : vie, en opposition à l'antibiotiques). Ce terme a été introduit dans la littérature en 1965 et est utilisé pour définir certains microorganismes vivants (Levures et bactéries) ayant un effet bénéfique sur la santé de l'Homme et de l'animal (Lilly and Stillwell, 1965; Guarner and Schaafsma, 1998).

Au début du XX^{ème} siècle Elie Metchnikoff a été le premier à observer l'effet positif de certaines bactéries sur l'Homme. Il avait, en effet, remarqué que les bactéries lactiques (BL) ont un effet sur la longévité des Bulgares et il a émis l'hypothèse que cette dernière était certainement due à leur importante consommation de produits laitiers fermentés (Vasiljevic and Shah 2008). Cette idée a été reprise par les scientifiques, où les remarques du pédiatre français, Henry Tissier sur le nombre abondant de bactéries bifides chez les enfants sains contrairement aux enfants souffrants de diarrhée, ont été prises en considération. Il a suggéré, par conséquent,, que ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrant de diarrhée pour les aider à rétablir leur flore intestinale saine (Lilly and Stillwell, 1965). Par la suite, différentes définitions ont été proposées pour ces bactéries actives comme :« des facteurs capables de stimuler la croissance d'autres microorganismes » (Lilly and Stillwell, 1965), en 1974, Parker proposa d'élargir la définition à ; des « organismes ou substances qui contribuent au maintien de l'équilibre de la flore », « préparations microbiennes vivantes utilisées comme suppléments alimentaires et qui affectent de façon bénéfique l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale »(Fuller, 2001). Après ces tentatives de définition les organismes de, FAO et OMS ont officialisé la définition du terme « probiotique » comme suit : les probiotiques sont des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité adéquate, exercent des effets positifs sur la santé, en plus des effets nutritionnels (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization 2001).

Les probiotiques peuvent être présents dans différents types de produits, en l'occurrence ; aliments, substances médicales et suppléments alimentaires (Erkut *et al.*, 2011). La recherche dans le domaine des probiotique a fait des progrès considérables en ce qui concerne la sélection et la caractérisation des cultures probiotiques spécifiques et la justification des allégations santé liées à leur consommation (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization 2001).

1.2.2. Effets bénéfiques suggérés des probiotiques

Les effets bénéfiques des probiotiques ont été abordés depuis le début du siècle, même avant que le terme probiotique ait été connu et reconnu. La première étude à avoir signalé la capacité des probiotique à manifester des effets bénéfiques pour la santé humaine a été rapportée durant les années 80 et a concerné la digestion du lactose (Fedorak *et al.*, 2015). Cependant, les effets et les allégations attribués à ces produits ainsi que leur mécanisme d'action, n'ont pas été soutenus par une justification scientifique adéquate. Récemment,

plusieurs études scientifiques ont été menées chez l'animal ou l'Homme, ont montré des effets bénéfiques précis de certains probiotiques sur des symptômes cliniques établis (De Souza Oliveira *et al.*, 2009).

Les microorganismes à caractères probiotiques peuvent être très distincts les uns des autres (De Souza Oliveira *et al.*, 2009), car, les effets bénéfiques de ces microorganismes diffèrent des sujets récepteurs (Saarela *et al.*, 2000). En conséquent, les effets bénéfiques des probiotiques dépendent de leur nature, de la formulation du produit et des sujets qui recevront le traitement (Donkor *et al.*, 2007; De Souza Oliveira *et al.*, 2009).

Dans l'action, les effets bénéfiques des probiotiques peuvent être directe en présence du microorganisme lui-même ou, indirectement via une interaction du microorganisme avec le microbiote intestinal (Fedorak *et al.*, 2015). Des études ont établi les effets des probiotiques sur un grand nombre de troubles gastro-intestinaux, y compris ; la modulation du système immunitaire (Simone *et al.*, 1992; Angelis *et al.*, 2006), l'inhibition de la colonisation des microorganismes pathogènes (Schoster *et al.*, 2016), l'amélioration de la prévention contre la diarrhée (Liu *et al.*, 2017; Agamennone *et al.*, 2019), le métabolisme du lactose et réduction de son intolérance (Son *et al.*, 2017), la rémission des maladies inflammatoires de l'intestin (Ganji-Arjenaki and Rafieian-Kopaei 2018), la prévention et amélioration du syndrome de l'intestin irritable (IBS)(Oh *et al.*, 2019), la restauration de la balance de la flore intestinale (Peng *et al.*, 2020) et l'amélioration des symptômes d'intolérance au gluten (Kunduhoglu and Hacıoglu 2021). La figure 2 présente une synthèse des effets bénéfiques des probiotiques d'après Saarela *et al.*, 2000.

1.2.2.1. Rémission des maladies inflammatoires de l'intestin

Ce sont des pathologies chroniques évoluant en crises aiguës suivies de périodes de rémission, tel que ; recto-colite hémorragique, maladie de Crohn, ulcères à *Helicobacter pylori*, etc. (Kappelman *et al.*, 2017). Plusieurs études ont mis en évidence les effets bénéfiques des probiotiques sur la rémission de certaines maladies inflammatoire de l'intestin (Ganji-Arjenaki and Rafieian-Kopaei 2018). Par conséquent, le traitement des maladies inflammatoires intestinales par les probiotiques permet de restaurer les propriétés spécifiques de la microflore endogène. Cependant, la complexité des différentes maladies implique que les applications potentielles et l'amélioration clinique sont dues à des souches probiotiques différentes avec des doses et de périodes différentes (De Conno *et al.*, 2022). À titre d'exemple, les préparations

probiotiques utilisées pour la rémission de la maladie de Crohn sont hétérogènes en termes de souches utilisées, période de traitement et la population cible (De Conno *et al.*, 2022).

1.2.2.2. Diarrhée

Les probiotiques ont montré un effet bénéfique sur les diarrhées associées à l'utilisation des antibiotiques (Agamennone *et al.*, 2019), à la radiothérapie (radiation-induced diarrhea) (Liu *et al.*, 2017), aux Rotavirus, ainsi que à la diarrhée du voyageur (Bae 2018). Plusieurs souches de Lactobacilles et de bifidobactéries tout comme, *Bacillus clausii* et *Saccharomyces boulardii*, semblent réduire les effets secondaires des thérapies antibiotiques et améliorer le confort du patient (Lee and Kim 2020).

1.2.2.3. Constipation

La prise de certaines souches probiotique peut prévenir les épisodes de constipation aiguë et soulager la constipation chronique (selles difficiles, dureté excessive des selles, transit intestinal lent) (Mitelmão *et al.*, 2021), par conséquent permettent de réduire l'utilisation de laxatifs. Ces derniers ont l'inconvénient d'éliminer différentes substances essentielles à l'organisme comme les acides aminés, les minéraux, etc., (Giralt *et al.*, 2008).

1.2.2.4. Prévention et rémission du syndrome de l'intestin irritable (IBS)

Le syndrome du côlon irritable est un désordre gastro-intestinal multifactoriel qui touche 11.2% de la population mondiale (Lovell and Ford 2012), caractérisé par des douleurs abdominales, de la flatulence, de variation de la consistance des selles (constipation, diarrhée) ou de la dyspepsie, sans qu'aucune pathologie organique ou microbiologique ne puisse être décelée (Dale *et al.*, 2019). Un nombre important d'études a montré que certaine préparation de mélange de souches probiotiques ont la capacité d'améliorer les symptômes d'IBS (Oh *et al.*, 2019; Dale *et al.*, 2019).

1.2.2.5. Prévention de la colonisation et de la croissance des microorganismes pathogènes

Les microorganismes probiotiques montrent une habilité à inhiber et à prévenir la colonisation et la croissance des bactéries exogènes et pathogènes lors d'infections entériques. Ceci a été identifié par un nombre de mécanismes antimicrobiens proposés, basés sur un nombre d'étude *in vivo* et *in vitro* ; compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhérence, production de substances antimicrobiennes, compétition au niveau de l'utilisation des nutriments et stimulation des mécanismes de défense immunitaire (Collado *et al.*, 2008). Les

études cliniques, en outre, ont montré des effets positifs pour la prévention et le traitement des infections entériques bactériennes, tel que, infection à *Yersinia enterocolitica* (Montijo-prieto *et al.*, 2015), infection à *Helicobacter pylori* (Eslami *et al.*, 2019) et gastro entérite à *Clostridium* (Kalakuntla *et al.*, 2019) ainsi que à l'infection virale (Senapati *et al.*, 2020; Mirashrafi *et al.*, 2021).

1.2.2.6. Modulation du système immunitaire

L'intestin est l'organe le plus important sur le plan de la fonction immunitaire, approximativement, 60 % des cellules immunitaires du corps sont présentes dans la muqueuse intestinale (Giralt *et al.*, 2008). L'interaction des probiotiques avec le système immunitaire induit une stimulation de l'immunité adaptative (IgA, IgG) et innée (macrophages, basophiles, monocytes) (Monteagudo-Mera *et al.*, 2019). En, outre, les effets des probiotiques sur la stabilisation de la flore microbienne intestinale augmentent les réactions immunitaires humorales et contribuent à améliorer la qualité de la défense assurée par les cellules de l'épithélium intestinal (Singh and Rao, 2021).

1.2.2.7. Intolérances alimentaires

L'intolérance alimentaire (ou l'hypersensibilité alimentaire non allergique) est une réaction, souvent retardée, qui produit des symptômes dans un ou plusieurs organes et systèmes du corps, causée par un aliment, une boisson ou composé présent dans les aliments (Montalto *et al.*, 2006). Les intolérances alimentaires, sont devenues un problème de santé publique. Les intolérances alimentaires les plus connues sont souvent provoquées par le gluten et le lactose :

Intolérance au lactose : le lactose est le principal glucide du lait ; un disaccharide composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de glucose liées par une liaison β -galactosidique. L'hydrolyse du lactose est réalisée par la lactase, or, un large segment de la population est déficient en cette enzyme à l'âge adulte (Fiocchi *et al.*, 2003). Cette déficience est génétiquement déterminée résultant de l'inaptitude à hydrolyser le lactose et souvent à l'origine d'une malabsorption.

Pour être absorbé au niveau de l'intestin grêle, le lactose nécessite d'être, au préalable, hydrolysé en monosaccharides (glucose et galactose). L'hydrolyse peut être perturbée en cas de déficit en lactase (ou hypolactasie). Lorsque cette dernière entraîne des troubles qui sont mis en évidence par des tests appropriés, cet état est qualifié de l'intolérance au lactose (Montalto *et al.*, 2006). L'intolérance, en effet, est l'incapacité ou la capacité insuffisante de digérer le

lactose. Cette maladie, malheureusement, est observée chez 70 à 75 % de la population mondiale (Dainese-Plichon *et al.*, 2014).

Un grand nombre d'études contrôlées portant sur des individus consommant des yaourts avec des cultures vivantes a confirmé l'efficacité de certaines souches probiotiques comme, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bilgaricus* et *Bacillus coagulans*, à améliorer la digestion du lactose et la réduction des symptômes liés à son intolérance (Son *et al.*, 2017; Konuray and Erginkaya, 2018).

Intolérance au gluten : L'intolérance au gluten (connue le plus communément sous le nom de maladie cœliaque) est une maladie chronique intestinale auto-immune liée à l'ingestion de gluten contenu dans les protéines du blé, du seigle, de l'orge et de l'avoine, chez les individus génétiquement prédisposés (West *et al.*, 2007). Le mot Cœliaque vient du mot latin Coeliacus, qui vient du mot grec koiliakos et qui signifie littéralement l'abdomen (Thompson and Méndez, 2008).

La maladie cœliaque est une pathologie multifactorielle due à l'exposition orale au gluten, mais aussi aux facteurs complémentaires comme la prédisposition génétique, de facteurs infectieux (Rewers, 2005) ou, l'introduction trop précoce du gluten dans l'alimentation chez l'enfant (Ivarsson 2005).

Lors de l'absorption d'aliments contenant du gluten du blé, le système immunitaire des personnes concernées réagit à la présence de la gliadine, protéine du gluten, en produisant divers anticorps (De Re *et al.*, 2013). Cette réaction auto-immune cause une atrophie des villosités de la muqueuse intestinale associés à d'autres pathologies (Altération de la digestion et de l'assimilation de la majorité des nutriments, minéraux et vitamines, hypocalcémie, gastrite, maladie de crohn, etc.) (Camarca *et al.*, 2009).

Le gluten est un composant protéique complexe, insoluble dans l'eau, de certaines céréales, notamment le blé (jusqu'à 11%), le seigle (jusqu'à 2,3%), l'orge (jusqu'à 2,3%) et l'avoine (jusqu'à 2,1%). Un régime alimentaire strict sans gluten a été proposé comme la seule solution pour la maladie cœliaque (Angelis *et al.*, 2006). Toutefois, l'exclusion totale du gluten du régime alimentaire est difficile à cause de son ubiquité, contamination alimentaire, réglementation inadéquate en matière d'étiquetage des aliments et contraintes sociales (Angelis *et al.*, 2006). En plus, l'alimentation sans gluten fournit un apport insuffisant de fibres, minéraux et vitamines ainsi qu'un excès de calories (Rizzello *et al.*, 2007). Par ailleurs, d'autres études proposent une thérapie alternative par l'utilisation des probiotiques

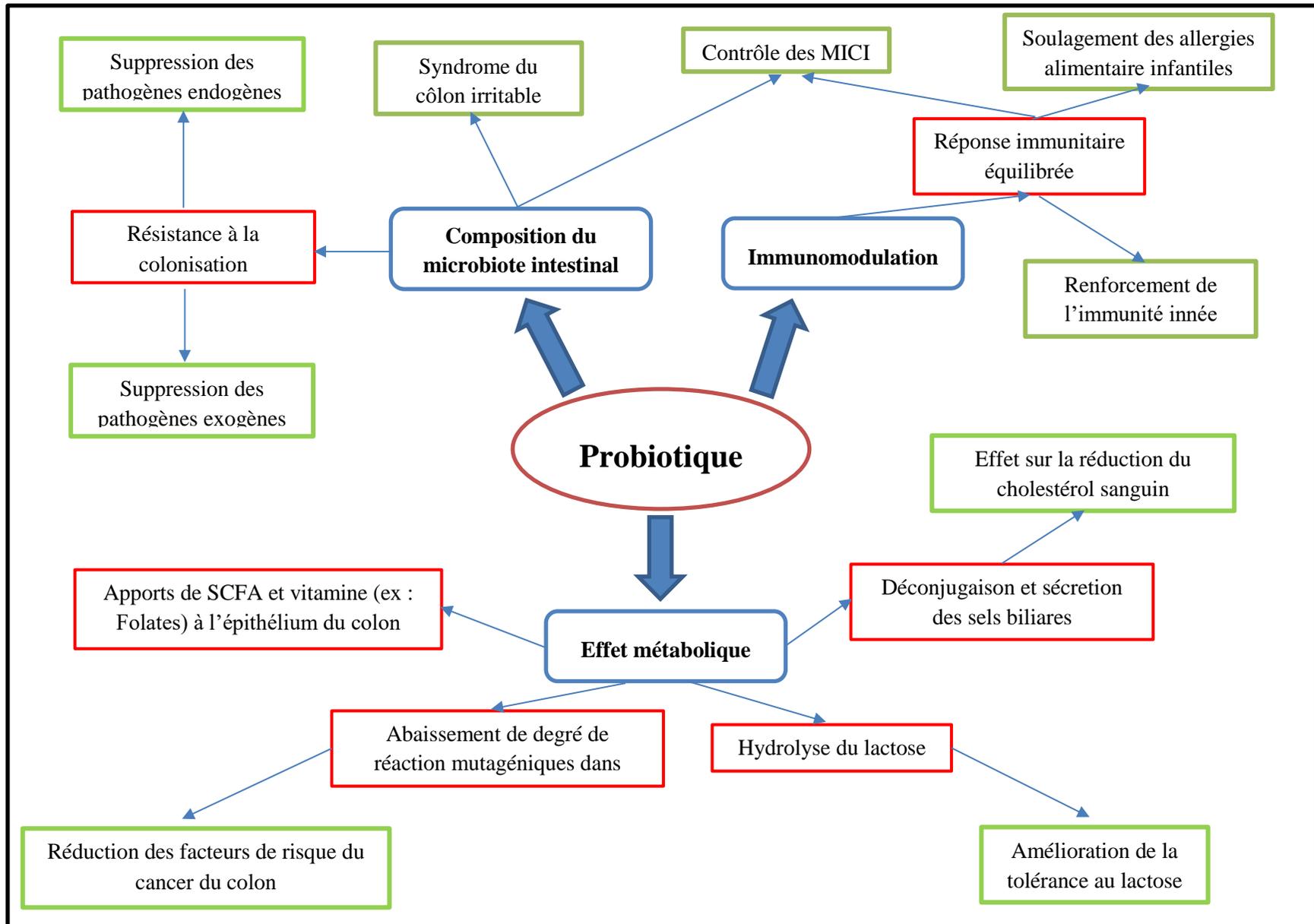


Figure 2 Présentation des effets bénéfiques des probiotiques (Saarela *et al.*, 2000) : MICI : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, SCFA: short chain fatty acid

(Bakshi *et al.*, 2012). Ces derniers ont montré une capacité à moduler la réponse immunitaire induite par les alpha-gliadine (de Sousa Moraes *et al.*, 2014) et une capacité à dégrader ces dernières (Rizzello *et al.*, 2007; Kunduhoglu and Hacıoglu 2021). Ici il est question d'utiliser ; les bifidobactéries (Smecuol *et al.*, 2013), les lactobacilles (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2015) ainsi que les levures (Zamakhchari *et al.*, 2011) et les Bacilles (Rashmi *et al.*, 2020).

1.2.3. Critères de sélection des souches probiotiques

Un nombre important d'espèces bactériennes sont utilisées depuis des décennies dans la production d'aliments pour des différents fins. De plus, une grande variété de produits probiotiques a été développée et mise sur le marché ces dernières années. Ces derniers doivent être capables d'exercer leur effet bénéfique sur l'hôte par leur croissance et par leur activité dans le corps humain (Morelli 2007). Ainsi, la sélection d'un microorganisme probiotique doit répondre à de nombreux critères (critères de sécurité, critères fonctionnels et critères technologiques) (Shewale *et al.*, 2014) que nous allons décrire dans les prochains paragraphes. La figure 3 résume les étapes de sélection des probiotiques.

1.2.3.1. Critères de sécurité

Pour sélectionner les souches probiotiques les plus sanitaires, une série de principes et de pratiques ont été mis en place par FAO et OMS (Giralt *et al.*, 2008) :

Identification de la souche : Il est nécessaire de caractériser de manière précise les souches à utiliser. La détermination taxonomique d'une souche potentiellement probiotique par des techniques moléculaires fiables est indispensable (Gueimonde *et al.*, 2013).

Innocuité : La souche à caractère probiotique doit présenter une parfaite innocuité pour le consommateur et l'environnement et ne doit développer ni infection systémique, ni activité métabolique nuisible, ni stimulation immunitaire excessive, ni transfert de gènes (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization 2001). À ce titre, les microorganismes probiotiques reconnus en usage agroalimentaire depuis de nombreuses années et sont jugés historiquement sécuritaires ont été classés en tant que souches à statut QSP (Qualified Presumption of Safety) en Europe, ou GRAS (Generally Recognized As Safe) aux États-Unis. On cite l'exemple des lactobacilles, les bifidobactéries, les entérobactéries et les lactococcus (Marteau 2006). En revanche, il est

important d'étudier tout effet indésirable possible des microorganismes peu répandus ou qui n'ont pas un long historique d'utilisation et non reconnus par statut QSP ou GRAS, tel que le profil d'antibiorésistance (ne soit pas résistante aux antibiotiques et ne pourra pas induire ou transférer la résistance) ; activités métaboliques nocives (qui peuvent causer des problèmes dans la physiologie Humaine) , production de toxines, potentiel infectieux, activité hémolytique (Thakur 2016).

1.2.3.2. Critères technologiques

Du point de vue technologique, certaines qualités doivent être pris en compte ; stabilité lors de la conservation du produit en dosage approprié jusqu'à la date de péremption, viabilité durant le traitement technologique (telles que la facilité à être cultivée à de hautes densités cellulaires) et conservation de leurs propriétés au cours des procédés de production et de stockage (Shane *et al.*, 2010).

1.2.3.3. Critères fonctionnels

Les souches probiotiques doivent conserver leur viabilité jusqu'à l'arrivée à leur site d'action. Ceci est assuré par la résistance à l'acidité gastrique ainsi qu'aux sels biliaires (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization 2001). L'adhérence à la muqueuse intestinale est aussi un critère très important pour que les probiotiques persistent plus long temps dans le côlon (Ekmekci *et al.*, 2009). En outre, l'aptitude de produire des agents antimicrobiens, la stimulation de la réponse immunitaire et la capacité à agir sur les activités métaboliques ont été aussi considérée parmi les critères fonctionnels les plus recommandé pour sélectionner une souche probiotique (Savadogo *et al.*, 2009).

1.2.4. Mécanisme d'action des probiotiques

Les probiotiques agissent principalement en stimulant les interactions entre l'intestin (cellules épithéliales intestinales), le système immunitaire (cellules immunocompétentes) et le contenu digestif (nutriments et flore endogène) (Sommer and Bäckhed 2013). Ces interactions sont complexes, multiples (figure 4) et dépendent de la souche microbienne considérée (Marteau 2006).

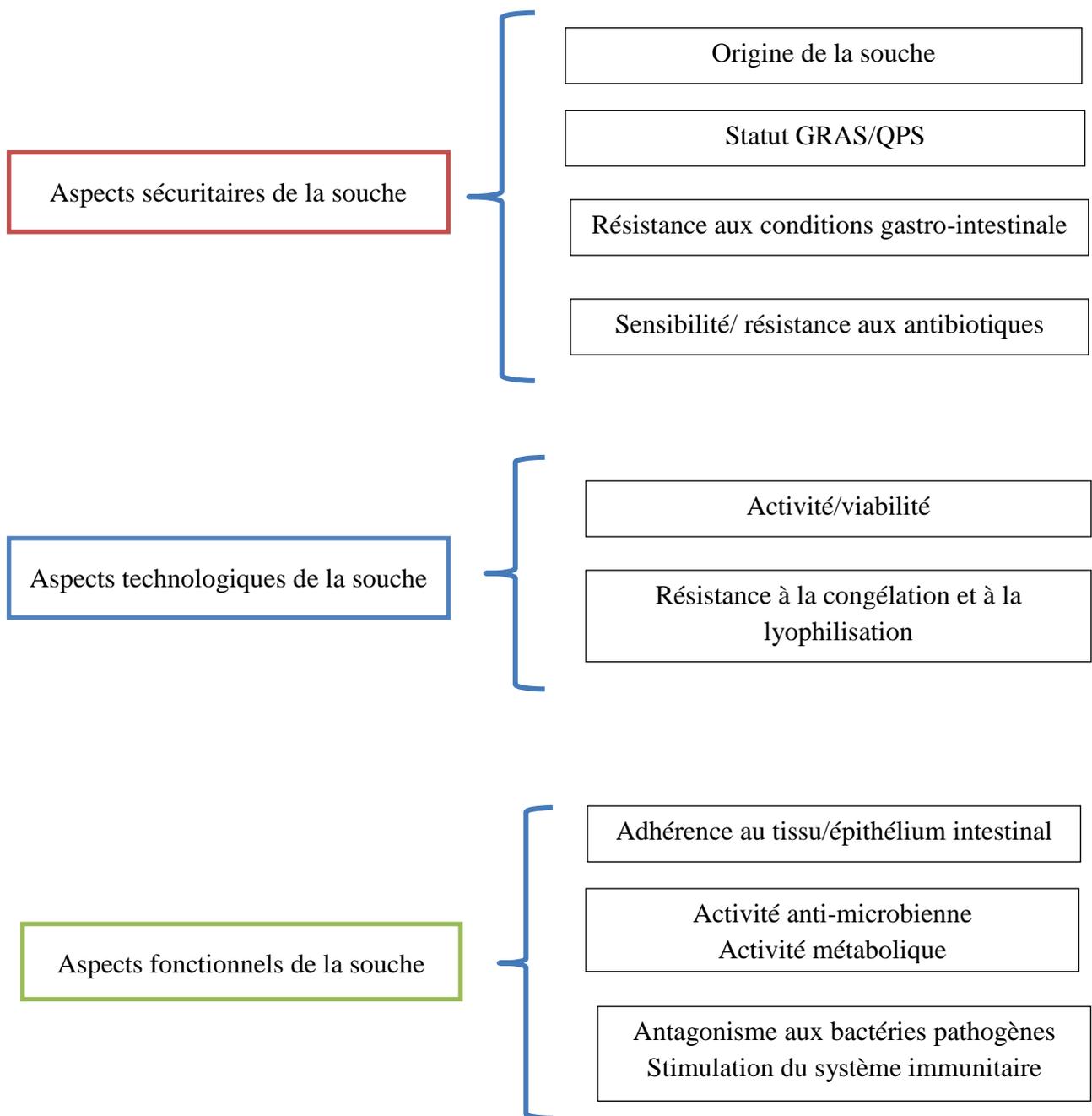


Figure 3 Diagramme d'aspects de sélection, *in vitro*, des souches microbiennes à propriétés probiotique (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, 2001).

Les mécanismes majeurs des probiotiques est le renforcement de la barrière épithéliale, la modulation de l'adhérence de la muqueuse intestinale concomitant à l'inhibition de l'adhérence des pathogènes, l'exclusion compétitive des microorganismes pathogènes, production des substances anti-microorganisme et modulation du système immunitaire(Khare *et al.*, 2018). Les mécanismes utilisés par une espèce probiotiques pour éliminer ou réduire la croissance d'une autre espèce sont variés ; création de (microenvironnement) microecology hostile, élimination des sites récepteurs bactériens disponibles, production et sécrétion des substances antibactériennes et d'autre métabolite sélectives et épuisement compétitif des nutriment essentiels(Khare *et al.*, 2018).

Les microorganismes probiotiques ont été largement étudié pour leur participation à la maintenance de la barrière intestinale. Cependant, le mécanisme par lequel les probiotiques maintiennent la fonction de la barrière intestinale ne sont pas entièrement compris(Khare *et al.*, 2018).

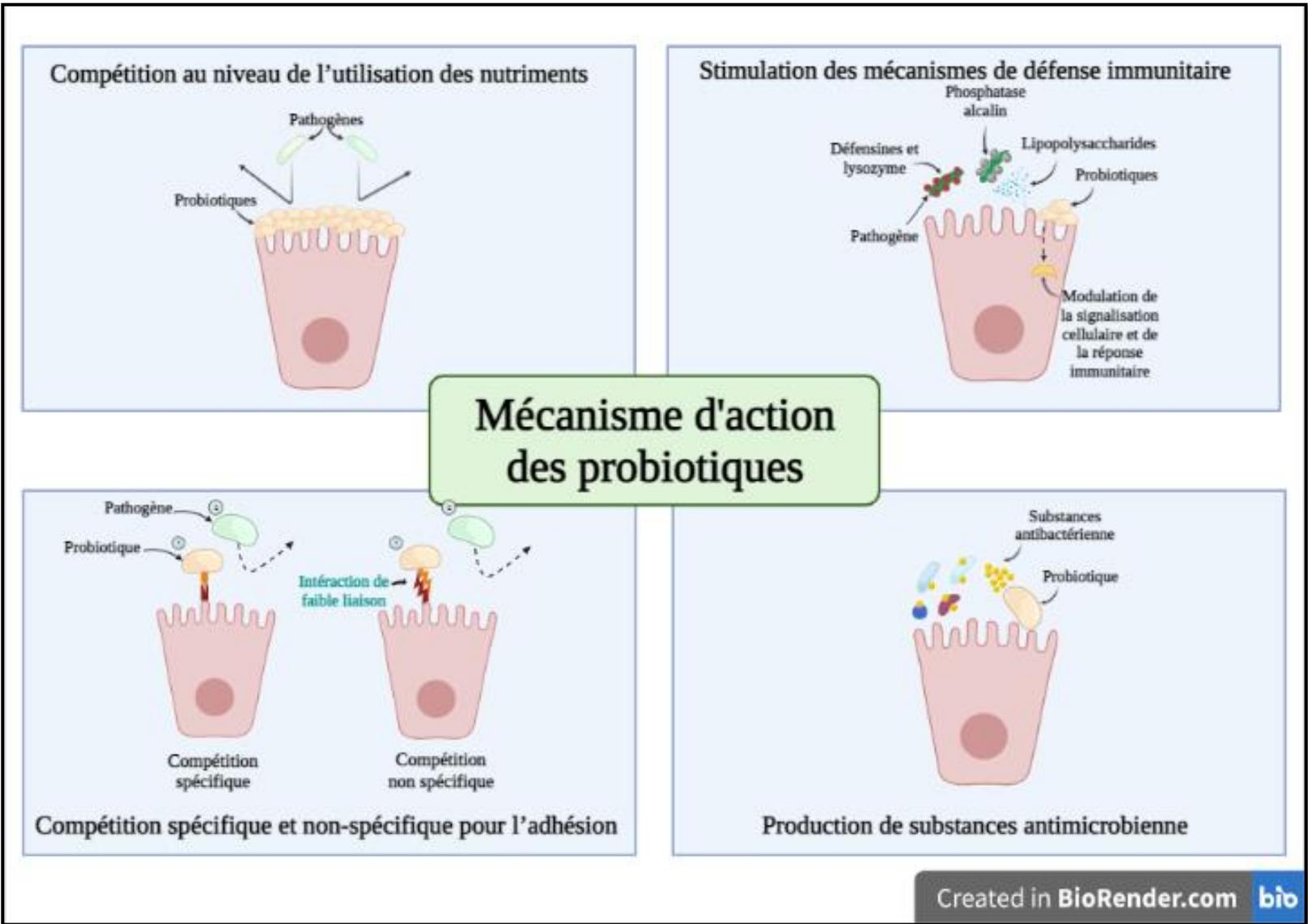


Figure 4 Mécanismes d'action suggérés des probiotiques (Réaliser à l'aide BioRender)

1.2.4.1. Compétition spécifique et non-spécifique pour l'adhérence : Ceci concerne leurs capacités d'adhérence à la muqueuse intestinale, en tenant compte que, la plupart des infections intestinales sont dues à l'adhérence des pathogènes aux entérocytes. A titre d'exemple ; certaines souches de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* ont la capacité de bloquer l'accès vers ces cellules (Picard *et al.*, 2005) par une compétition à l'adhérence. L'adhérence des probiotiques aux cellules intestinales peut déclencher (trigger) une cascade de signalisation (trigger a signaling cascade) menant à une modulation du système immunitaire (Khare *et al.*, 2018). Ce mécanisme d'action serait similaire à celui exercé par le microbiote intestinal face aux infections microbiennes (Liévin-Le Moal and Servin, 2014).

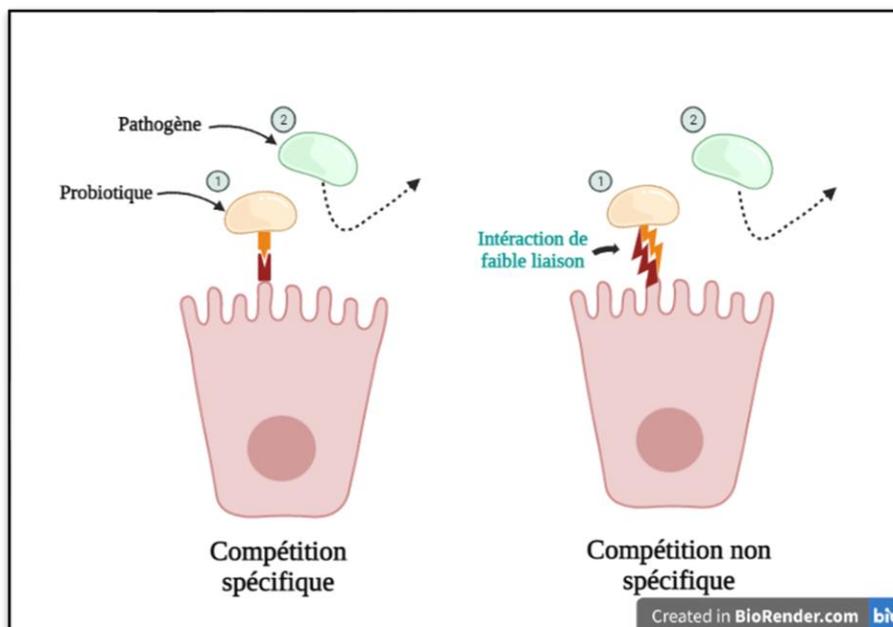


Figure 5 Mécanisme d'inhibition de l'adhérence des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhérence spécifique (a) et non spécifique (b) des probiotiques

1.2.4.2. Production de substances antimicrobiennes : La sécrétion de certains métabolites peut avoir une activation directe ou indirecte (à travers les cellules épithéliales) des cellules immunitaires. Ceci joue un rôle important dans la prévention et le traitement de certaines maladies contagieuses ainsi que les inflammations alimentaires chroniques (Tobias *et al.*, 2022). Les probiotiques peuvent aussi produire des acides organiques et des substances antibactériennes appelées bacitracine (figure 6). En particulier, l'acide acétique et l'acide lactique ont un important effet inhibiteur contre les bactéries à GRAM négatifs, ils ont été aussi considérés comme la principale substance antibactérienne responsable de l'activité inhibitrice des pathogènes secrétée par les antibiotiques (Makras *et al.*, 2006).

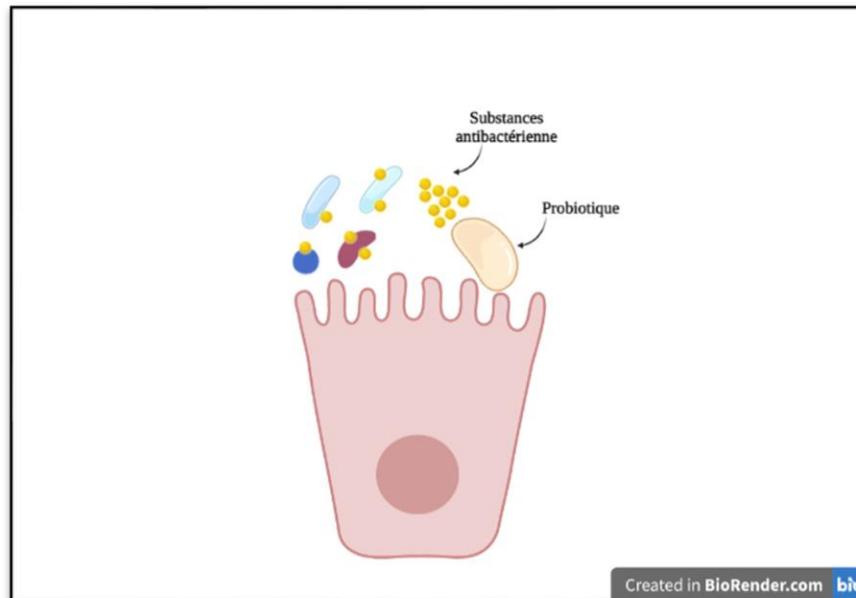


Figure 6 Mécanisme d'inhibition des pathogènes par production des substances antibactérienne.

1.2.4.3. Stimulation des mécanismes de défense immunitaire : Ceci inclue soit le renforcement de la barrière physique de l'épithélium et la modulation du système immunitaire inné, ou par la régulation des sécrétions de cytokines (O'Toole and Cooney 2008). Le renforcement de la barrière épithéliale peut être réalisé par l'amélioration des jonctions étroites de l'épithélium (Muneer *et al.*, 2016) ainsi par la compétition à l'adhérence à la muqueuse intestinale, l'inhibition et l'exclusion des souches pathogènes (Servin 2004).

La modulation du système immunitaire implique deux mécanismes distincts. Certaines souches probiotiques ont un effet anti-inflammatoire par l'action des récepteurs toll-like (TLRs) sur les composants de la voie de l'inflammation telle que ; les cellules dendritiques (Wells 2011). D'autres probiotiques ont montré un effet régulateur direct des réponses immunitaires par la stimulation des sécrétions des cytokines anti-inflammatoire tel que ; IL-10 (Garcia Vilela *et al.*, 2008). Certaines études ont aussi utilisé les bactéries lactiques comme un vecteur pour transmettre IL-10 directement dans l'intestin (Martín *et al.*, 2014) (Figure 7).

1.2.4.4. Compétition au niveau de l'utilisation des nutriments : Les probiotiques peuvent inhiber la croissance des pathogènes par un processus de restriction des nutriments. Ceci est réalisé par une compétition en utilisant les mêmes substrats présents dans la lumière intestinale. La diminution des substrats disponibles rend l'environnement peu favorable à la croissance des pathogènes (Delcenserie *et al.*, 2008) (Figure 8).

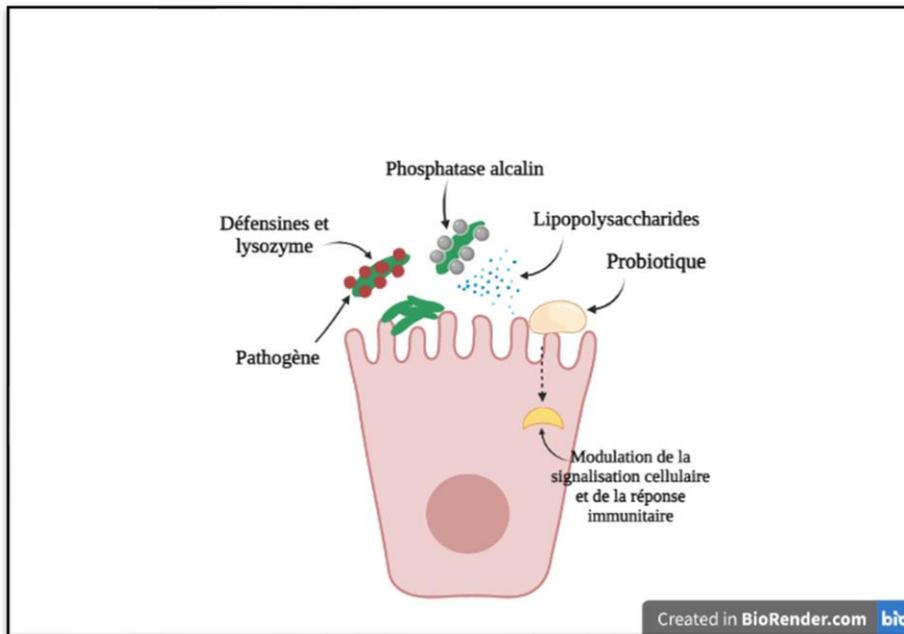


Figure 7 Mécanismes de stimulation de défense immunitaire par production de : phosphate alcalin, lipopolysaccharides, défensines et lysozyme.

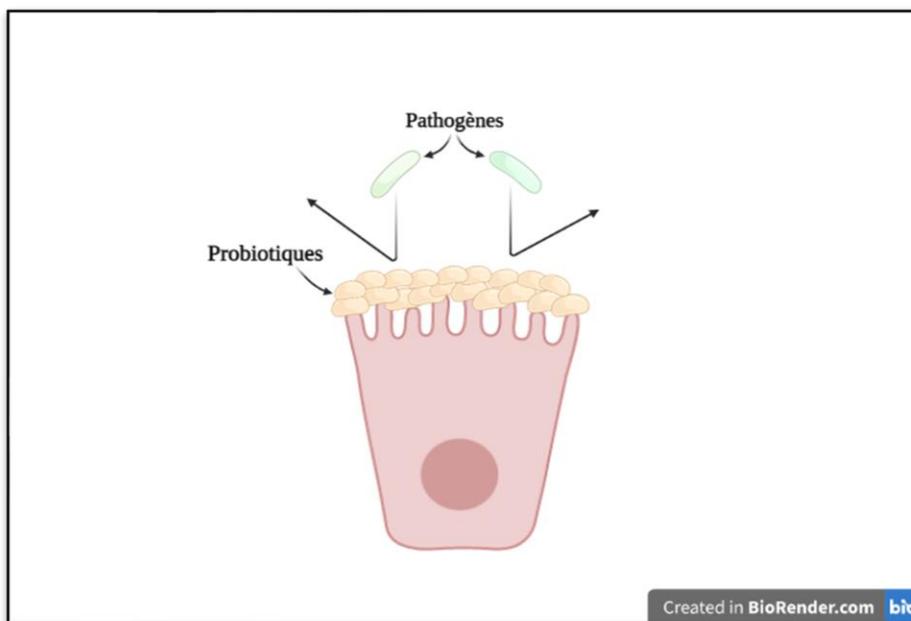


Figure 8 Compétition sur l'adhérence et les nutriments

1.2.5. Effets secondaires associés à la consommation des probiotiques

La majorité des probiotiques mis en vente sont utilisés depuis très longtemps dans divers procédés alimentaires, possèdent une longue histoire de consommation humaine et considérés comme n'ayant aucun effet indésirable rapporté (Ishibashi and Yamazaki, 2001). Cependant, il

existe quelques rares cas où des effets indésirables ont été observés. Peu d'études se sont intéressées aux effets secondaires de ces compléments alimentaires (Herbrecht and Nivoix 2005).

1.2.5.1. Infections : La possibilité de translocation bactérienne, processus par lequel les microorganismes traversent le tractus gastro-intestinal vers d'autres parties du corps, comme les nodules lymphatiques, le sang, le foie, les reins ou la rate, semble entraîner des effets néfastes pour la santé (Ishibashi and Yamazaki 2001). Les bactéries sont souvent tuées dans les organes lymphoïdes, néanmoins, s'il y a perte d'intégrité au niveau de l'épithélium cutané ou intestinal découlant d'une blessure, d'un cancer ou d'une anomalie provoquée par un agent toxique, n'importe quelle bactérie présente dans l'intestin peut atteindre le sang ou certains organes et entraîner des effets néfastes (Ishibashi and Yamazaki 2001). Seulement de rares cas d'infection suite à la prise de lactobacilles et de bifidobactéries ont été signalés chez les patients immunodéprimés (Liong 2008).

1.2.5.2. Effet métabolique : parfois l'action métabolique des probiotiques peuvent se révéler nuisibles, tel que les sels biliaires primaires conjugués en sels biliaires secondaires libres (Marteau and Rambaud 1993) ainsi que les diarrhées liées au métabolisme de la bile (Herbrecht and Nivoix 2005).

1.2.5.3. Transfert de gènes : Il est possible que certains gènes de résistance aux antibiotiques des souches probiotiques soient transférés (par plasmides ou transposons) au microbiote de l'hôte ou au microorganismes pathogènes (Herbrecht and Nivoix, 2005).

Ces quelques effets secondaires sont néanmoins, très rares chez des sujets sains (Herbrecht and Nivoix, 2005; Bute, l 2014).

Cependant, malgré les milliards de doses de probiotiques consommés annuellement à travers le monde, les complications observées sont extrêmement rares et ne semblent se produire que dans des cas particuliers, surtout chez les patients âgés, les individus immunodéprimés ou les gens ayant de graves problèmes intestinaux (Cassone *et al.*, 2003). Toutefois, une conclusion semble faire que les probiotiques ne devraient pas être administrés directement pour des maladies sévères ou chez des individus fortement immunodéprimés. Le suivi par des médecins spécialistes devrait être réalisé dans ces cas afin de pouvoir réagir rapidement aux complications (Tamboli *et al.*, 2003).

1.2.6. Sol comme source non-conventionnelle des probiotiques

Les microorganismes probiotiques sont largement distribués dans la nature (Siraj *et al.*, 2017). Cependant, les souches probiotiques utilisés chez les êtres humains sont souvent isolées à partir de produits laitiers ou de sources intestinales humaines (Siraj *et al.*, 2017). Plusieurs études ont sélectionné des probiotique à partir des sources alternatives tel que ; fruit et légumes (Amorim *et al.*, 2018), aliments fermentés (Son *et al.*, 2017; Zommiti *et al.*, 2018), poisson et fruit de mer (Aarti *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2018), déchets alimentaires (Ashayerizadeh *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017) et sol (Matei *et al.*, 2016; Siraj *et al.*, 2017; Singhal *et al.*, 2019).

L'utilisation des probiotique isolés à partir des sources alternatives, connu sous le nom « source non-conventionnelle », est susceptible d'augmenter (Sornplang and Piyadeatsoontorn 2016). Une des causes d'augmentation d'utilisation des sources non- conventionnelle est pour éviter la consommation des produit laitiers pour les gens qui souffrent de l'intolérance au lactose, la sélection des microorganismes à potentiel probiotique se fait à partir des sources non-intestinales et non-laitières, tel que les aliments traditionnels fermentés, les boissons fermentées, les végétaux, fruits et jus (Matei *et al.*, 2016).

Les grottes sont une des sources les plus importantes pour l'isolement des microorganismes extrêmophiles à activité antibactérienne et enzymatique. Notre connaissance sur la diversité microbienne cavernicole reste limité, néanmoins ces derniers présentent une chance de trouver de nouvelles souches à différents potentiels (Tomova *et al.*, 2013).

La figure 9 présente la différence entre les sources d'isolement conventionnelles et non-conventionnelles des probiotiques.

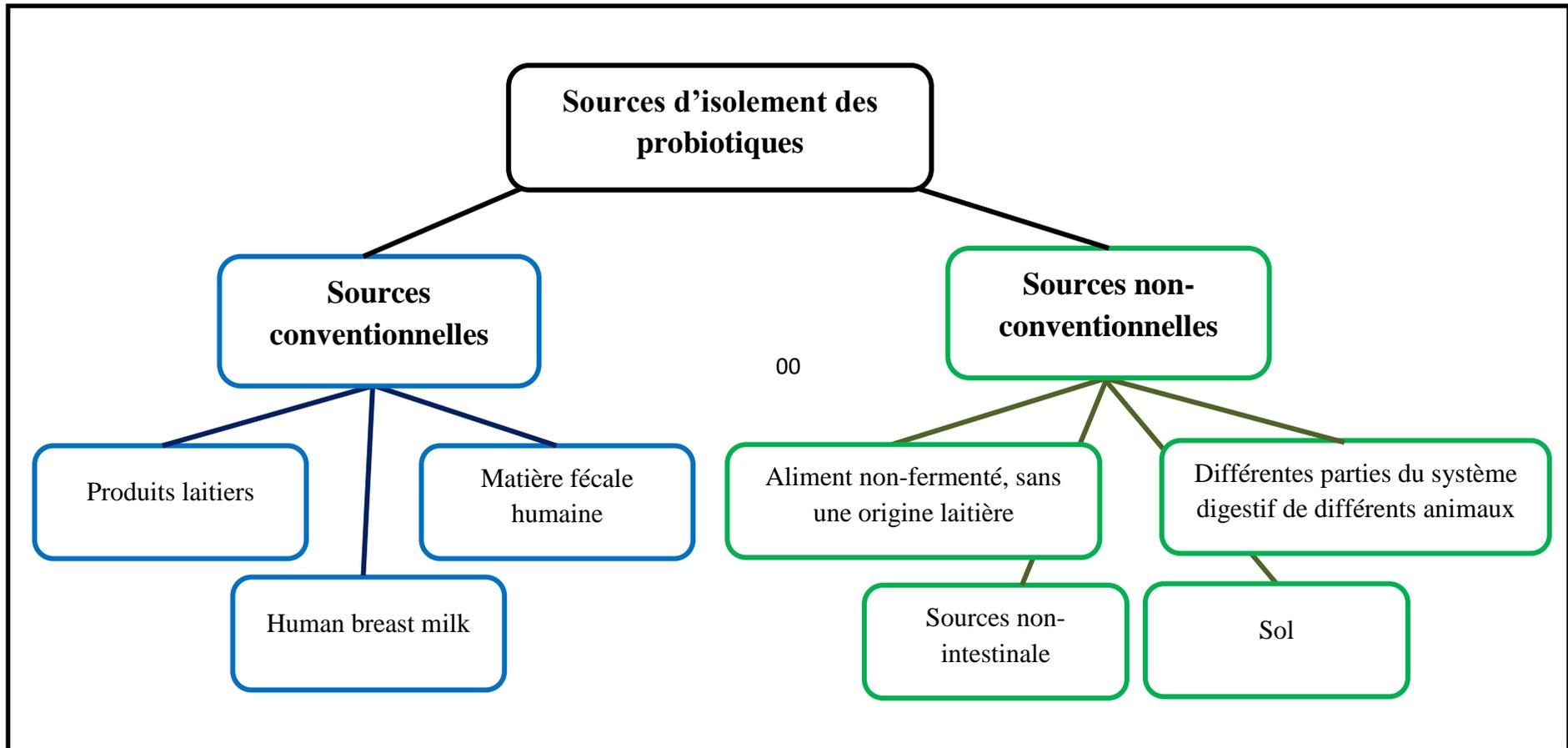


Figure 9 Diagramme présentant les différentes sources d'isolement des probiotiques

1.2.7. Bactéries du genre *Bacillus* comme probiotiques

Ces dernières années, une panoplie de produits probiotiques a été développée et mise sur le marché international (Forsythe and Bienenstock 2010). L'utilisation de lactobacilles et de bifidobactéries en tant que probiotiques semble d'être largement répandue, néanmoins, ces dernières années, la communauté scientifique commence à s'intéresser plus intensément aux espèces du genre *Bacillus* (Cutting 2011a), bien qu'il ait été commercialisé depuis 1958 dans le produit italien Enterogermina (Cutting 2011a).

Le genre *Bacillus* est un groupe de microorganismes très diversifié et commercialement utile. Les bactéries firmicutes du genre *Bacillus* sont des bacilles sporulés à Gram positif aérobies à anaérobies facultatifs (Logan *et al.*, 2009). Sont largement distribués dans le sol, l'air et l'eau. À l'exception de *Bacillus anthracis* (l'agent responsable de l'anthrax) et de *Bacillus cereus* (agent opportuniste responsable d'intoxication alimentaire), la majorité des espèces sont non pathogène (Logan *et al.*, 2009). Le genre *Bacillus* est reconnu dans l'usage agroalimentaire depuis de nombreuses années et jugée historiquement sécuritaires (Cutting 2011). Ce genre n'est pas indigène de l'intestin humain et présent de façon transitoire suite à la consommation de produits provenant de l'environnement comme les légumes (Tamang *et al.*, 2016). Ainsi, les humains sont intrinsèquement exposés aux spores de *Bacillus* (Fakhry *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). Le *Bacillus* présente un intérêt en tant que probiotiques, notamment grâce à leur capacité à produire de nombreuses substances antimicrobiennes (Ritter *et al.*, 2018; Shinde *et al.*, 2019) et enzymatiques (Hu *et al.*, 2018), à exercer un effet modulateur immunitaire (Fan *et al.*, 2019) et leur capacité à réduire certaines maladies (Majeed *et al.*, 2019; Maity *et al.*, 2020). En plus, des études récentes ont montré que les bactéries du genre *Bacillus* peuvent jouer un rôle important dans certaines maladies métaboliques telle que ; l'intolérance au gluten (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2015; Rashmi and Gayathri 2017; Wagh *et al.*, 2018) et au lactose (Son *et al.*, 2017).

Contrairement aux bactéries lactiques, les bactéries du genre *Bacillus* ont la capacité de former des spores capables de survivre à des conditions extrêmes, à des environnements hostiles comme l'acidité de l'estomac des monogastriques et de permettre sa distribution sous forme sèche qui leur rend un candidat potentiel comme probiotique (Cutting 2011b; Elshaghabe *et al.*, 2017). Grâce à la viabilité et à la stabilité de leur spore, ces bactéries présentent une résistance accrue au pH extrême de l'estomac, ainsi qu'une meilleure aptitude à la conservation après son conditionnement (Duc *et al.*, 2004). De plus, certaines études ont montré que les spores de *Bacillus* probiotique pouvaient germer dans l'intestin (Casula and Cutting, 2002), favorisant

son développement dans le tractus afin d'exercer ses effets bénéfiques (Duc *et al.*, 2003). Dans l'intestin, riche en nutriments, les spores pourront prendre la forme végétative en quelques minutes, compte tenu des conditions nutritionnelles favorables (Cutting 2011b).

Le Tableau 2 présente les espèces du genre *Bacillus* utilisées comme probiotique.

Le Tableau 3 regroupe les principaux produits commerciaux contenant une ou plusieurs souches de *Bacillus* (à l'exception des produits du marché Vietnamien, très nombreux, et dont les effets probiotiques restent à démontrer) d'après (Cutting 2011b).

Tableau 2 Espèces du genre *Bacillus* utilisées comme probiotiques

<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>
<i>Bacillus clausii</i>
<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>
<i>Bacillus lentus</i>
<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Bacillus mojavensis</i>
<i>Bacillus pumils</i>
<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Geocillusstearothermophilus</i>

Tableau 3 Principaux produits commercialisés contenant une ou plusieurs souches de *Bacillus* probiotique (d'après Cutting 2011).

Produit	Fabricant	Souches
Bactisubtil®	Produit par Marion Merrell, Levallois-Perret, France mais aussi par Hoechst puis Aventis Pharma. Egalement produit par Casella-Med, Cologne, Allemagne.	<i>Bacillus cereus</i> IP 5832b (déposé à l'origine comme <i>Bacillus subtilis</i>)
Bio-Kult®	Protexin Health Care, Somerset, Royaume Uni	<i>B. subtilis</i>
Biosporin®	Biofarm, Ukraine	<i>B. subtilis</i> 2335 <i>B. licheniformis</i> 2336
Biovicerin®	Geyer Medicamentos S.A. Porto Alegre, Brésil.	<i>B. cereus</i> GM
Bispan®	BinexCo.Ltd., Busan, Corée du Sud	<i>B. polyfermenticus</i> SCD
Domuvar	BioProgressSpA, Anagni, Italie	<i>B. clausii</i> (déposé à l'origine comme <i>B.subtilis</i>)
Enterogermina®	Sanofi SynthelaboSpA, Milan, Italie	<i>B. clausii</i> O/C <i>B. clausii</i> N/R <i>B. clausii</i> T <i>B. clausii</i> SIN
Sustenex®	Gaeden Biotech Inc., Ohio, USA	<i>B. coagulans</i> GanedenBC ³⁰
Lactipan Plus	IstitutoBiochimicoItalianoSpA, Milan, Italie	Commercialisé en tant que <i>Lactobacillus sporogenes</i> mais contenant <i>Bacillus subtilis</i>
Lactospore	Sabinsa Corp., Piscataway, USA	Commercialisé en tant que <i>Lactobcillusporogenes</i> mais contenant <i>Bacillus coagulans</i>
Medilac-Vita	Hanmi Pharmaceutical Co.Ltd., Beijing, China	<i>Bacillus subtikis</i> RO179
Nature's First Food	Nature's First Law, San Diego, USA	Produit contenant 42 espèces probiotiques dont <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus polymyxa</i> ,

Revue bibliographique

		<i>Bacillus pumilus</i> et <i>Bacillus laterisporus</i>
Neolactoflorene	NewpharmaS.r.l., Milan, Italie	Commercialisé en tant que <i>Bacillus subtilis</i> mais contenant <i>Bacillus coagulans</i>
Primal Defense™	Garden of Life ®, Palm Beach, USA.	<i>Bacillus subtilis</i>
Probis®	Safisis, Lesaffre, France	<i>Bacillus subtilis CUI</i>

Remarque : les produits du marché Vietnamien n'apparaissent pas dans ce tableau.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2. Matériel et méthodes

La présente étude porte sur l'isolement et la sélection des bactéries du genre *Bacillus*, susceptibles de servir comme probiotiques (activité beta-galactosidase et gliadinase), à partir des sédiments des grottes algériennes. Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des frères Mentouri, Constantine (Algérie), et au laboratoire de Microbial Geocology and Astrobiology, département d'Ecologie et des sciences environnementales, Université d'Umeå (Suède).

2.1. Collection des échantillons

Les échantillons de nature tellurique (sol), ont été prélevés, aléatoirement, à partir de dix grottes, non exposées à l'activité humaine, dans différentes régions représentant différentes Wilayas de l'Algérie (figure1). L'échantillonnage a été effectué à partir de la partie obscure des grottes (figure2, figure3, tableau 1) durant deux périodes de l'année ; période des hautes eaux et de basses eaux. Les prélèvements ont été, soigneusement, mis dans des flacons stériles et transportés à 4°C pour analyses physico-chimiques et microbiologiques au laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM).

Il est à signaler que certaines grottes se caractérisent par des profondeurs variables et celle d'Anou Boussouil située à Tikjda (massif du Djurdjura) était la plus profonde et considérée comme le deuxième gouffre plus profond en Afrique.

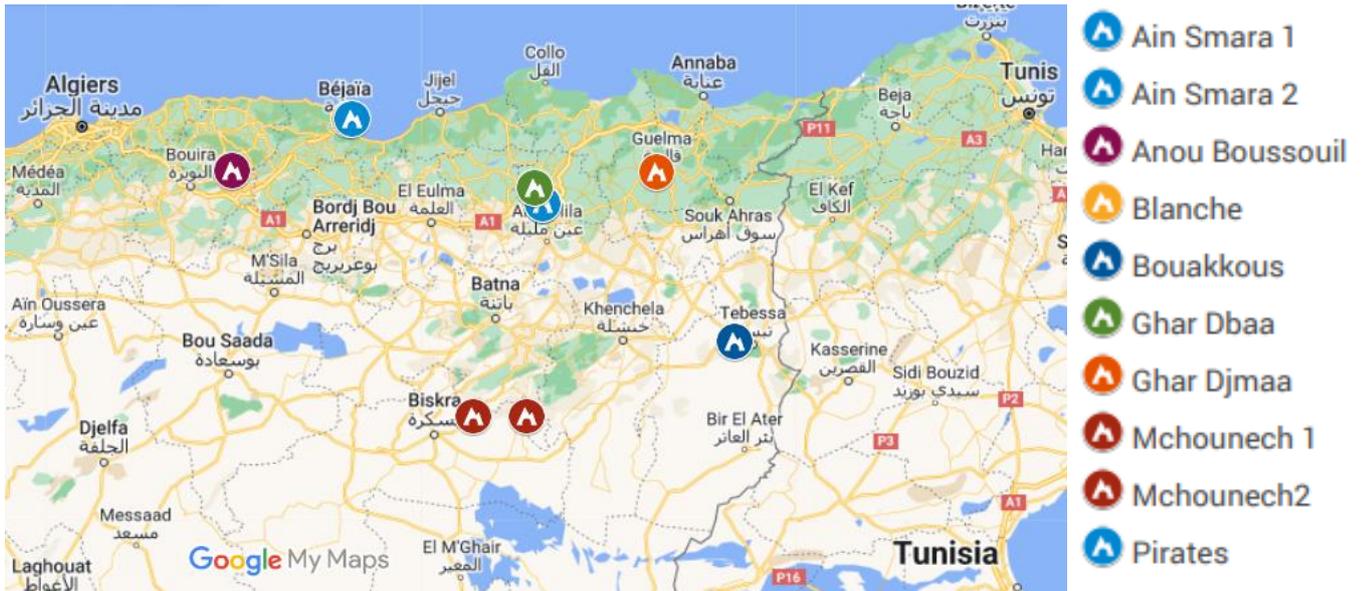


Figure 10 Localisations géographiques des lieux de prélèvements (Google maps)

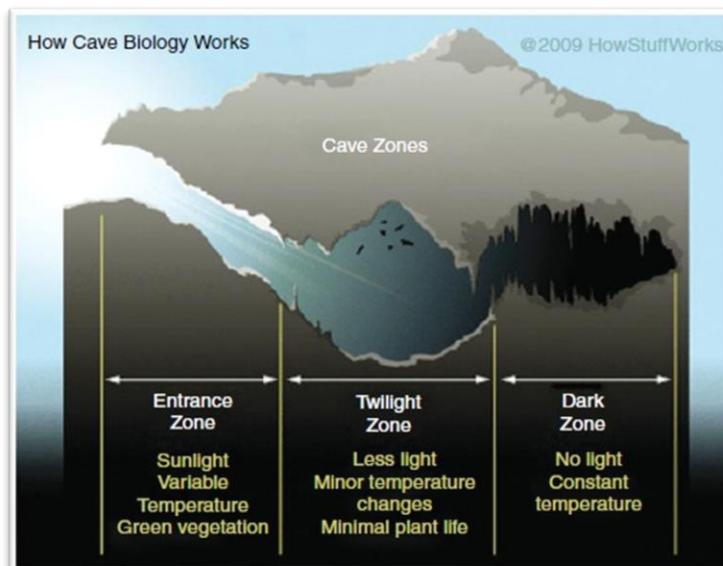


Figure 11 Les trois zones d'une grotte (entrée, twilight, noir) (image à partir de www.howstuffworks.com).

Matériel et méthodes

Tableau 4 Régions, sites d'échantillonnage et caractéristiques des lieux de prélèvement des échantillons.

Grottes	Code des grottes	Les coordonnées GPS	Région	Profondeur (m)	Précipitation annuelle (Office National de la Météorologie)
Ain Smara 1	AS1	36°15'34,85"N 06°31'25.78" E	Constantine	-10	630 mm
Ain Smara 2	AS2	36°15'34,85"N 06°31'25.78" E	Constantine	-10	630 mm
Blanche	BL	36°46'12.5"N 5°04'42.9"E	Bejaia	NA	830 mm
Bouakkous	BOU	35°25'04.4"N 7°57'49.2"E	Tébessa	-50	830mm
Boussouil	ANOU	36°28'09.4"N 4°11'29.5"E	Bouira	-805	650 mm
Ghardbaa	GD	36°21'40.8"N 6°28'29.7"E	Constantine	NA	630 mm
Ghardjmaa	GG	36°27'27.2"N 7°23'08.9"E	Guelma	NA	557 mm
Mchounech 1	MB1	34°57'23.4"N 6°24'1.6"E	Biskra	NA	141 mm
Mchounech 2	MB2	34°57'41.6"N 6°00'48.6"E	Biskra	NA	141 mm
Pirate	PR	36°46'19.4"N 5°05'53.9"E	Bejaia	NA	830mm

NA= n'est pas applicable



Figure 12 Echantillonnage à partir de grottes (GharDbaa, Constantine)

2.2. Etude des paramètres physico chimiques des grottes

L'analyse physico-chimique des échantillons du sol (sédiments) a été réalisée au niveau du laboratoire d'écologie (Université Frères Mentouri, Constantine 1). Pour l'étude statistique toute analyse est effectuée en trois répétitions.

2.2.1. Mesure de la température et de l'humidité de l'air des grottes

La température de l'air de la grotte a été mesurée à l'aide d'un thermomètre électronique. L'humidité a été mesurée au moyen d'un hygromètre (OEM HTC-1).

2.2.2. Etude pédologique des sédiments

2.2.2.1- Traitement et préparation de l'échantillon du sol

Tous les échantillons ont subi un séchage à 30°C pendant une semaine, un broyage avec un mortier en porcelaine (dans le but de les réduire en particules fines), suivi d'un tamisage à l'aide d'un tamis de maille de Θ 2mm. Les échantillons ont été conservés dans des sachets krafts pour analyses ultérieures.

2.2.2.2- Mesure de pH

La mesure du pH a été réalisée suivant la norme NF X 31-103 (AFNOR and 31-103 1989). Une suspension sol/eau distillée d'un rapport de 1/2,5 a été préparée et le pH a été mesuré sur le surnageant à l'aide d'un pH mètre (HANNA INSTRUMENTS) étalonné avec des solutions à pH connu.

2.2.2.3- Conductivité électrique (CE)

L'évaluation de conductivité a été effectuée selon la méthode ISO 11265, (1994). Une suspension sol/eau distillée d'un rapport de 1/5 a été préparée. La mesure de la conductivité électrique a été réalisée sur le surnageant à l'aide d'un conductimètre (HANNA instruments). Les résultats sont exprimés en $\mu\text{S}/\text{cm}$.

2.2.2.4- Matière organique

Le dosage de la matière organique (MO) a été opéré selon la méthode de Walkley et Black (Duchaufour Ph 1991), qui se base sur l'oxydation du carbone par le bichromate de potassium en milieu fortement acide (acide sulfurique). Les résultats sont exprimés en % de C_{org} et le taux de MO est obtenu en multipliant le taux du C_{org} par le coefficient 1,724.

2.2.2.5- Calcaire total

L'estimation du calcaire total a été réalisée selon Müller et Gastner (1971).

Pour ce faire, une méthode gazométrique, à l'aide du Calcimètre de Bernard, a été utilisée. Le taux en calcaire total est calculé selon l'équation (1) et exprimé en pourcentage (Müller and Gastner 1971).

$$\text{CaCO}_3\% = \frac{V'.0.3}{V.P} . 100 \dots\dots\dots (1)$$

2.3. Isolement des bactéries sporulées

2.3.1. Traitement thermique

Pour la préparation de la solution mère, 1g de chaque échantillon du sol a été ajouté à 9ml d'eau physiologique stérile (9g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée).

Afin d'assurer, uniquement l'isolement des spores et l'élimination de toute forme végétative, la solution mère, de chaque échantillon, a subi un traitement thermique à 80°C pendant 15 min, puis, un refroidissement dans de l'eau froide.

2.3.2. Isolement des microorganismes

Trois séries de dilutions décimales ont été préparées à partir de la solution traitée. 1ml de chaque dilution a été déposé sur une gélose de tryptone soja (TSA) en boîte de Pétri (annexe 2) et étalé uniformément sur la surface de la gélose. Les boîtes ainsi préparées ont été incubées pendant une semaine à des températures ; 4, 14, 20 et 25°C (pour simuler la température des grottes échantillonnées).

2.3.3. Purification de souches bactériennes obtenues

Après développement de colonies, une série de purification ont été réalisée par repiquages successifs sur milieu TSA suivie de, l'incubation de toutes les boîtes à 30°C jusqu'à l'obtention de colonies apparentes (Salciarini et al. 2006). Ensuite, la pureté des souches a été vérifiée par des examens macroscopiques et microscopiques.

Les isolats purs ont été conservés dans des tubes inclinés sur milieu TSA (annexe 2). Pour un stockage à long terme les isolats ont été conservés à - 20°C dans du bouillon de soja tryptic (TSB) additionné à 35% (v/v) de glycérol stérile.

2.4. Evaluation préliminaire de l'innocuité des isolats (SASS)

2.4.1. Recherche de l'Activité hémolytique

L'activité hémolytique a été mise en évidence selon la méthode de (Maragkoudakis et al. 2006). Pour ce faire, les isolats ont été ensemencés en stries sur milieu gélosé Columbia (VWR chemicals) (annexe 2) contenant 5% (P/V) de sang de mouton et incubées de 24h à 48 h à 37°C. Après incubation, les boîtes ont été examinées pour des signes de β -hémolyse (zones claires autour des colonies), α -hémolyse (zones avec reflets verdâtres autour des colonies). La souche *E. coli* (ATCC25922) a été utilisée en tant que control positif de α -hémolyse, *Staphylococcus aureus* (ATCC43300) en tant que control positif de β -hémolyse et

Matériel et méthodes

Bacillus cereus (laboratoire de microbiologie, CHU Constantine, Algérie) en tant que control négatif (γ -hémolyse).

2.4.2. Recherche de l'Activité lécithinase

L'activité lécithinase a été déterminée par la méthode de (Matarante et al. 2004). Les isolats ont été ensemencés en stries sur des boîtes de gélose au jaune d'œuf et incubées de 24h à une semaine à 37°C. L'apparition d'une zone opaque autour de la colonie est considérée comme une réaction lécithinase positive (Maragkoudakis et al. 2006). *Bacillus cereus* (laboratoire de microbiologie, CHU Constantine, Algeria) a été utilisée en tant que control positif.

2.4.3. Sensibilité aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques des isolats sélectionnés a été effectuée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé de (BAUER and AW 1966). Pour ce faire, des cultures d'une nuit (10^9 CFU.ml⁻¹) ont été écouvillonnées (en stries séchées) sur des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé Muller–Hinton (annexe 2). Ensuite, des disques d'antibiotiques (Himedia) ont été placés sur la surface de la culture suivie par une incubation de 24h à 37°C. Le test a été performé en trois répétitions.

La sélection des antibiotiques a été effectuée en se basant sur les recommandations de EFSA (European Food Safety Authority) considérant la sensibilité du genre *Bacillus* aux antibiotiques (European Food Safety Authority, 2012). Les antibiotiques (Himedia) utilisés sont : les inhibiteurs de la synthèse protéique (Amikacine 30 μ g, Ciprofloxacine 1 μ g, Erythromycine 10 μ g, Gentamicine 10 μ g), les inhibiteurs de la paroi bactérienne (Oxacilline 5 μ g, Céfazoline 30 μ g, Vancomycine 5 μ g, Ampicilline 2 μ g, Amoxicilline 10 μ g, Imipenème 10g) et les inhibiteurs de l'action de RNA polymérase (Rifampicine 15 μ g).

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et évalués selon les recommandations d'EFSA (European Food Safety Authority, 2012).

2.5. Sélection des isolats à potentialités enzymatiques

2.5.1. Mise en évidence de pouvoir de dégradation de gliadine

2.5.1.1. Extraction de la gliadine

La gliadine, utilisée dans ce test, a été extraite à partir du gluten de blé commercial (Reppe AB, Lidköping, Sweden). Ce dernier est constitué de 77.7% de protéine (poids sec ; teneur en protéine a été calculée selon NMKL Nr 6, Kjeltec, nitrogen factor x 5.7), 5.8% d'amidon (poids sec ; selon la méthode d'Ewarts) et 6.9% de teneur en humidité (selon le

Matériel et méthodes

poids total) (Kuktaite et al. 2016). La poudre du gluten a été dissoute dans de l'éthanol à 70% (qualité moléculaire 99.8%), et agité à 300 rpm (Hunkellka, Werk KS 500) à température ambiante pendant 30 min., ensuite, le mélange a été centrifugé à 12,000 g pendant 10 minutes (Beckman centrifuge J2.21) pour récupérer le surnageant (Kuktaite et al. 2016). Ce dernier a été mis dans un évaporateur rotatif sous vide (Buchi) pour éliminer l'éthanol. La poudre de la gliadine a été collectée et lyophilisée (Edwards, Modulyo). Le contenu en protéine dans la poudre de la gliadine est de 91% selon la méthode de Dumas (Thermo Scientific, Flash 2000 NC Analyzer) (Muneer et al. 2016).

2.5.1.2. Dégradation de la gliadine sur boîte

Le pouvoir des isolats à dégrader la gliadine a été évalué selon la méthode de (Berger et al. 2015). Pour ce faire, les isolats ont étéensemencés dans des boîtes de Pétri sur milieu gélosé LB (Merck) contenant 5% de la gliadine. Les souches ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC25922) et *E. coli* (ATCC27853) ont été utilisées en tant que contrôles positif et négatif consécutivement. L'hydrolyse de la gliadine a été obtenue par une zone claire autour de la colonie.

2.5.2. Mise en évidence de l'activité bêta-galactosidase

Les isolats ont étéensemencés dans des boites de Pétri sur milieu gélosé LB (Merck) infusé par 50µl X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indole- -D-galactopyranoside ; 20mg/ml of DMSO) (Geneon), ensuite incubées pendant 48h à 37°C. La souche *E. coli* (ATCC25922) a été utilisée en tant que contrôle positif et *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) en tant que contrôle négatif. Les colonies montrant une coloration bleue sont considérées comme isolats à activité beta-galactosidase positive.

2.5.3. Dosage de l'activité enzymatique de bêta-galactosidase

Le dosage de l'activité β -galactosidase a été effectué selon la méthode décrite par (Miller 1972). Pour ce faire, les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation (5000rpm pendant 10 min) à partir de cultures bactériennes de 12h. Ensuite, les cellules récupérées ont été lavées et diluées par le tampon Z (annexe 2). La densité optique des solutions produites a été mesurée à 600nm. Pour la perméabilisation des cellules ; 100µl de chloroforme et 50µl de 0.1% SDS ont été ajoutés aux solutions bactériennes diluées. Ensuite, une solution contenant le substrat constituée d'Ortho-nitrophenyl-p-D-galactopyranoside (ONPG) (ONPG ; 4 mg/mL) a été ajoutée, puis, incubées à 37°C jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune. La réaction a été arrêtée après un développement suffisant de la coloration

Matériel et méthodes

jaune, par l'ajout de 0.5 ml de 1M Na₂CO₃. La densité optique a été mesurée à 420 nm et à 550 nm pour chaque tube.

La production d'une couleur jaune indique un résultat positif (Miller 1972). *E. coli* (ATCC25922) a été utilisée en tant que contrôle positif et *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) en tant que contrôle négatif.

La production de beta-galactosidase a été mesurée selon l'équation (2).

$$\text{Miller Units} = 1000 \times [(OD_{420} - 1.75 \times OD_{550})] / (T \times V \times OD_{600}) \dots\dots\dots (2)$$

2.5.4. Dégradation de gliadine en solution

L'hydrolyse de la gliadine par les bactéries sélectionnées a été effectuée par l'utilisation de la gliadine comme seule source d'azote. Deux différents milieux ont été utilisés ; une avec de la gliadine traitée à l'acide et une autre avec de la gliadine non traitée.

Milieu 1 Solution de la gliadine hydrolysée à l'acide : cette solution a été préparée suivant la méthode d'(Alvarez-Sieiro et al. 2015). En effet, la gliadine a été dissoute dans 3ml de 2.5N HCl (pH2) à une concentration de 100mg/ml et incubée à température ambiante pendant une heure avec des agitations occasionnelles. Le pH a été ajusté à 6.5 avec de NaOH (2N) suivie par l'ajout de l'éthanol (60%) jusqu'à une concentration de 15mg/ml. La solution a été incubée sous agitation de 250 rpm à 37°C pendant une heure. Enfin, 20 ml de cette solution a été ajouté à une solution stérile de sels minéraux (Alvarez-Sieiro et al. 2015).

Milieu 2 Solution de la gliadine non hydrolysée à l'acide : le mélange de la gliadine a été dissout dans de l'éthanol (60%) à une concentration de 5mg/ml, puis, cette dernière a été ajoutée à la solution bactérienne jusqu'à l'obtention d'une concentration de 250 mg/ml (Zamakhchari et al. 2011).

Un millilitre de chaque solution bactérienne (10⁶cellules/ml) a été inoculé dans les deux différents milieux. Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 48h, où des prélèvements ont été effectués après 0h, 6h, 24h et 48h et séchés à l'aide d'un évaporateur d'azote. *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) ont été utilisés en tant que contrôle positif et *E. coli* (ATCC25922) en tant que contrôle négatif.

Pour évaluer la dégradation de la gliadine en solution, la technique d'électrophorèse décrite par (Laemmli 1970) a été utilisée. La séparation a été faite par un mini SDS-Page (Bio-Rad Laboratoires GmbH, Munich, Germany), sur gel vertical en système discontinu en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) et des conditions réductrices. Ces dernières ont été assurées par l'utilisation du β-mercaptoéthanol dans le but de rompre les ponts disulfures,

Matériel et méthodes

tandis que le SDS est utilisé pour casser les liaisons faibles. Cette opération a permis d'aboutir à la formation d'un complexe SDS- protéine dénaturée et en conséquence une séparation selon la taille, la conformation et la masse moléculaire.

Préparation des gels

Deux types de gel ont été utilisés : **1)** Gel de concentration (10%) (stacking gel) afin de tasser les protéines avant leur entrée dans le gel de séparation, **2)** Gel de séparation (13%) utilisé dans le but de permettre la séparation des gliadines selon leur poids moléculaire.

Ces deux gels ont été préparés à base d'acrylamide/N, N'-méthylène bis-acrylamide à 30 % (p/v), du SDS à 10% (p/v) et de Tris-HCl 1.5 M (à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration) (annexe 3).

La polymérisation des gels a été réalisée en présence de catalyseurs, le TEMED et de l'APS.

Le gel de séparation est le premier à préparer et à couler dans la cassette (deux plaques de verre verticales) puis recouvert par l'eau distillée pour le protéger de l'air. Après la polymérisation du gel de séparation à une température ambiante, le gel de concentration est préparé et coulé au-dessus du gel de séparation après avoir éliminé la couche d'eau, puis des peignes sont délicatement insérés.

Après polymérisation du gel de concentration, les peignes ont été retirés soigneusement et le tampon de migration a été versé. Enfin, le dépôt des échantillons a été procédé par l'ajout de 5 μ l d'échantillon par puis.

Le gel a été soumis à 150V pendant 30 à 45 min. Les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont séparées selon leur encombrement moléculaire.

La fixation des protéines a été faite dans une solution TCA (Trichloroacetic acid) à 10% (annexe 3), sous agitation pendant une heure.

Les gels sont recouverts de solution de coloration contenant le bleu de Coomassie R-250 à 0.25% (p/v), 50ml d'acide acétique et 250 ml de méthanol, puis placés en agitation pendant 24h. Les gels sont, ensuite, décolorés par 50ml d'acide acétique et 250 ml de méthanol

2.5.5. Dégradation de la gliadine sur gel

Les gliadinasés peuvent être révélées par zymographie de gliadine. Le principe de cette dernière est d'ajouter le substrat (gliadine) au gel d'électrophorèse avant sa polymérisation.

Matériel et méthodes

La zymographie de la gliadine a été effectuée selon la méthode (Fernandez-Feo et al. 2013) en utilisant un gel vertical de 8% polyacrylamide (annexe 3) en conditions non dénaturantes.

Les échantillons préalablement dilués dans le tampon non réducteur de zymographie 1X (loading buffer) (4 % SDS, 20 % glycérol, 125 mM Tris-HCl, 0.01% Bleu de Bromophénol) sont déposés sur gels. Les conditions de migration des échantillons sont identiques à celles utilisées pour les gels d'électrophorèse SDS-PAGE.

La renaturation du gel a été faite dans une solution de 50mM Tris-HCl et 2.5 Triton X-100 pendant une heure. Puis, le gel a été rincé plusieurs fois avec la solution de rinçage (annexe 3). Le gel a été placé dans une solution d'incubation à Triton 1 % X-100 (annexe 3) pendant 48h à 37°C. Après incubation, la coloration et la décoloration ont été faites de la manière similaire à celle utilisée avec SDS-PAGE. Après observation des bandes blanches, le gel a été placé dans de l'eau distillée pour arrêter la décoloration.

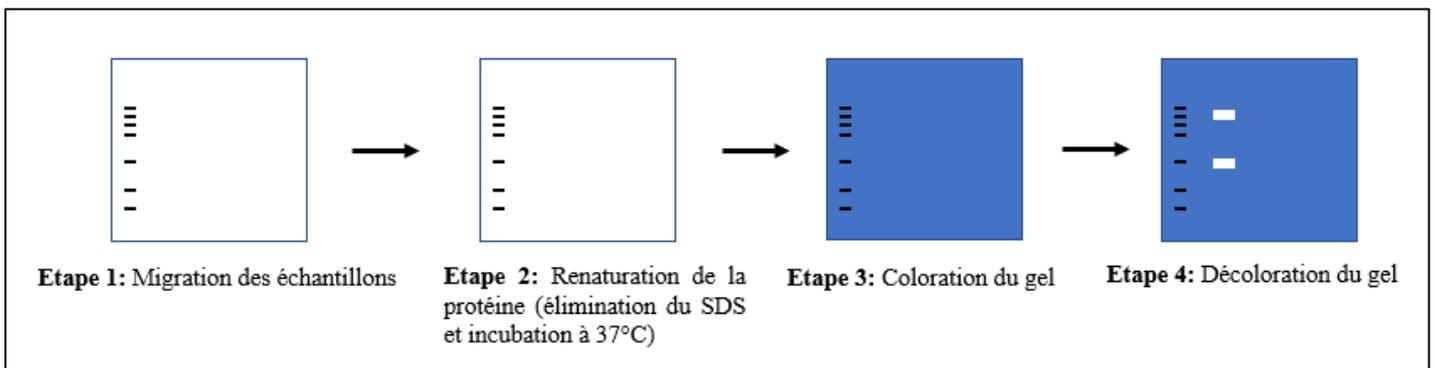


Figure 13 Schéma des principales étapes de zymographie

2.5.6. Mise en évidence de l'Activité enzymatique de la protéase

L'activité enzymatique de la protéase extracellulaire des isolats sélectionnés a été déterminée par encensement de ces derniers sur gélose au lait (1% w/v). Les cultures ont été incubées à 37 °C pendant 48h. Les colonies entourées par une zone claire indiquent une activité protéolytique extracellulaire positive (Abdelmoteleb et al. 2017).

2.6. Evaluation *in vitro* de quelques aptitudes probiotiques des isolats

2.6.1. Aptitude à survivre dans des conditions gastriques simulées

Les isolats sélectionnés ont été testés vis-à-vis de l'effet du pH bas seul et vis-à-vis des conditions gastriques simulées. L'effet du pH 1,5, à lui seul, sur les formes végétatives desdits isolats a été examiné après 2 h d'exposition. Tandis que, l'exposition prolongée des mêmes isolats à des conditions similaires à celles de l'estomac a été effectuée selon la technique

Matériel et méthodes

décrite par (Duc et al. 2003) avec légères modifications. En effet, un millilitre de chaque culture bactérienne (10^9 cellules) a été inoculé dans 9ml du jus gastrique simulé (3g/l of pepsine (1 :3000 (from hog stomach) ; BIOCHEM ; pH 1. 5) et incubé à 37°C pendant 3h. Ensuite, 0,1 ml de chaque solution a été prélevé après 0 h et 2 h d'exposition, ensemencé sur gélose TSA et incubée à 37°C pendant 24 à 48 h. Le nombre de CFU a été déterminé. L'expérience a été répétée trois fois.

2.6.2. Aptitude des isolats à survivre dans des conditions intestinales simulées

Pour déterminer la tolérance des souches sélectionnées au fluide intestinal, la technique de Huang et Adams (2004) a été appliquée. Un millilitre de chaque culture bactérienne (10^9 cellules) a été inoculé dans 9 ml de jus intestinal simulé (solution de NaCl à 0.5%(P/V) contenant 1g/l de pancréatine (porcine pancréas ; Sigma Aldrich) et 1% de sels biliaires (Ox-bile, Sigma Aldrich) ; pH 8), puis, incubé à 37°C pendant 4h. Un volume de 0.1 ml a été pris à 0h et à 4h, ensemencé sur gélose TSA et incubés à 37°C pendant 24 à 48 h. Le nombre de CFU a été déterminé. La tolérance aux sels biliaires seuls a été aussi testée selon la même méthode.

La tolérance au pH, aux sels biliaires et la survie aux conditions gastro-intestinales ont été calculés comme un pourcentage de UFC et comparé à UFC initiale (dans des conditions de culture ordinaires).

2.6.3. Propriétés de surface et adhérence cellulaire

2.6.3.1. Adhérence aux solvants

Pour étudier l'hydrophobicité de la surface cellulaire, l'adhérence bactérienne aux solvants (Bacterial adhesion to solvents ou BATS) a été mesurée selon la méthode décrite par Bellon-Fontaine, Rault, et Van Oss (1996), avec légères modifications. Deux solvants ont été utilisés en l'occurrence ; Xylène et chloroforme, l'adhérence au xylène (solvant apolaire) reflète de l'hydrophobicité des isolats testés tandis que, le chloroforme (solvant acide polaire) renseigne sur les caractéristiques de donneurs d'électrons (Bellon-Fontaine et al. 1996).

Pour ce faire, les cellules bactériennes ont été collectées par centrifugation (5000rpm pendant 15min) à partir des cultures d'une nuit, lavées deux fois et re-suspendues dans 3 ml de PBS (concentration cellulaire finale de 10^8 UFC/ml). L'absorbance de la suspension a été mesurée à 600 nm (A_0). Un millilitre du solvant a été ajouté au 3 ml de la suspension bactérienne, vortexé et incubé à 37°C pendant 10 min. Après séparation des deux phases, la phase aqueuse a été retirée et l'absorbance a été mesuré à 600 nm (A_1).

L'adhérence au solvant est calculée par l'équation (1) :

$$BATS \% = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100 \dots\dots\dots(1)$$

2.6.3.2. Détermination de l'Auto-agrégation chez les isolats sélectionnés

L'auto-agrégation bactérienne a été mesurée selon la technique décrite par (Del Re et al. 2000), avec légères modifications. Les cellules bactériennes ont été collectées par centrifugation (6000rpm pendant 10min) à partir des cultures d'une nuit, lavées deux fois et re-suspendues dans du PBS et ajusté à une concentration de 0.5 ± 0.02 à une longueur d'onde (OD) ($A=600\text{nm}$) (A_{0h}). Deux millilitres de chaque suspension ont été vortexés pendant 10 secondes et incubés à 37°C pendant 3h. Après incubation, le surnageant a été récupéré et une mesure d'absorbance a été effectuée à 600nm (A_{3h}).

Le pourcentage d'auto-agrégation a été exprimé selon l'équation (2)

$$\text{Auto - agrégation (\%)} = 1 - \left(\frac{A_{3h}}{A_{0h}}\right) \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

2.6.3.3. Détermination de la Co-agrégation chez les isolats sélectionnés

La mesure de la co-agrégation a été effectuée selon la méthode décrite par Xu et al. (2009), des volumes de culture identiques de chaque isolat sélectionné et de souches pathogènes (*E. coli* et *S. aureus*) ont été mélangés et incubés à 37°C pendant 2h. Le surnageant a été récupéré et l'absorbance a été mesuré à 600nm .

Le pourcentage de co-agrégation a été exprimé selon l'équation (3)

$$\text{Co-agrégation (\%)} = [1 - A_{\text{mix}} / (A_{\text{probiotic}} + A_{\text{pathogen}}) / 2] * 100 \dots\dots\dots(3)$$

2.7. Analyse statistique

Tous les résultats sont les moyennes de trois différentes expériences indépendantes. L'analyse de la variance univariée (ANOVA) a été utilisé pour comparer entre les moyennes à l'aide du software SPSS (version 12.0; SPSS Inc., Chicago, USA). Le calcul de différence significative entre les moyennes a été effectué en utilisant le test Duncan pour $p < 0.05$ considéré statistiquement significatif.

2.8. Méthodes moléculaires

2.8.1. Hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) est une technique de biologie moléculaire d'hybridation *in situ* qui consiste à analyser des coupes en microscopie et en imagerie moléculaire en recourant à des sondes disposant d'un marqueur fluorescent (Gozzetti and Le Beau 2000).

La FISH a été réalisée selon le protocole de Amann (1995). Des cultures pures, au moment de la phase exponentielle ont été centrifugées. Le culot a été diluée dans un tampon 1X PBS précédé par une fixation à l'éthanol glacial (1V/V). Un traitement enzymatique selon le protocole de Meier et al., (1999) a été effectué sur le mélange préparé. Deux types d'enzymes ; Lysozyme (10 mg/ml, 100000 U/mg, Fluka) et Achromopeptidase (2 mg/ml, 100000 U/mg, Sigma-Aldrich) ont été ajouté aux solutions bactériennes et incubé à 37°C pendant 30 min. Pour confirmer la position phylogénétique et l'appartenance des souches au *Bacillales* sous les *Firmicutes* ; les sondes oligonucléotidique EUB 338, LGC 354A a LGC 354B et LGC 354C sous une concentration de 35 % du formamide ont été utilisés. Les échantillons traités ont été visualisés avec une microscopie à fluorescence Leica (Zeiss – Axioplan 2 imaging).

2.8.2. Identification moléculaire des isolats sélectionnés

L'appartenance des isolats du genre *Bacillus* a été préalablement indiquée lors du traitement thermique des échantillons. Cet état a été confirmé par d'autres tests préliminaires en l'occurrence : l'aspect microscopique, la coloration de Gram, le test oxydase, le test catalase et la coloration des spores avec du vert de Malachite (Harwood 1989). L'identification moléculaire des bactéries isolées a été effectuée au niveau du Laboratoire de Microbiologie, Géoécologie et Astrobiologie (Université d'Umeå, Suède). Cette dernière a été réalisée par des analyses d'*ADN-16S* ; par extraction de l'ADN, l'amplification par PCR, séquençage du gène et enfin par un traitement informatique.

2.8.2.1. Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN génomique à partir des cultures pures (au moment de la phase exponentielle) a été réalisé selon le protocole décrit par (Griffiths et al. 2000) avec quelques modifications :

Deux millilitres de chaque culture bactérienne est d'abord centrifugé à 15.000 rpm pendant 2 minutes et le surnageant obtenu est éliminé. Ensuite, le culot cellulaire récupéré est suspendu dans 800µl du tampon d'extraction (CTAB), par la suite, 10 µl de lysozyme et 30µl d'achromopeptidase ont été rajouté, et la solution obtenue est incubé à 37°C pendant 30min. Puis, 80 µl de SDS à 25%(p/v) ont été ajouté à la solution et incubé à 65°C pendant 30min, suivi par deux cycles de (15 sec, 4.0 m/s) avec billes d'agitation (Nordic Biolabs). Les protéines sont éliminées par un traitement au Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique par l'ajout de 400 µl de ce dernier, suivi par une agitation et une centrifugation à 13000rpm pendant 15min. 400µl de CHISAM ont été ajouté au surnageant obtenu, homogénéisé et

centrifugé à 15000 pendant 5 min. La phase supérieure aqueuse est récupérée par le transfert du surnageant dans un tube Eppendorf propre. L'étape de lavage par CHISAM est répétée jusqu'à disparition de couches de protéines. La précipitation de l'ADN a été effectuée par l'ajout de 90µl d'acétate de sodium 3M pour chaque 1ml de solution, et 600 µl de cold isopropanol (pour ne pas précipiter les polysaccharides) pour chaque 3ml de solution. Cette solution a été ensuite incubée à température ambiante pendant une nuit. Puis centrifugé à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant obtenu a été éliminé, le culot a été lavé par de l'éthanol 70%, ensuite, la préparation a été centrifugée à 13.000 pendant 2 minutes, le surnageant a été éliminé et le culot a été séché (tube ouvert). Enfin, l'ADN extrait est réhydraté dans 30 µl d'eau MilliQ pendant une heure, à 4°C pendant une nuit.

La concentration de l'ADN a été mesurée par l'appareil du nanoDrop (Thermo Fisher Scientific), tandis que la pureté a été évaluée sur gel d'électrophorèse en comparant avec les marqueurs de tailles 1KB+ (Thermo Fisher Scientific).

2.8.2.2. Amplification des gènes étudiés par PCR

L'amplification des gènes étudiés a été réalisée par utilisation des amorces 8F-1492R (8F, 5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ; 1492R, 5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3') pour amplifier l'*ADN-16S* (LANE 1991). La réaction a été faite dans un volume de 25 µl du mélange suivant : 5µl Taq buffer 10X (Thermo Fisher scientific), 0.5µl solution des différents désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) (10 mM) 10M-DNTP, 1.25 µl 8F, 1.25 µl 1492R, 14.75µl H₂O ultra pur, 0.25µl ADN polymérase haute-fidélité Phusion (Thermo Fisher scientific). Dans un premier temps un mélange ou mix est réalisé pour un nombre n de tubes, puis réparti à raison de 23 µl/tube. L'ADN (2 µl) est ajouté en dernier au mélange réactionnel.

La réaction d'amplification proprement dite est effectuée grâce à différents cycles de température réalisés sur un thermocycleur (BioRAD-T100). Le programme PCR, utilisé pour l'amplification de l'*ADN-16S* est le suivant : une étape initiale de dénaturation à 98°C pendant 1 min suivi par 35 cycles de dénaturation de 10s à 98°C, hybridation des amorces 15s à 55°C et extension ou polymérisation à 72°C pendant 1 minute.

2.8.2.3. Purification des produits de PCR

Les produits de PCR ont été purifiés par le kit (QIAquick, QIAGEN) suivant les instructions mentionnées. 5V de buffer PB « capture buffer type 2 » mélanger avec 1V de produit de PCR et homogénéiser. Le mélange est mis dans la petite colonne du kit est placé au colonne QIAquick et placé dans un tube Eppendorf de 2ml, centrifugée à 13.000 rpm pendant 30s à 60s et le surnageant obtenu est éliminé. 750 µl du Tampon PE « washing buffer » sont

Matériel et méthodes

rajoutés à la même colonne, centrifugés à 13.000 rpm pendant 30s à 60s et le surnageant obtenu est jeté. La centrifugation a été répétée pour assurer l'élimination de toute la solution. Ensuite la colonne est transférée dans un nouvel Eppendorf et 50 µl du tampon d'éluion (EB) « Elution buffer » ont été rajoutés à la colonne et centrifugés à 13.000 rpm pendant une minute et le surnageant contenant l'ADN purifié a été récupéré.

Tableau 5. Réactifs utilisés pour la réaction PCR

Réactifs	Réaction de 50 µl	Concentration finale
5X Tampon Phusion	10 µl	
10 mM dNTPs	1 µl	1X
10 µM Forward primer	2.5 µl	200 µM
10 µM Reverse primer	2.5 µl	0.5 µM
Template DNA	4 µl	0.5 µM
ADN polymérase	0.5 µl	<250 ng
H2O Milli-Q (Nucléase-free-water)	Jusqu'à 50 µl	1.0 units/50 µl PCR
V total (µl)	50 µl	

1X : concentration une fois, dNTPs : nucléotides, mM : millimolaire, µM : micromolaire, U/µl : Unité par microlitre.

Tableau 6 Programme d'amplification du gène ADNr 16S sur thermocycleur

Etape	Temps et température	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation préliminaire	98°C	30 secondes	1 cycle
Dénaturation	98°C	5-10 secondes	35 cycles
Hybridation	45-72°C	10-30 secondes	
Elongation	72°C	15-30 secondes	
Elongation finale	72°C	5-10 minutes	
Refroidissement	4°C		1 cycle

2.8.3.4. Electrophorèse des acides nucléiques

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse (BioRAD) sur un gel horizontal d'agarose à 1% additionné de bromure d'éthidium.

Les bandes amplifiées sont visualisées sous UV. La taille des différents fragments est déterminée à l'aide de marqueurs de poids moléculaire (1kb plus, Thermo Fisher Scientific) et analysé par le software Quantity one Bio-rad.

2.8.3.5. Séquençage des gènes amplifiés et traitement des séquences

Le séquençage des gènes étudiés a été réalisé à Eurofins Genomics (<https://eurofinsgenomics.eu/>) en utilisant les mêmes amorces décrites ci-dessus.

L'analyse phylogénétique consistait à évaluer les divergences entre plusieurs séquences ; la comparaison des séquences avec celles de base de données a été réalisée via Arb Silva (<http://www.arb-silva.de/>); (Pruesse et al. 2007). Les alignements des séquences nucléotidiques (longueur minimale >1000nuc.) ont été réalisés grâce au logiciel *Arb software package* (Ludwig et al. 2004) en comparant les régions sélectionnées des séquences de gènes cibles avec des positions d'alignement provenant de plusieurs ensembles de données, et l'alignement résultant a été manuellement raffiné. Une phylogénie générale a été reconstruite à l'aide de la méthode neighbour-joining distance, suivie d'analyses plus fines pour reconstruire les phylogénies à l'aide de méthode de « distance », « maximum parsimony » et « randomized(x) accelerated maximum likelihood » (Stamatakis et al. 2005). Ainsi, l'identité de chaque souche bactérienne a été déterminée et représentée dans un arbre phylogénétique.

Les séquences ont été déposées à la banque de donnée NCBI et des numéros d'accèsion ont été octroyés et résumés dans le chapitre résultats.

Les souches sectionnées ont été déposées à German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH(DSMZ) ; et les codes obtenus sont résumés dans le chapitre résultats.

Les méthodes utilisées dans ce chapitre sont résumées dans la figure 14.

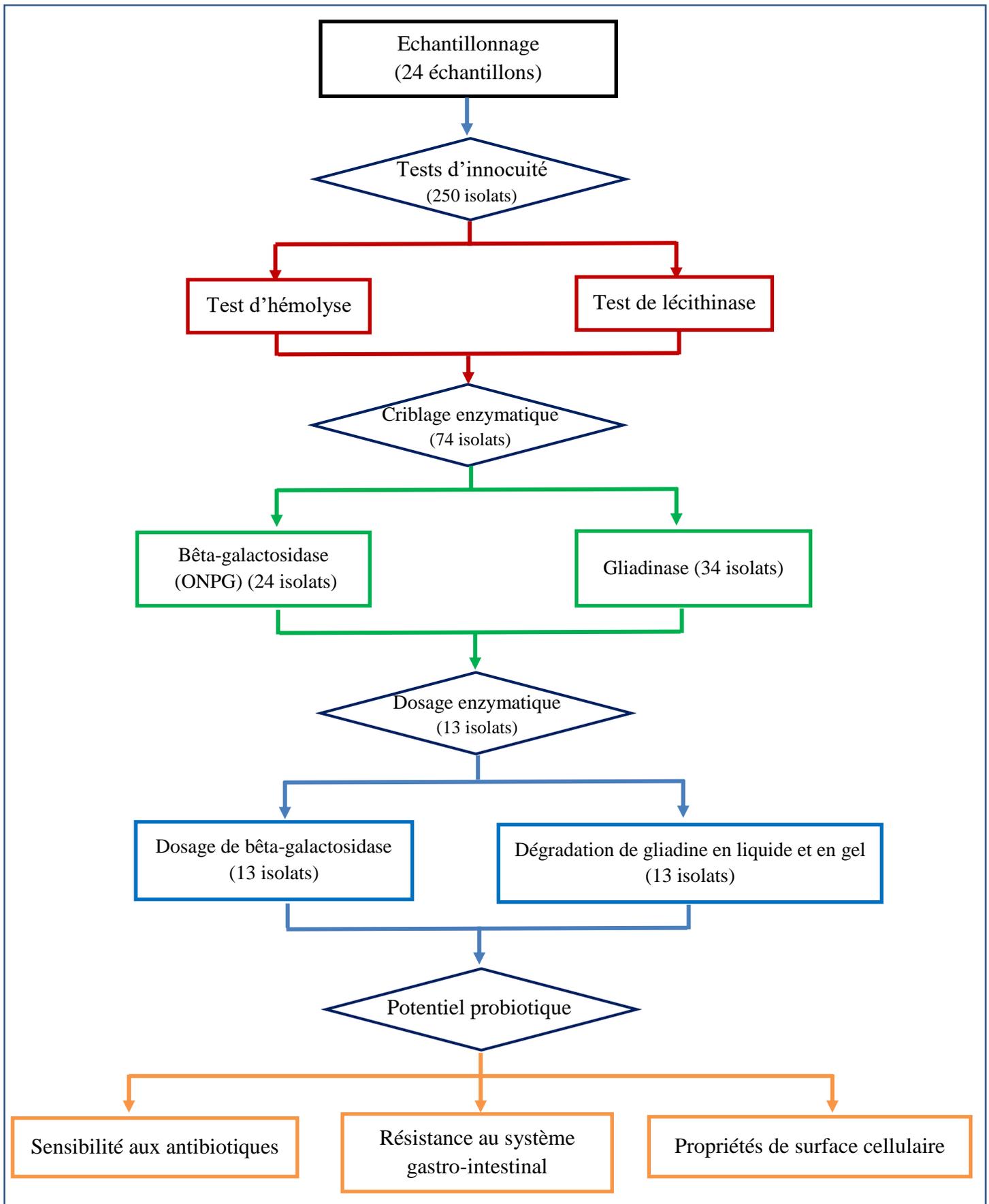


Figure 14 Résumé des méthodes utilisées dans matériel et méthodes

RÉSULTATS

3. Résultats

Le présent travail porte sur l'isolement, à partir des différentes grottes Algériennes, et la sélection des bactéries sporulantes avec de potentialités probiotiques et enzymatiques.

3.1. Etude des paramètres physico-chimiques des grottes

Pour rappel, 24 sédiments de grottes ont été collectés à partir de différentes régions Algériennes. L'analyse des échantillons concernait ; la matière organique, le pH, le calcaire total, la température et l'humidité. Les résultats de l'analyse des paramètres physico-chimiques des échantillons et leurs lieux de prélèvement sont récapitulés dans le tableau 7. Ces résultats montrent une température maximale de 25°C et minimale de 3.2°C, un pH neutre à basique pour toutes les grottes et une humidité variante entre 42% et 99%. En outre, il est révélé que la plupart des échantillons prélevés de toutes les grottes ont montré un profil oligotrophe en particulier ceux des grottes ; Blanche, Boussouil, Ghar Djemaa, Mchounech et Youkkes.

3.2. Isolement et purification des bactéries sporulées

À partir de 24 échantillons de grottes libellées ; BM1, BM2, BMS1, BMS2, BOA1, BOA2, BOB21, BOB2, BOC1, BOC2, CAS2, CAS1, GD1, GD2, GI, GII, TEB1, TEB2, PR1, PR2, SI, SII, BL1, et BL2, 250 isolats ont été obtenus et résumés dans le Tableau 7.

Afin de les différencier, chaque isolat a été désigné par un code composé d'une ou de deux lettres et un chiffre, exemple : A1, BS14.

Après purification, la totalité des isolats ont été retenus et considérés comme de bactéries pures et sporulantes.

3.3. Evaluation préliminaire de l'aspect sécuritaire des isolats

L'étude de l'innocuité, informant de l'aspect sécuritaire des isolats, a permis de sélectionner 74 d'entre eux, qui développaient une activité γ -hémolytique positive et un lécithinase négatif (figures 15- 17). Ces résultats permettent, *a priori*, de se prononcer quant à l'aspect *safety assessment*.

3.4. Sélection des isolats à potentialités enzymatiques

Ce test avait comme objectif de s'informer de l'aptitude des isolats à dégrader les substrats considérés comme responsables des maladies métaboliques liées à l'intolérance au gluten et au lactose. En effet, un nombre de 34 isolats ont montré une formation d'un halo

transparent autour des colonies ce qui renseigne d'une activité gliadinase positive (figure 18) d'une part. D'autre part, un nombre de 24 isolats sont considérés comme étant isolats à activité bêta-galactosidase positive, révélée par la formation des colonies bleues. Cette couleur reflète la présence de bêta-galactosidase extra ou intra-cellulaire (figure 19). A partir de ces isolats, treize ont été sélectionnés pour leurs capacités d'hydrolyser les deux substrats test en l'occurrence ; la gliadine et le lactose.

3.5. Dosage enzymatique de bêta-galactosidase

Le dosage enzymatique de bêta-galactosidase permettra de connaître les potentialités de ces isolats à dégrader le lactose en solution. À partir des treize isolats sectionnés, un nombre de quatre isolats (BS13, BS14, J4 et A9) ont montré une activité considérable d'ONPG (figure 20). En effet, l'isolat BS13 a produit la plus grande quantité de bêta-galactosidase (429.5 MU, Unités de Miller), pendant que les autres isolats ont produit des quantités, plus au moins, moindres à savoir les isolats : BS14 (317.81 MU), J4 (224.5 MU) et A9 (181.25 MU). Les autres isolats ont, soit enregistré une absence de bêta-galactosidase, soit une quantité très faible de cette dernière (tableau 8).

3.6. Dégradation de gliadine en solution

Pour évaluer les potentialités de dégradation de ses isolats en solution ce test a été réalisé. Tous les treize isolats ont montré différents taux de dégradation de gliadine avec un profil similaire dans deux différents milieux de culture ; avec une dégradation considérable de ω gliadines (entre ~50~100 kDa), et une remarquable dégradation de α -, β -, et γ -gliadines (allant de ~30 jusqu'à ~50 kDa)(figure 21).

3.7. Dégradation de la gliadine sur gel

Pour confirmer la possibilité des isolats sélectionnés à dégrader la gliadine, une zymographie a été effectuée. Pour tous les treize isolats, *in gel*, la zymographie a révélé des bandes claires avec de différentes intensités présentant des gliadinases entre la région de 15 kDa à ~50 kDa (une large gamme de poids moléculaire) (figure 22). Selon Alvarez-Sieiro *et al.*, (2015), les zones claires montrent soit, une forte activité enzymatique soit, la présence de diverses enzymes avec de poids moléculaire similaire.

Tableau 7 Résultats des paramètres physico-chimiques des sédiments de grottes

Codes des grottes	Macro-biodiversité observée	Codes des échantillons	Profondeur des prélèvements (m)	Distance d'échantillonnage à partir de l'entrée NB : tous les échantillons ont été prélevés à partir de la zone sombre des grottes	pH	Matière organique (%)	Calcaire total (%)	Température (°C)	Humidité (%)
AS1	Araignée	GI, GII	-10m	15m	8,6 ± 0,02	1,56 ± 0,98	90	13	60.0
AS2	Araignée	SI, SII	-10m	20m	7,7 ± 0,02	0,83 ± 0,18	100	14	61.0
BL	-	BL1, BL2	-10m	48m	9,3 ± 0,00	0,46 ± 0,25	100	13	61.3
BOU	-	TEB1, TEB2	-50	27m	7,1 ± 0,01	0,37 ± 0,31	80	10	72.2
ANOU	Présence de d'insectes non-identifiés	BOA1, BOA2,	-50m	NI	8,0 ± 0,02	0.00	80	7.3	99.99
		BOB1, BOB2,	-100m	NI	7,15 ± 0,03	0.00	80	4.5	99.99
		BOC1, BOC2	-450m	NI	6,91 ± 0,03	0.00	80	3.2	99.99
GD	Présence de chauves-souris Papillons de nuit	GD1, GD2	-	45m	7,5 ± 0,00	2,12 ± 0,31	10	13.5	84.0
GG	Papillons de nuit	CAS2, CAS1	-	68m	8,3 ± 0,00	0,18 ± 0,12	0	14.1	73.3
MB1	Présence de reptiles	BM1, BM1	-	9m	8,1 ± 0,00	0,09 ± 0,06	40	23	43.2
MB2	Présence de reptiles	BMS1, BMS2	-	11m	7,4 ± 0,12	0.00	60	25	42.2
PR	Présence de chauves-souris	PR1, PR2	-	39m	8,0 ± 0,00	4,69 ± 0,18	40	19	63.3

Tous les résultats sont exprimés en moyenne, ± écart-type (n=3)

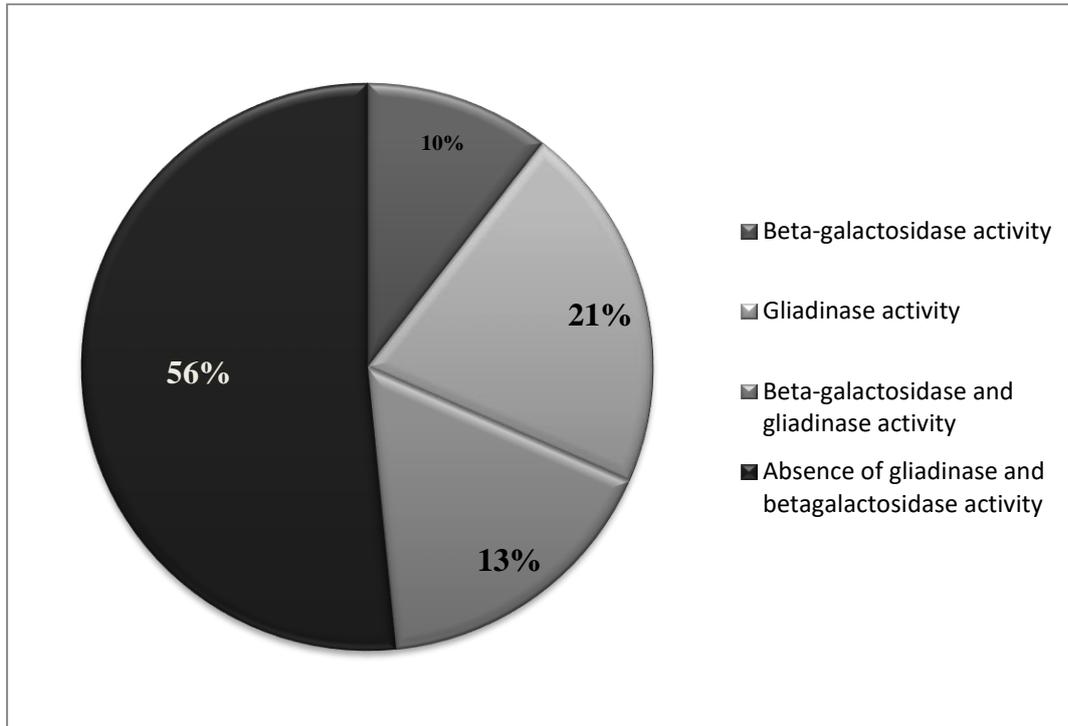


Figure 15 Résultats de test de sélection de l'activité enzymatique des 250 isolats (en %)

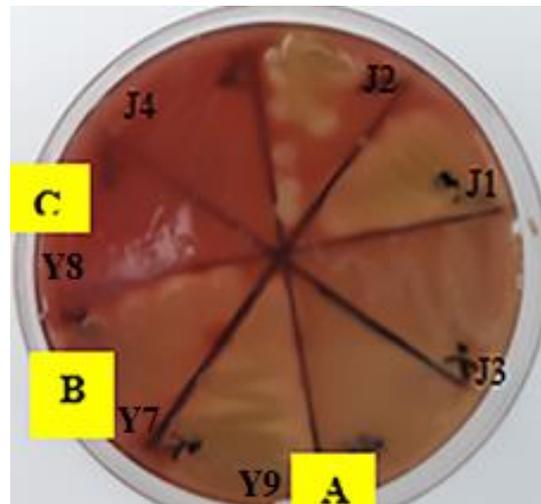


Figure 16 Révélation de l'activité hémolytique pour les isolats ; J1, J2, J3, J4, Y7, Y8 et Y9, développant des zones d'hémolyse ; A : α -hémolyse (coloration verdâtre, isolat Y9), B : β -hémolyse (zone transparente, isolat Y7) et C : γ -hémolyse (pas de réaction, isolat Y8).

Résultats

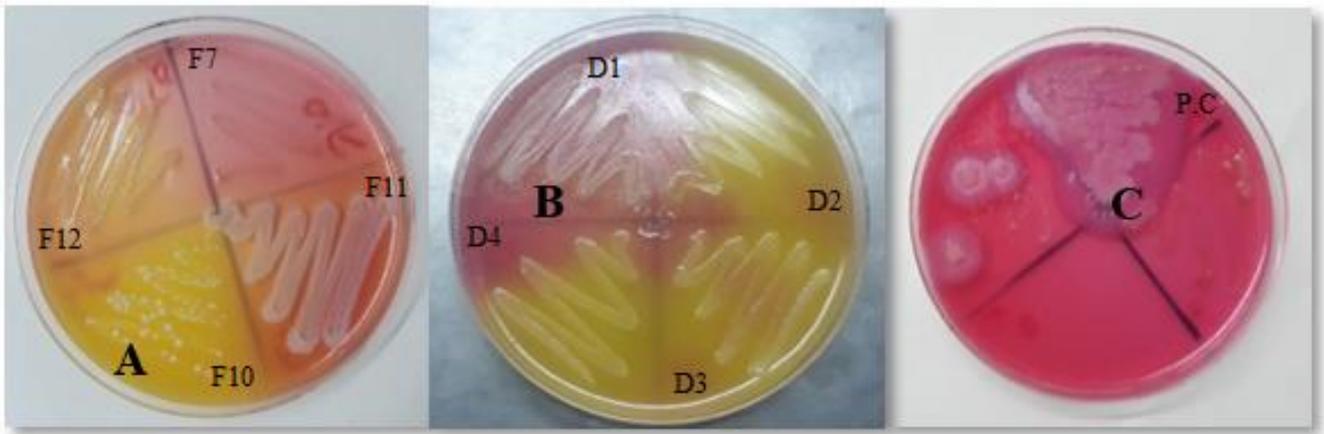


Figure 17 Résultats de test lécithinase sur 9 isolats (F7, F10, F11, F12, D1, D2, D3, D4 et P.C); A: Coloration demeure jaune: pas de réaction (lécithinase négatif, isolats F10), B: Coloration rose avec un halo autour de la colonie (lécithinase positif, isolat D1), P.C: Control Positif : *B. cereus*, coloration rose avec halo autour de la colonie.



Figure 18 Exemple de test de sélection des isolats à activité gliadinase sur 7 isolats (BS14, D7, F10, J4, Y4, Y5, Y6). A: pas de dégradation de gliadine (isolat Y5), B: halo transparent autour des colonies (les isolats BS14, D7, J4 et F10) montrant une dégradation de la gliadine.

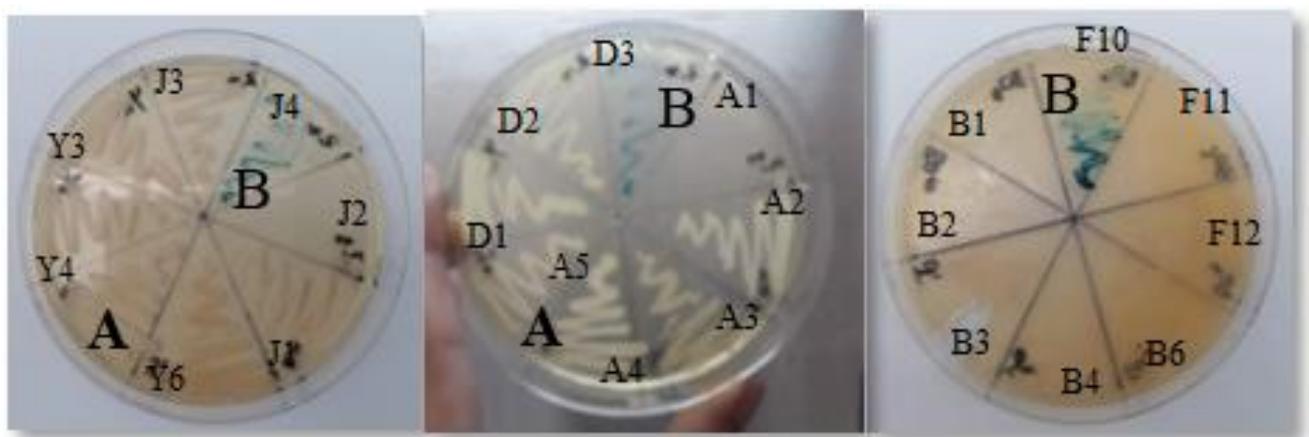


Figure 19 Exemple de test de sélection des isolats à activité bêta-galactosidase sur 23 isolats (J1, J2, J3, J4, Y3, Y4, Y6, A1, A2, A3, A4, A5, D1, D2, D3, B1, B2, B3, B4, B6, F10, F11 et F12); A: Pas de production de bêta-galactosidase, B: Coloration des colonies en bleu : production de bêta-galactosidase (les isolats J4, D3 et F10).

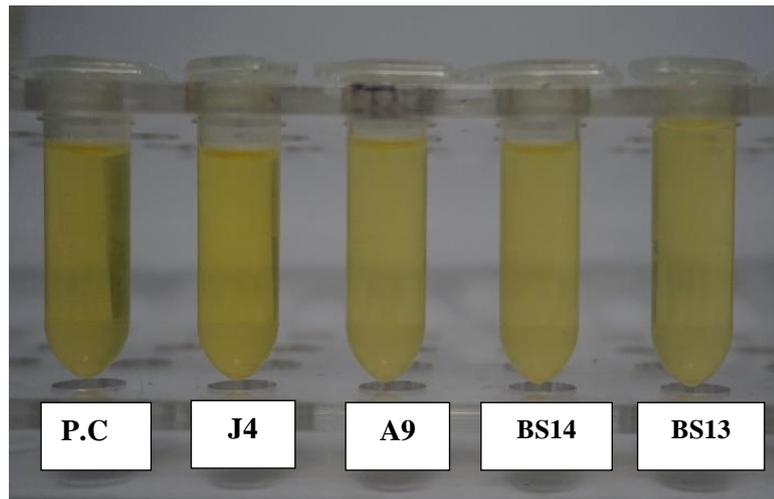


Figure 20 Exemples de résultats positifs du dosage de bêta-galactosidase (les isolats J4, A9, BS14 et BS13). P.C: Control positif (*E. coli* (ATCC25922)).

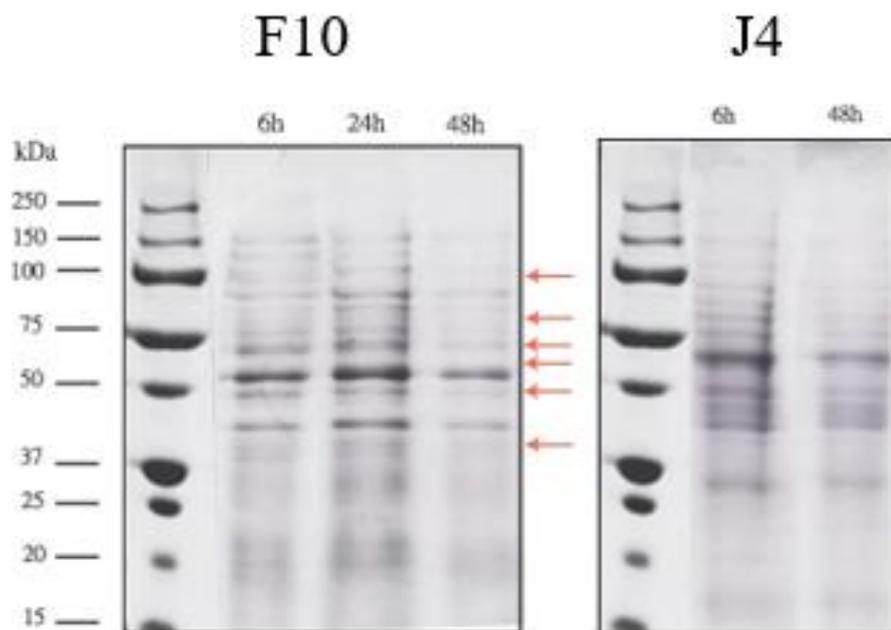


Figure 21 Exemples des profils de SDS-PAGE de dégradation de gliadine des isolats F10 et J4. La gliadine présente la seule source d'azote dans le milieu. L'intensité des bandes entre ~30 à ~50 (représentant α -, β -, et γ -gliadines) a diminué considérablement, d'autre part, une dégradation plutôt basse entre le poids moléculaire de ~50~100 (présentant les ω gliadines) a été noté. L'isolat (Y5) qui n'a pas montré une capacité à dégrader la gliadine sur boîte a été utilisée entant que control négatif.

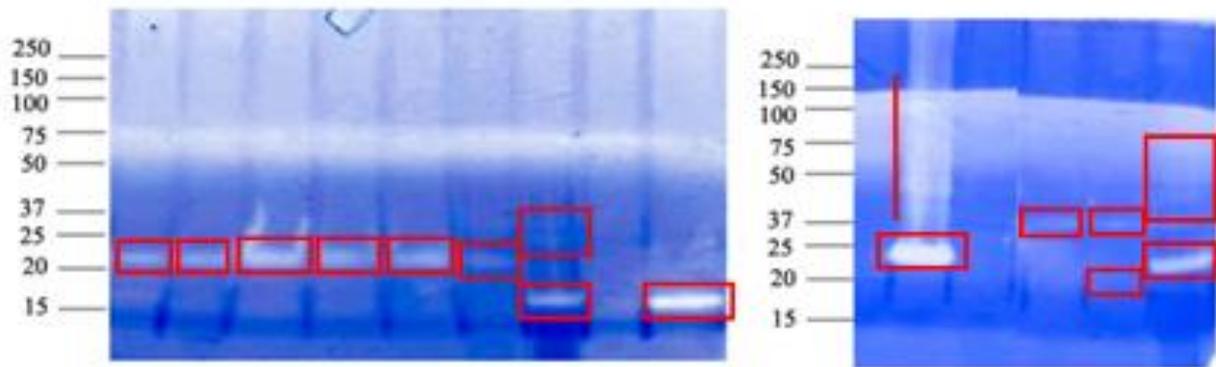


Figure 22 Zymogramme de Gliadine pour les isolats (A8, A9, F9, F10, Dj16, Dj17, D3, BS13, BS14, BS16, J4, SSI5, T1 and Y5). Le gel contient la gliadine comme substrat. L'hydrolyse a été observée par la présence de bandes transparentes après coloration par Coomassie brillant. Les lignes vertical présentent des zones transparentes où des bandes transparentes individuelles sont absentes.

3.8. Evaluation de quelques aptitudes probiotiques *in vitro*

3.8.1. Susceptibilité aux antibiotiques

Pour pouvoir identifier la sensibilité des isolats sélectionnés aux antibiotiques, un antibiogramme a été effectué pour chaque isolat. La résistance des isolats sélectionnés aux onze antibiotiques a été évalué par la méthode de diffusion sur gélose selon les recommandations de EFSA (EFSA 2014). Tous les isolats sélectionnés, excepté l'isolat Dj16 ont montré une sensibilité à l'Imipenème (10 µg) et au Ciprofloxacine (1 µg). Six isolats (F10, Dj16, Dj17, BS16, SSI5, et J4) étaient résistants au Vancomycine (5 µg) (tableau 9).

3.8.2. Aptitude des isolats sélectionnés à survivre dans les conditions gastro-intestinales simulées

Une des propriétés les plus importantes des probiotique est leur possibilité à résister aux conditions gastro-intestinales. Neuf isolats (A8, A9, F10, D3, BS13, BS14, BS16, J4, SSI5) des isolats sélectionnés ont montré un taux de survie élevé aux conditions gastriques simulées (99-100%). L'isolat Dj16 a montré un taux de viabilité insignifiant ($p= 0.05$) et considéré comme la plus faible viabilité dans des conditions de pH acide, et lorsque l'isolat se trouve dans le jus gastrique simulé, aucune viabilité n'a été enregistrée (tableau10).

Tous les isolats à excepté l'isolat A9, ont présenté de différentes capacités de résistance aux sels biliaires et au flux intestinal simulé, avec des taux de survie entre situés entre 83.51 % et 100% (tableau11).

3.8.3. Propriétés de surface et adhérence cellulaire

3.8.3.1. Auto-agrégation et Co-agrégation

L'auto-agrégation et la co-agrégation ont été étudiées en tant qu'indicateurs de propriétés cellulaires des isolats sélectionnés. La co-agrégation la plus élevée avec la souche d'*E. colia* été observée avec sept isolats en l'occurrence ; (A9, D3, Dj16, Dj17, BS14, J4, SSI5) avec des pourcentages plus haut que 80%, tandis que pour les isolats restants, des pourcentages entre 60 et 80% ont été présentés.

Les valeurs les plus élevées d'auto-agrégation ont été observée avec un pourcentage de 100%, avec huit isolats (A9, F9, D3, Dj16, BS13, BS14, BS16, and SSI5). Les isolats restants ont montré des pourcentages d'auto-agrégation plus bas allant de 72% jusqu'à 92% (figure 23).

3.8.3.2. Adhérence aux solvants

Pour étudier l'hydrophobicité de la surface cellulaire des isolats sélectionnés aux solvants (Bacteriala dhesion to solvents ou BATS) a été mesurée, ce test informe de l'adhérence des isolats à l'épithélium du côlon. Quatre isolats (F10, D3, BS13 et BS14) ont présenté une hydrophobicité, montrant un pourcentage d'adhérence de 100 % au xylène et au chloroforme. Les isolats SSI5 et J4 ont montré une grande affinité avec le chloroforme (récepteur d'électron) (100%) et une affinité plus au moins signifiante au xylène (~ 40%). Les sept isolats restants (A8, A9, F9, Dj16, Dj17, BD16 et T1) ont montré un caractère hydrophile avec un pourcentage d'adhérence au xylène et au chloroforme moins de 50 % (figure 24).

Table 8 Résultat d'antibiogramme des isolats sélectionnés

Isolats	A8	A9	D3	F9	F10	BS13	BS14	DJ16	DJ17	BS16	T1	SSI5	J4
Amikacine (30 µg)	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R
Ampicilline (2 µg)	S	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Amoxicilline (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S
Cefazoline (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ciprofloxacine (1 µg)	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Erythromycine (10 µg)	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R
Gentamicine (10 µg)	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Oxacilline (5 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicine (15 µg)	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
Vancomycine (5 µg)	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R
Imipenème (10µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

La résistance aux antibiotiques des isolats sectionnées, les résultats sont exprimés comme : S ; sensibilité, R : Résistance. Les diamètres de zones d'inhibition ont été mesurés et évalués selon les recommandations d'EFSA (EFSA 2012).

3.9. Identification des isolats sélectionnés

3.9.1. Identification de pureté des isolats sélectionnés et leur affiliation taxonomique *in situ* via l'hybridation fluorescente *in situ* (FISH)

Pour confirmer l'affiliation taxonomique des bactéries sélectionnées au firmicutes, l'hybridation fluorescente a été réalisée. Tous les isolats bactériens sélectionnés ont montré des faibles signaux de FISH lorsqu'elles étaient traitées par des lysozymes seulement, comme suggéré par le protocole de Meier *et al.*, (1999). Cependant, l'augmentation de la concentration des lysozymes, l'ajout d'une autre enzyme (achromopeptidase) et l'augmentation du temps d'incubation à 30min à 37°C, antérieurement à l'hybridation, a abouti au plus forts signaux de FISH avec l'utilisation des gènes probes EUB 338 et LGC 354B. Les contrôles négatifs ont montré que l'auto-fluorescence du fond naturel est négligeable et que le fluorochrome utilisé pour les sondes nucléiques ne provoque pas de réactions non spécifiques avec la matrice du fond (Figure 25, 26). Ces résultats indiquent que les isolats sélectionnés appartiennent au groupe *Firmicute*.

3.9.2. Caractère phénotypique

Tous les isolats sélectionnés se présentaient une forme bâtonnet et une coloration Gram positif (selon la coloration de Gram et le test KOH), avec un diamètre de 0.5-1.0µm et une longueur de 1.0-4.0µm. En plus, tous les isolats ont manifesté la capacité à produire des endospores.

Tous les isolats bactériens sélectionnés sont, a priori, des *Bacillus* et la localisation de leur isolement est répartie comme suit ; A8, A9 (Mchounech 1), BS13, BS14, BS16 (Ain Smara 1), Dj16, Dj17 (Ghar djemaa), F9, F10, D3 (Mchounech 2), J4, SSI5 (Boussouil), T1 (Bouakkous). Toutes ces grottes, pour rappel, sont de profil oligotrophe.

Tableau 9 Tolérance à l'acidité *in vitro* et taux de survie après exposition au suc gastrique simulé des treize isolats sélectionnés

Isolats	Dénombrement total avec pH=1.5 (log UFC/ml)		Tolérance au pH %	Dénombrement total avec des condition gastriques (log UFC/ml)		Taux de survie %
	0h	3h		0h	3h	
A8	7,66 ± 0,01	7,67 ± 0,01	100,00	7,66 ± 0,01	7,66 ± 0,01	100,00
A9	7,06 ± 0,01	7,05 ± 0,00	100,14	7,06 ± 0,01	7,06 ± 0,01	100,00
F9	7,57 ± 0,01*	5,03 ± 0,02*	0,30	7,57 ± 0,01*	- *	- *
F10	7,71 ± 0,01	7,71 ± 0,00	99,99	7,71 ± 0,01	7,71 ± 0,01	100,00
D3	6,79 ± 0,03	6,81 ± 0,02	100,17	6,79 ± 0,03	6,79 ± 0,03	100,00
Dj16	6,69 ± 0,02*	6,04 ± 0,05*	23,65	6,69 ± 0,02*	-*	-*
Dj17	6,56 ± 0,05	6,55 ± 0,05	99,99	6,56 ± 0,05	5,88 ± 0,43	100,00
BS13	6,99 ± 0,00	6,98 ± 0,01	97,14	6,99 ± 0,00	6,98 ± 0,01	100,00
BS14	6,64 ± 0,04	6,64 ± 0,05	100,00	6,64 ± 0,04	6,64 ± 0,04	100,00
BS16	7,01 ± 0,03	7,03 ± 0,03	100,09	7,01 ± 0,03	7,01 ± 0,03	99,99
J4	7,12 ± 0,04*	6,92 ± 0,00*	62,96	7,12 ± 0,04	6,91 ± 0,01	100,00
T1	7,71 ± 0,00	7,71 ± 0,00	100,08	7,71 ± 0,00	7,71 ± 0,00	100,00
SSI5	6,57 ± 0,07*	6,19 ± 0,13*	40,90	6,57 ± 0,07	6,55 ± 0,02	100,00

Tolérance au pH (%) = $(\text{UFC avec pH bas} / \text{UFC avec pH neutre}) \times 100$; - = pastolerance; et 100% = le taux de survie n'est pas affecté). Tous les résultats sont exprimés en moyenne, \pm écart type (n=3). Résultat avec (*) dans une ligne montrent une différence significative (P < 0.05).

Table 10 Tolérance *in vitro* et taux de survie après exposition au liquide intestinal simulé des treize isolats sélectionnés

Isolats	Dénombrement total avec 1% oxgal (logUFC/mL)		Tolérance au bile	Dénombrement total dans des conditions intestinales (log UFC/mL)		Taux de survie%
	0h	4h		0h	4h	
A8	8,12 ± 0,00	8,00 ± 0,00	98,59	8,12 ± 0,00	7,81 ± 0,20	100,00
A9	7,35 ± 0,01	7,63 ± 0,22	100,00	7,35 ± 0,01	7,34 ± 0,01	100,00
F9	8,29 ± 0,03	8,21 ± 0,04	99,07	8,29 ± 0,03	8,32 ± 0,01	99,67
F10	8,27 ± 0,01	8,26 ± 0,00	99,90	8,27 ± 0,01	8,17 ± 0,07	100,00
D3	7,36 ± 0,16	7,73 ± 0,21	100,00	7,36 ± 0,16	7,30 ± 0,13	100,00
Dj16	6,00 ± 0,03	6,65 ± 0,24	100,00	6,00 ± 0,03	6,06 ± 0,11	98,96
Dj17	8,27 ± 0,01*	6,91 ± 0,58*	83,51	8,27 ± 0,01	7,80 ± 0,42	100,00
BS13	8,26 ± 0,00	7,79 ± 0,20	94,27	8,26 ± 0,00	8,14 ± 0,16	100,00
BS14	7,58 ± 0,13	8,03 ± 0,48	100,00	7,58 ± 0,13	7,67 ± 0,01	98,83
BS16	7,68 ± 0,04	8,28 ± 0,05	100,00	7,68 ± 0,04	7,64 ± 0,01	100,00
J4	7,79 ± 0,01	7,86 ± 0,06	100,00	7,79 ± 0,01	7,79 ± 0,00	100,00
T1	8,20 ± 0,01	8,40 ± 0,25	100,00	8,20 ± 0,01	8,11 ± 0,11	100,00
SSI5	7,78 ± 0,03	8,09 ± 0,42	100,00	7,78 ± 0,03	7,70 ± 0,17	100,00

Tolérance au bile (%) = (UFC avec bile/UFC sans bile) × 100; – = pas tolerance; et 100% = le taux de survie n'est pas affecté). Tous les résultats sont exprimés en moyenne, ± écart type (n=3). Résultat avec (*) dans une ligne montrent une différence significative (P < 0.05).

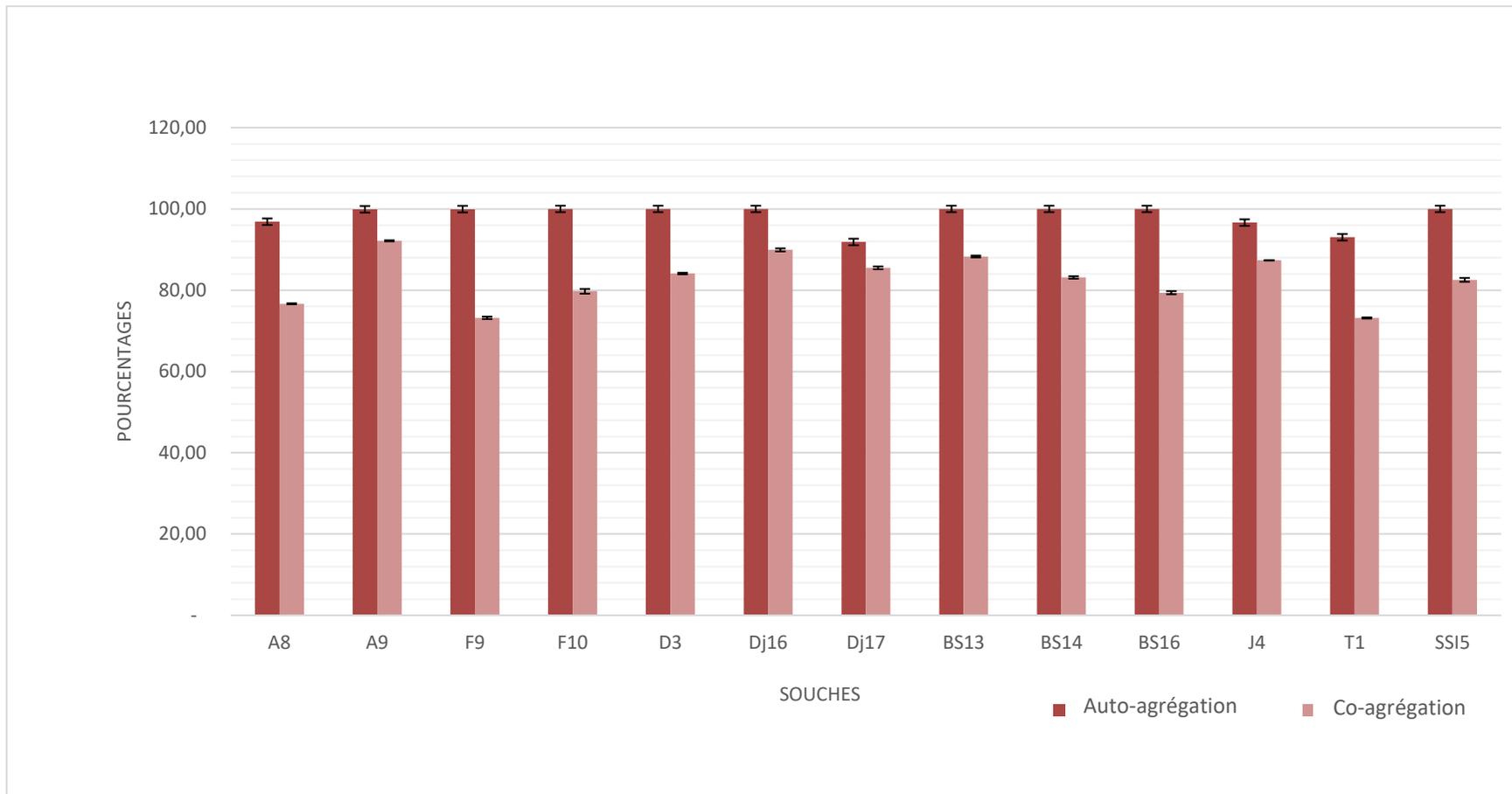


Figure 23 Pourcentages d’auto-agrégation et de co-agrégation des isolats sélectionnés. Les barres d’erreurs représentent l’écart-type (SD).

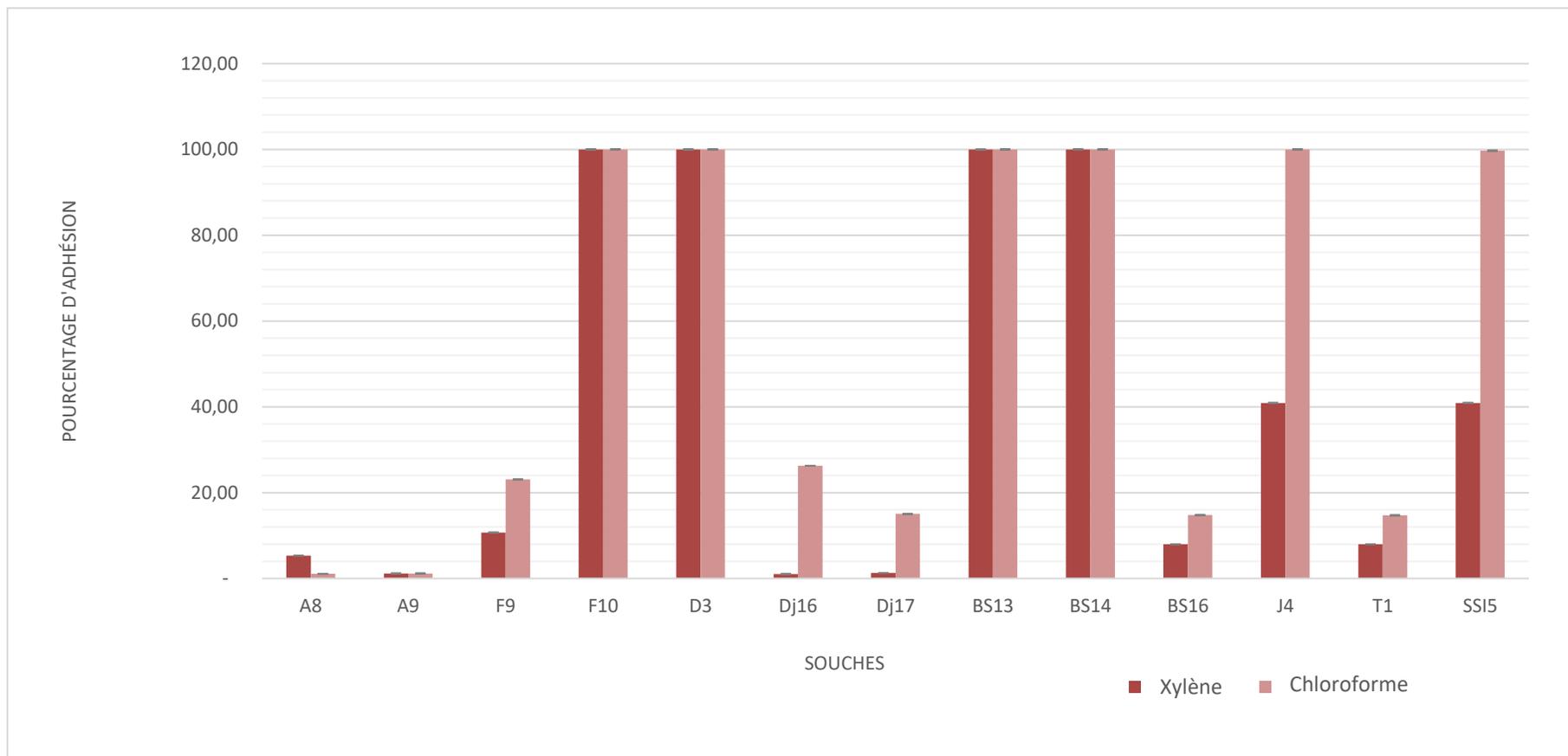


Figure 24 Pourcentages d'adhérence aux xylène et chloroforme des isolats sélectionnés. Les barres d'erreurs ent l'écart-type (SD).

3.9.3. Analyse phylogénétique

Les séquences génétiques 16S ARNr (entre 300-1000 nuc. long) de tous les isolats sélectionnés (affichées en dessous) confirment l'appartenance des isolats sélectionnés aux différents taxa de *Bacilli* au sein de *Firmicutes* (figure 27). Les évaluations phylogénétiques ont été faites en comparant aux séquences génétiques de haute qualité de 16S rRNA (>1200 nucléotides), des microorganismes cultivables de la base de données Silva. Ces évaluations ont conclu que les souches sélectionnées appartiennent à deux différents groupes (figure 27) :

Le groupe de Paenibacillus, contient seulement la souche A9 (isolée de la grotte Mchounech), montrant un degré élevé de similitude avec l'espèce *P. pabuli* (98.5 %) selon la base de données LTP (version 132), et *P. taichungensis* (98.6%) selon la base de données des Bacillales (Silva SSU PARC database version 138.1).

Le groupe de Bacillales, distribué en trois sous-groupes :

Sous-groupe 1, comprenant un seul isolat BS13 (isolé à partir de la grotte de Ain Smara1), montrant la plus grande similarité (100%) avec les espèces cultivables de *B. capparidis* et *B. gobiensis* dans la base de données LTP (version 132) et avec *B. indicus* (>99%) dans la base de données Bacillales (base de données Silva SSU PARC version 138.1).

Sous-groupe 2, comprenant quatre souches, prélevées à partir de deux différentes grottes, distribué en deux autres sous groupes : F9 and F10, isolé à partir de la même grotte (Mchounech) montrent des similarités élevées à *B. subtilis* selon la base de données LTP (version 132) et à *B. tequilensis* selon la base de données Silva SSU PARC (>99 % respectivement), T1 et A8, représentant deux différentes grottes (Bouakkous et Mchounech, respectivement), avec des similarités à *B. zhangzhouensis* et *B. pumilus* (>98 % respectivement).

Sous-groupe 3, comprenant six souches, prélevées à partir de trois différentes grottes, distribué en deux autres sous groupes : D3 et J4, représentant deux différentes grottes (Mchounech et Boussouil respectivement), SSI5, Dj16, Dj17, BS16, représentant deux différentes grottes (Boussouil et Ghar Djemaa). Toutes ses souches présentent une similarité significative à *B. megaterium*, *B. simplex* et à d'autres souches de *Bacillus* (de 94 à 99 % de similarité). Il est intéressant de noter que trois des microorganismes incultivables, étroitement liés aux treize souches sélectionnées ont été isolés à partir du milieu souterrain ou d'autres grottes/mines. De l'autre part, les autres séquences génétiques des autres isolats apparentés ont été prélevés de différents environnements terrestres et aquatiques.

Résultats

Les souches identifiées dans la présente étude ont démontré une capacité à dégrader deux substrats causant les troubles gastriques les plus courants (lactose et gliadine). En outre, ces dernières ont aussi prouvé certaines caractéristiques probiotiques telles que la résistance au suc gastrique et au liquide intestinal.

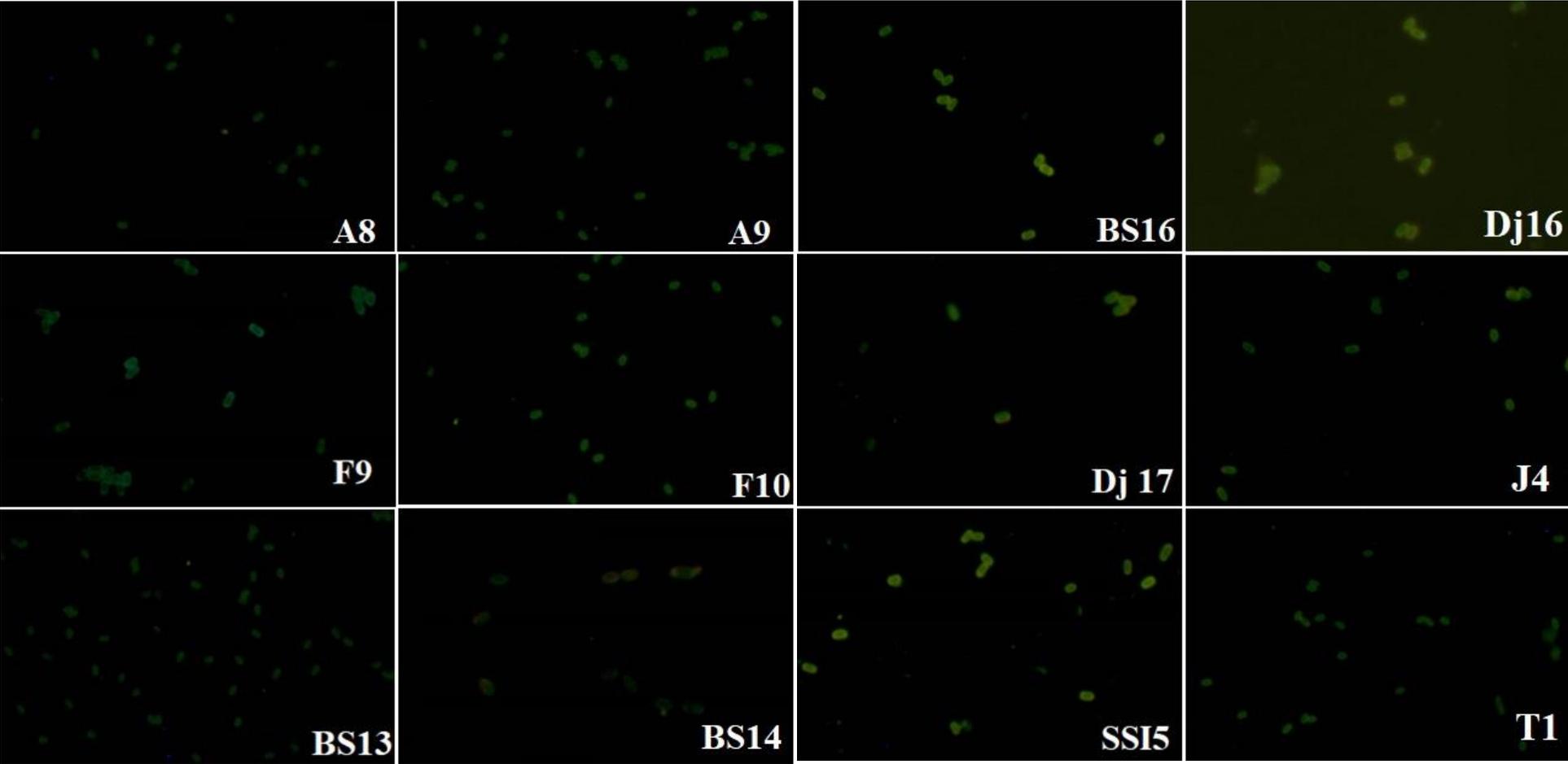


Figure 25 Résultat de FISH

Séquences génétiques 16S ARNr des souches sélectionnées

Séquence de la souche A8

Code NCBI : OL823170

1435 paires de base

ANNNTGCANGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGTATGTTAGCGGCGG
ACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAA
ACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGAC
GGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCG
GATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGNTNNCAC
CTTGACGGTACCTANCCAGAAAGCCACGGCTAANTACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGG
CGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTA
ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTNTCCGCCNCTTAGTGC
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACT
CNNAGGANTTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGNAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGG
GCTTTCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGNGATGTTGGGTAAAGTCCCGNAACGAGCGCAACCCTTGATCTTANTTGCCA
GCATTTAGATTGGGCNCTYTAAGGNGACTGCCGGTGANNNACCGGAGGAAGNNG
GGGATGACGNNNNATCATCANGCCCCTTATGACCTGGGCTACMCNNGTGCTACA
ATGGANNNAANAAAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTLAGCCAATCCATAAATCT
GTTCTCAGTTCGGATCGCAGTTTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAG
TAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGA
GCCAGCCGCCGCAAGGNNGGC

Séquence de la souche A9

Code NCBI : OL823171

1366 paires de base

GNNTANCACGTAGGCAACCTGNCCTCANN CNNGGACA ACTACCGGAAACGGTA
GCTAATACCGAATACTTGCTTNCTTCNCCTGAANGNNGCTGGNAAGACNGAGCN
NTCTGTCACTTGAGGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGNGAGGTAACGGC
TCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
CTGANACACGGCCCAGACTCNNACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGGCGAANNCTGACNGNCAATNCCGCGTGAGTGATGAAGGNTTTCGGATCGT
NAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCTTGAGAGTAACTGCTCAAGGAGTGAC
GGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCA
TTTAAGTCTGGTGTTTAATCCCGGGGCTCAACCCCGGATCGCACTGGAACTGNN
TGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGGCTGTA ACTGACG
CTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCCGAAGTT
AACACATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG
AATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAATT CGAAGCAACG
CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATNNNNNNGACCCGNNNAGAGATGTNCCTT
TCCTTCGGGACANNNNAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA
GATGTTGGGTAAAGTCCNGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTANNNGCCAGCANT
TCGGNNNGNACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTA CTACAATGGCC
GGTACAACGGGCTGTGAAGCCGCGAGGTGGAACGAATCCTAAAAAGCCGGTCTC
AGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
CACCACGAGAGTTTATAACACCCGAAGTCGGTGGGGNAACCGCAAGGAGCCAGC
CNCNGAAG

Séquence de la souche BS13

Code NCBI :OM146734

1366 paires de base

```
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGNNNGCAAGCGTNNNNNGGAATTAT
TGGGCGTAAAGCGCNCGCAGGCCGGTTNNNTAAGTNNGATGTGAAANCCCCCGGC
TCAACCGGGGAGGNTCATTGGANACTGNNNNACTTGAGTNNANAAGAGGAGAGN
GGAATTCCANGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGC
GAAGGCGNNNCNCTGGTCNNNNACTGACGCTGAGGNGCGAAAGCGTGGGGAGC
NAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
```

Séquence de la souche BS14

Code NCBI : OM250505

286 paires de base

```
GAAACCGGAGCTAATACCGGATGCTTGNTTGNACCGCATGGTTAAATGATGAAA
GGNGGCTTCNCNTATCCCTTTCGCATGGGGCCGCGGGCTTTAACTAGGTGGGGGG
GTAATGGCTCACCCAGGGGACGAAGCGTAGCCGAACTGAGAGGGTGGCGNGNCC
CCCGGGGACTGAAAAAAGGCCCAAATCCTNCTAGAGGNAACAATAAGGAATCT
TCCGCCATGGAAAAAAGTCTGACGGAAAAACCCCCCGTGAGTGATGAAGGGTTT
CGGATCGGAAAACTC
```

Séquence de la souche BS16

Code NCBI : OL823172

1415 paires de base

TCGATGGGAGCTTGCTCCCTGAGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGG
CAACCTGCCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGANNNCGGAGCTAATACCGGATA
CGTTCTTTTCTCGCATGAGAGAAGATGGAAAGACGGTTTCNGCTGTCACTTATAG
ATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACG
ATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGNNCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACNCCGCNNNAACGAAGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTT
AGGGAAGAACAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
NGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTCCTTAAGTCTGATGTG
AAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTNCA
GAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTA ACTGACACTGAGGCGCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGA
GTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTNCCNTTCGGGGGA
CNGNNNGACAGGNNGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCNNNTCNTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCAC
TCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA
TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGC
TGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTA
GGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTANGGAGCCAGCCGCCTAAGGNNG
A

Séquence de la souche F9

Code NCBI : OL823176

1435 paires de base

GCCTANTACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCG
GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCG
GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAA
AGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAANNNNNGACGGAGCAACGCCGNNNGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTNNNATAGGGCG
GTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCNNGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGC
AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGGAACTNGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGNGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGNNGAGGAACACCAGTGGCGAAGGNGACTNNTNTGGTC
TGTAANTGACGNTGAGGAGCGAAAGCGNNGGGGAGCGAACAGGATTAGATNCCNT
GGTAGTNCACGCCGTNAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTNCGCCCNNTA
GTGNTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGNTGGAGCATGTGGTTTAAT
TNGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG
ATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCNCANCGAGCGCAACCCTTGATCTTNNT
TGCCNNCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAA
TCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGANTGCGTGAAGCNGGAATCGN
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGNGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGNAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTA
GGAGCCNCCNCCC

Séquence de la souche F10

Code NCBI : OL823177

1141 paires de base

GCNCANNCTCCTACNNGAGGCANCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAANN
NNGACGGAGCAANNNCGCGTGAGTGATGAAGGNTTTCGGATCGTNAAGCNCTGT
TNTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTNNAATAGGGNGGTACCTTGACGGTACCTAA
CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCCCNGCTNNACCGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACTTGA
GTGNGAAGANGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGANATGN
GGAGGAACACCAGTGGCGANNNCGACTCTCTGGTCTGTAAGTGANNTGANNAN
CGAAANCGNGGGGAGCGAANNNGATTAGATACCCTGGTAGTCCACNCCGTAAAC
GATGAGTGNNAANNNGTTNNNGGNTTCNNNCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
AAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC
CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGG
GGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCANCATTCAGTTGGGC
ACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGG
GCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCG
CAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAT
GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG
TTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAG

Séquence de la souche Dj16

Code NCBI : OL823174

1435 paires de base

GCAGACGTTCGAGCGAATCGATNNGAGCTTGCTCCCTGAGATTAGCGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGTGCAACCTGCCTATAAGACTGGNNATAACTTCGGGAAA
CCGGAGCTAATACCGGATANNTTCTTTTCTCGCATGAAAGAAGATGGAAAGACG
GTTTCGGCTGTCACTTATAGATGGGCCCGCGGCGCATTATCTAGTTGGTGAGGTA
ATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTANNCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
GCAATGGACGAAAGTCTNNGGAGCAACNCCGNNNGAANNAASAAGGCCTTCGG
GTCGTAAAGTTCTGTNNTTAGGGAAGANCAAGTACCAGAGTAACTGCTGGTACCT
TGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCNGCCGCGGTAA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTG
GTTCCCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCNACCGTGGAGGGTCATTGGAAA
CTGGGGAACCTTGAGTNCAGAAGAGGAAAGTGGAAATCCAAGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTNTCTGGTCTGTA
ACTGACANTGAGGCGCGAAAGCGTGNGGAGCAAACAGGATTAGATACCNTGGTAGTC
CNCGCCGTANACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGNCCTTTAGTGCTGC
AGCTAACGCATTANGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA
NNGGAATTGACGGGNGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
AACRCNANNAACCTTACCAGGTCTTGACANCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGC
TTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCA
GCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCCATAAAGCCAT
TCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTA
ATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGC
CAGCCGCCTAAGNNNGACA

Séquence de la souche Dj17

Code NCBI : OL823175

1039 paires de base

TCTGTTGTTAGGGAAGANCAAGTACCAGAGTANCTGCNNGGTACCTTGACNGNACC
TAANNAGAAAGNCACGGCTAACTACGTGCCAGNNNCNGCGGTAANACGTAGGTG
GCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGNNGGTGGTTCCTTANN
CTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGAACT
TGAGTGCNGAANAGGAAAGTGGAATTCCAAGTGNAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
NTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGG
CGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
ACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTNTAGTGCTGCAGCTAACGCA
TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCNNGGCTGAAACTNNAAGGAATTGA
CGGGGGCCCGCACNAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCANCGCGAAGA
ACCTNNCNNGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCCTTC
GGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTT
GGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACA
AAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCCATAAAGCCATTCTCAGTTCG
GATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAC
GAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTCATGGAGCCAGCCGCCTA
AG

Séquence de la souche D3

Code NCBI : OL823173

1249 paires de base

```
TGGTTGCNNNTATNNCTTANNGATGGGCCCCGCGGTGCNTTAGCTANTTGGTGAGN
NAACGGCTCACCAAGGNNACGATGCATACCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGNNAATCT
TCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCANCNNCGCGTGAATGATGANNGCTTT
CGGGTCGTA AAACTCNGTNNNTAGGGAAGAACAAGTRNNANNGTAACTGCTTGT
ACCTTGACGGTACCTAACCARAAAGCCACRGNNAAYTACGTGCCRGCAGCCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGSNNNAAGCGCNCGCAR
GCGNTTCTTAAGTCTGANNTGAAAGCCCACGGCNCNNNCGKGGAGGGTCAATTG
GAAACTGGGGA ACTTGARTGNNGAAGAGANNNNCGGAATTCNACNTGTASCGGT
GAAATGCGTAGANATGTGGNGGANNACNNNTNNGANNNCNNNNNTTTNNNCTG
TMACTGASRCTGAGRCGCGNNARMGYGNGAGCNMNNNNGNNNNNTNATA CNCC
GTGGTMGTCNACNNCKTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACA ACTCTAGA
GATAGAGCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC A
GCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTT
AGTTGCCAGCATTNAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCAT
AAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAAT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAAC
```

Séquence de la souche J4

Code NCBI : OL823178

1426 paires de base

```
TGCCGTAATACNTGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTT
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACCTGTAAGACTGGGATAAC
TTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATT
GAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATC
GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCNNGANNATGAAG
GCTTTCGNNTCGTAAACTCTGTTNTTAGNNAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGC
TTGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGC
GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA
TTGGAAGTGGGGAAGTNGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATTCCACGNGTAGC
GGTGAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGT
CTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATNCCN
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTNCGCCCTNT
AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTG
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGNTGGAGCATGTGGTTTAAT
TNGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGA
GATAGAGCGTTCCTTCGNGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCNNNNACGAGCGCAACCCTTGATCTT
AGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCCAT
AAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAAT
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGT
AAGGAGCT
```

Séquence de la souche T1

Code NCBI : OL823180

1016 paires de base

GNANACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAA
AGACGGTTTCNGCTGTCACTTGCAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAATGGCNTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA
TCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTC
GCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGC
AGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGNNGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTANCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTC
TGTA ACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGNGGAGCGAACAGGATTAGATACNCT
GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTNTCCGCCNSTTA
NTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCASTCCGMCTGNGGAGTACGGTTCGCAAGACTG
AANCTC NNAGGAATTGACGGNNGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGNTTTAAT
TCGAAGCAACGCGAANAACNTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCNTAGAG
ATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGT
TGCCAGCATTTAGTTGGGCACTTTAAGGTGACTGCC

Séquence de la souche SSI5

Code NCBI : OL823179

1392 paires de base

TCGCNNGTACGAGNNANTCGNNNTNNNNCTTGCTCNCTGANATTAGCGGCGGAC
GGGTGAGTGCGCGTGGGCCCTGCCTATAAGACTGNGATAACTTCGNNNNAACC
NNNACCTAATACCNNNATACTTNTCTTTCTCGNATGANAGNNNNATGGANNAGA
CGGTTTACNCTGNCNCTTATANNTGGGCCCGCNGCGCATTATNTAGTTGGNGAGG
TAATGGCTCACCANGGCGACGATGCGANCCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGNCACGGCCNTACTCCTACGGGAGGCAGCAATNNGGAATCTT
NNNNAATGGACNAANNNNWGACGGAGCAACNCCGCNTGAACGAANNNGCCTT
CGGGTCGTAAAGTTCTGTNNTTARGGAAGAACAANNNCCNNNNNNNRCTGCTGGT
ACCTTGACNNNNCCTAACCNNAAAGCCACGGCNAACTACGTGCCMGCRCGCGCG
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGARTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAG
GTGGTTCCTTAANNCTGATGTGAAAGCCACGGCTCNNNCGTGGAGGGTCATTGG
AAACTGGKGAACCTGAGTGMNGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGTGTANCGGTG
AAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAKGNNACTTTCTGGTCTGT
AACTGACACTGANNCGCGANAGCRTGGNNAGCNNNNAGGATTAGATAACCCTGGT
AGTCCNNGCCGTAWACGATGAGTGCTWAGNGTTAKASGGTTTCCGCCNNNTAGT
GCTGCNGCTAACGCATTAMGCACTCCGCCTGGKGAGNACNNCCNNNNGGCTGAA
ACTNNNNNGGAATTGACNNGGGCCCGCNNAAGNGSTGGAGCWTGTGGNTTAATTC
GNNNCAACRCNNWKAACCTTACYAGGTCTTGNCNNCCTCTGACNACCCTANNGA
TNGGGCTTTCCCTTCSGGNNACNNARTNACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC
TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAG
TTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAACCTGCGAAGGTAAGCGAATCCATAAA
GCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGC
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC
CGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGA

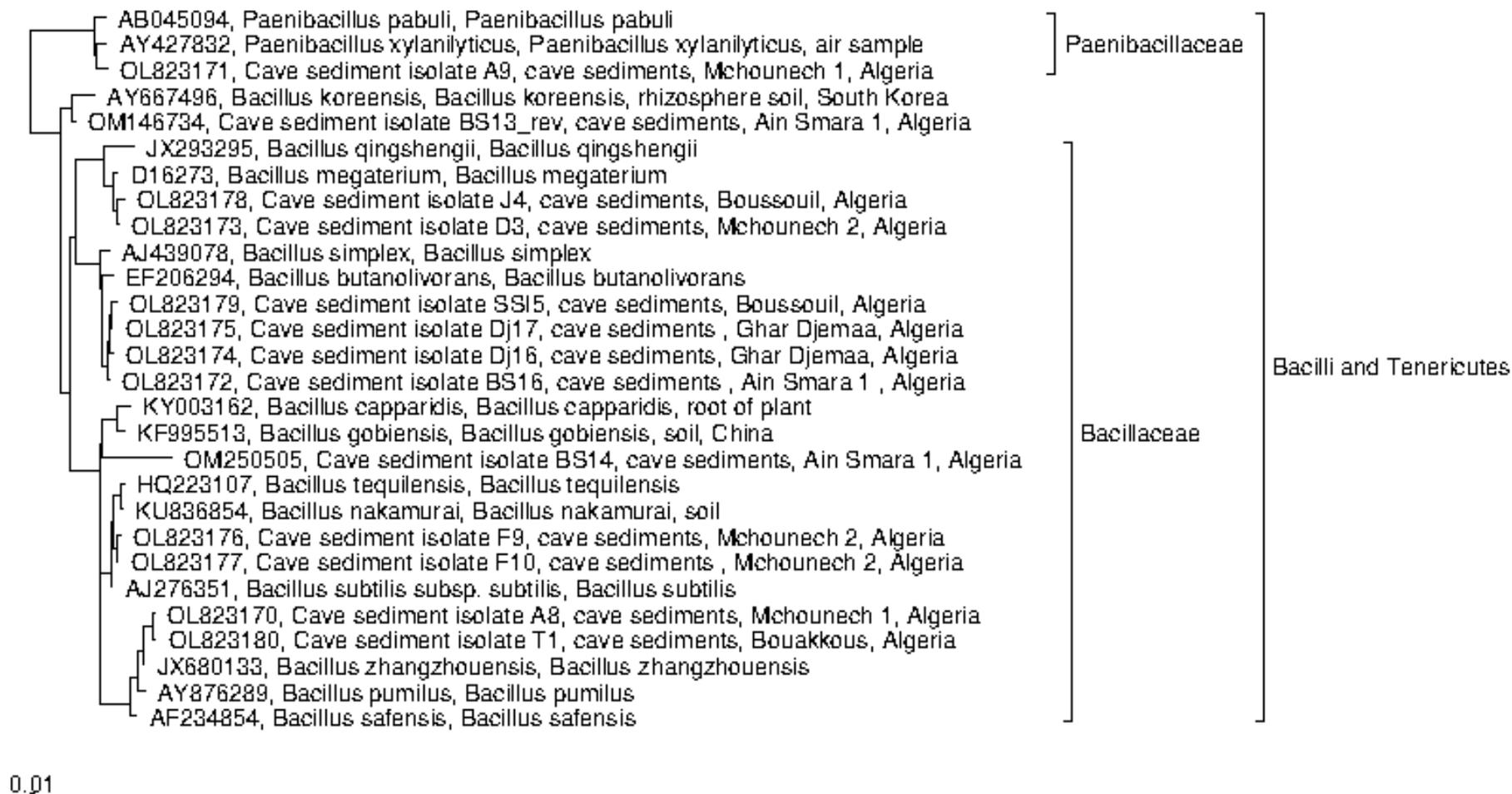


Figure 26: Arbre phylogénétique(non raciné) des souches bactériennes sélectionnées etles plus proches quinze souches (se basant sur 16S rRNA) de la base de données des microorganismes cultivables de LTP (version 132).

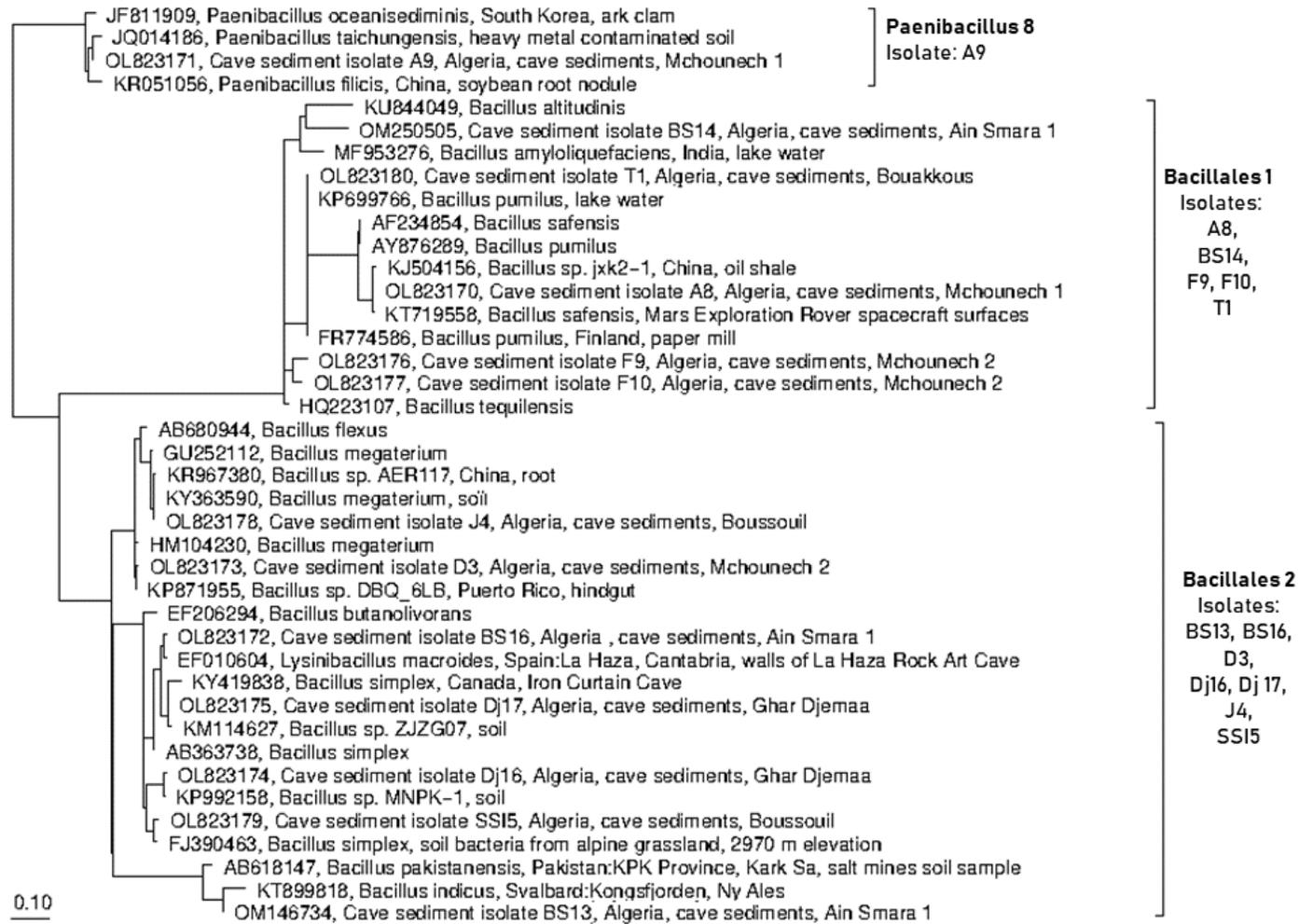


Figure 27: Phylogenetic tree (unrooted) showing the tentative 16S rRNA gene relationships between the 13 isolates retrieved in this study and their closest relationships to other sequences from both culturable as well as unculturable organisms within SSU Silva REFNR database, version 138.1.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les grottes, appelées également écosystèmes souterrains, sont des environnements particuliers et difficiles pour les micro-organismes, caractérisés par des conditions extrêmes ; manque de lumière, faible biomasse (oligotrophie), température de l'air et de l'eau, presque, constante et une humidité proche de la saturation (Bastian et al., 2010). Pourtant, les microorganismes de ces écosystèmes sont, remarquablement, diversifiés et développent pour cela des adaptations élevées aux limitations environnementales (Barton et Jurado, 2007). Les comportements d'adaptation des microorganismes des grottes sont similaires à ceux du tractus gastro-intestinal, en particulier sur le plan ; concurrence pour les nutriments et les ressources limitées, résistance à plusieurs conditions et limitations extrêmes, production d'agents inhibiteurs contre d'autres microorganismes (Schoster et al., 2016) et pour une large activité enzymatique (Brigidi et al., 2001; Rautela et al., 2017). La plupart des études sur les potentialités des microorganismes de grottes se sont concentrées sur la production d'antibiotiques. En revanche, dans la présente étude, l'accent est mis sur la recherche de potentialités probiotiques chez des bactéries du genre *Bacillus* isolées à partir de grottes de différentes régions Algériennes.

En effet, un nombre total de 24 échantillons de sédiments (sol) prélevés de grottes ont été étudiés. L'analyse du sol de ces grottes a montré une contenance variable en matière organique suivant la position, la situation et la structure de la grotte. Aussi, huit grottes ont montré une contenance faible de matière organique (moins de 2 mg de carbone organique total « TOC » par litre) et elles sont qualifiées, en conséquent, de grottes oligotrophes. En revanche, les grottes qui abritent de communautés animales, en particulier, les chauves-souris ont montré des quantités plus élevées (plus de 2mg/litres) de matière organique dans les sédiments et ce, est dû à la présence des excréments des animaux. De ce fait, ces grottes renferment un nombre de population microbienne plus élevées avec une grande diversité. En conséquent, la présence de source d'énergie carbonée dans les grottes affecte directement la présence et la diversité des populations microbiennes (Groth et al., 1999; Jurado et al., 2008).

Les bactéries du genre *Bacillus* avaient été reportées comme de bons candidats, possédants des aptitudes à développer de potentialités probiotiques. Ces potentialités sont liées à leur meilleure capacité de survie, grâce à leur forme sporulée résistantes à la chaleur (Hyronimus et al., 2000; Fares et al., 2015), aux conditions du système gastro-intestinal et à leur efficacité à germer dans l'intestin (Duc et al., 2003).

Discussion

La sporulation bactérienne est une caractéristique de deux genres bactériens en l'occurrence ; *Clostridium* et *Bacillus*. Ces bactéries prennent les formes sporulées, notamment, lorsque les sources nutritionnelles font défaut dans le milieu (Driks, 2002). Cette caractéristique a été utilisée dans ce travail pour isoler, exclusivement, les bactéries du genre *Bacillus*. En effet, le traitement thermique des échantillons a été utilisé pour éliminer les formes végétatives et garder les formes sporulées ensuite, l'incubation a été effectuée dans les conditions aérobies pour éviter la germination des spores de *Clostridium*.

Des études précédentes ont révélé que des bactéries du genre *Bacillus* à ont été isolés à partir des écosystèmes souterrains, à titre d'exemple : *Bacillus pumilus* (Daskalakis *et al.*, 2015), *Bacillus licheniformis* (Tredeciet *al.*, 2018), *Bacillus subtilis* (Mudgilet *al.*, 2018) et *Bacillus velezensis* (Ghoshet *al.*,2020). Ainsi que de nouvelles espèces de *Bacillus* ont été répertorié ; *Bacillus cavernaesp.nov.* (Feng *et al.*, 2016), *Bacillus onubensissp.nov.* (Dominguez-Moñinoet *al.*, 2018) et *Bacillus antrisp.nov.* (Rao *et al.*, 2019).

D'après les recommandations de la présomption qualifiée d'innocuité(QPS) (QPS 2014) et les orientations des experts de la FAO et de l'OMS, l'une des caractéristiques les plus cruciales pour sélectionner les probiotiques est l'absence de profil indésirable (ex. profile pathogène). Pour ce faire, les souches isolées dans ce travail ont été, préalablement, criblées pour leur activité hémolytique et lécithinase. Les souches qui s'avéraient non toxigènes ont été choisies pour être criblées pour leur capacité à produire des enzymes digestives.

Un autre critère de sélection des probiotiques est la nécessité d'apporter des effets bénéfiques pour l'hôte. En effet, les isolats bactériens du genre *Bacillus* sélectionnés dans la présente étude répondent à ces critères en développant des potentialités probiotiques et production d'enzymes extracellulaires hydrolytiques.

La production des enzymes hydrolytiques des deux substrats provoquant les intolérances alimentaires les plus courantes par des bactéries sporulantes des grottes a été étudiée. Les bactéries sélectionnées ont été testé au préalable pour leur capacité à dégrader le lactose et la gliadine sur boîte. Le substrat chromogénique X-Gal a été utilisé pour déterminer la capacité à dégrader le lactose, où les colonies bleues indiquaient la présence d'une activité bêta-galactosidase (Favier *et al.*, 1996). Pendant que, la gélose de gliadine a été utilisée pour tester la capacité à dégrader la gliadine. Un nombre de vingt-quatre isolats ont montré une activité bêta-galactosidase et trente-quatre isolats ont montré une capacité à dégrader la gliadine. Les isolats ayant les deux activités ont été sélectionnés conjointement à d'autres tests plus approfondis. Plusieurs études ont montré la potentialité des probiotiques à avoir un impact

Discussion

bénéfique sur les troubles digestifs tels que l'intolérance au lactose (Sharma *et al.* 2014; Son *et al.*, 2017) et réduire l'intolérance au gluten (Angelis *et al.*, 2006; Papista *et al.*, 2012; Jayawardana *et al.*, 2019). De plus, le genre *Bacillus* est connu pour sa large gamme de capacité protéolytique (Horikoshi 1999), un nombre important d'étude ont montré la capacité des *Bacillus* probiotiques à produire la bêta-galactosidase (Kumaret *et al.*, 2012; Natarajan *et al.*, 2012; Criselda Percival *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2021) et la gliadinase (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2015; Rashmi and Gayathri 2017; Wagh *et al.*, 2018). En plus de cela, les micro-organismes extrêmophiles peuvent produire des enzymes qui fonctionnent dans des conditions extrêmes (Van den Burg 2003).

Le dosage de bêta-galactosidase a été fait par l'estimation de la capacité à fermenter l'ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -galactoside). La valeur la plus élevée de cette enzyme était de 429.5 unités de Miller détecté chez l'isolat B13. Une activité plus faible a été détecté pour BS14, J4 et A9 pour une valeur de 317.81, 224.5 et 181.25 MU respectivement. Alors qu'aucune activité ou des quantités inférieure ont été détectées pour les isolats sélectionnés restants. L'objectif du dosage dans cette étude était plus qualitatif, des quantités plus élevées d'enzymes pouvaient être produites en optimisant la source de carbone et d'autre paramètres comme indiqué par Kumar *et al.*, (2012); Natarajan *et al.* (2012); Sharma and Singh (2014) où des bactéries du genre *Bacillus* ont montré une meilleure production de cette enzyme lors du changement de sources de carbone et d'azote.

La réponse immunitaire incontrôlée envers le gluten est causée par des peptides immunotoxiques riches en proline présente dans le gluten appelés gliadine (Koning 2012). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont mis en évidence l'effet de l'utilisation des probiotiques sur l'intolérance au gluten, leur pouvoir préventif et l'inhibition des effets toxiques induits par la gliadine de blé (Bakshi *et al.*, 2012; Laparra *et al.*, 2012; Smecuol *et al.*, 2013; de Sousa Moraes *et al.*, 2014). De plus, les potentialités des bactéries du genre *Bacillus* dans l'intolérance au gluten ont également été étudiées (Angelis *et al.*, 2006; Lindfors *et al.*, 2008; Kunduhoglu and Hacioglu 2021) et leur capacité à produire des gliadinase extracellulaires a, aussi, été montrée récemment (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2015; Wagh *et al.*, 2018; Rashmi *et al.*, 2020).

Pour tester la capacité des isolats sélectionnés à dégrader la gliadine en solution, deux solutions différentes de gliadine ont été utilisées ; avec la gliadine non traitée et de la gliadine traitée par l'acide (pour simuler le prétraitement acide par les enzymes digestives des mammifères). Selon les résultats de SDS-PAGE, toutes les bactéries sélectionnées ont été

Discussion

capables de dégrader environ 2g/L de gliadine en 24h et ont montré un large spectre d'activités peptidase. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par (Alvarez-Sieiro *et al.*, 2015), où *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* ont montré une capacité à dégrader la gliadine et de l'utiliser comme la seule source d'azote. Ces données ont révélé que les isolats sélectionnés dans ce travail peuvent dégrader uniformément la gliadine brute et traitée à l'acide. D'autre part, les épitopes de l' α -gliadine, présentant un poids moléculaire d'environ 37kDa, sont considérés comme les plus immunogènes parmi les différentes sous-unités de gluten (Camarca *et al.*, 2009). Les isolats sélectionnés ici, ont été capables de dégrader ce dernier avec un poids moléculaire allant de 30 à 50kDa.

La zymographie *in gel* fournis des informations qualitatives et quantitatives où les enzymes hydrolytiques convertissent le substrat en une interaction visualisée altérée détectée en fonction de leur poids moléculaires et de leur capacité à dégrader le substrat (Vandooren *et al.*, 2013). Dans le présent travail, l'objectif de la zymographie sur gel était de confirmer la présence d'enzymes hydrolytiques de la gliadine. Des bandes et des zones claires représentatives de l'activité des gliadinase ont été enregistrées pour tous les isolats sélectionnés avec différentes intensités qui montrent la présence de plusieurs peptidases capables de dégrader la gliadine. Les zones étaient présentes entre de poids moléculaires allant de 15 à 150 kDa. Cependant, Pan *et al.* 2011 ont démontré que la zymographie sur gel peut être imprécise dans la détermination de la taille moléculaire de certaines peptidases en raison de la mobilité réduite des protéines dans le gel d'acrylamide copolymérisé avec un substrat protéique. Ainsi, pour identifier les poids moléculaires correspondants avec plus e précision, l'utilisation d'un ensemble de standards d'enzymes avec des poids moléculaires connus est nécessaire (Pan *et al.*, 2011). Par conséquent, pour déterminer la nature des protéases détectées dans ce travail, des études supplémentaires sont nécessaires.

Dans la phase suivante de cette étude, les isolats sélectionnés ont été testés pour certaines propriétés probiotiques. Selon les recommandations de la FAO et de l'organisation mondiale de la santé (OMS) (Zielińska *et al.*, 2018), les probiotiques devraient avoir la capacité de survivre dans les conditions gastro-intestinales pour pouvoir se transiter vers le côlon sous forme de cellules viables métaboliquement actives afin de conférer des effets thérapeutiques et nutritionnels pour l'hôte (Hyronimus *et al.*, 2000).

Le pH de l'estomac des personnes en bonne santé varie de 1 à 3 (Angelis *et al.* 2006), tandis que les sels biliaires libérés dans l'intestin grêle ont une concentration d'environ 300 mg/l (Perumal Jayaprabha Agaliya 2012). Ces concentrations peuvent endommager la

Discussion

membrane cellulaire bactérienne par la dégradation des lipides et des acides gras (Pennacchia *et al.* 2004). Par conséquent, la tolérance des isolats sélectionnés a été évaluée dans un suc gastrique (pH=1) et un liquide intestinal (1% de sels biliaires) simulés. Le taux de survie de tous les isolats sélectionnés au suc gastrique simulé était de 100% à l'exception de F9 et DJ16. En revanche, tous les isolats en question ont montré une persistance élevée au liquide intestinal simulé.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène ancien répandu chez les bactéries dans l'environnement, grâce au pangéome microbien (Bhullar *et al.*, 2012). Plusieurs rapports ont montré que les microorganismes isolés des milieux extrêmes (absent d'influence humaine) sont pourvu d'une résistance aux antibiotiques, tel que ; les océans (Toth *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2019) et les grottes (Brown and Balkwill 2009; Bhullar *et al.*, 2012), où la grotte Lechuguilla a fourni un exemple de multirésistance aux panoplies d'antibiotiques (Gram+ et Gram-). En plus, la résistance aux antibiotiques est, également, courante chez les bactéries à GRAM positif en raison de l'acquisition de gènes (via des plasmides, recombinaison de l'ADN, ou par des changements dans les gènes PBP : Penicillin binding proteins) (Gibson *et al.*, 2015). Par conséquent, étant donné que les probiotiques sont, généralement, recommandés parallèlement à l'antibiothérapie pour éviter les troubles gastro-intestinaux, comme la diarrhée induite par les antibiotiques, certaines résistances aux antibiotiques couramment administrés sont souhaitables. Cependant, il est préférable que les probiotiques hébergent peu de gènes de résistance aux antibiotiques pour éviter de transférer des gènes de résistance aux antibiotiques la flore intestinale, y compris les pathogènes (Gueimonde *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2017).

Dans la présente étude, la sensibilité aux antibiotiques des isolats sélectionnés a été analysée à l'aide de la méthode de diffusion de disques (BAUER et AW 1966) basée sur les recommandations de l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA 2012). Tous les isolats sélectionnés se sont avérés sensibles à l'Imipenème et à la ciprofloxacine à l'exception de Dj16. En revanche, tous les isolats étaient résistants à la Céfazoline 30 µg et à l'oxacilline 5 µg. La résistance à la pénicilline peut survenir en raison de la production de β-lactamases qui provoque la dégradation enzymatique des antibiotiques ou par la modification des PBP (Berger-Bächli 2002; Munita *et al.*, 2015). Aussi, des études ont montré que les espèces du genre *Bacillus* sont généralement résistantes aux pénicillines en raison de la présence de β-lactamases (Fenselau *et al.*, 2008). La vancomycine est l'un des antibiotiques largement efficaces contre les infections causées par les agents pathogènes multirésistants (ex : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline SARM) (Faron *et al.*, 2016). Ainsi, la

Discussion

résistance à la vancomycine est considérée comme l'une des préoccupations majeures au choix des probiotiques (Woodford *et al.*, 1995). La plupart des isolats sélectionnés se sont révélés sensibles à la vancomycine, à l'exception de F10, Dj16, Dj17, BS16, SSI5 et J4. Avec des études récentes, il a été révélé que les bactéries des milieux naturels non pathogènes développent divers mécanismes et des gènes de résistance aux antibiotiques (Riesenfeld *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2009; Donato *et al.*, 2010). Néanmoins, d'autres études doivent être réalisées pour vérifier la présence de gènes de résistance dans les plasmides qui peuvent être transmis par conjugaison afin d'éviter le transfert horizontal aux microorganismes du microbiote gastro-intestinal et aux bactéries pathogènes lorsqu'ils sont administrés comme probiotiques.

L'adhérence est un autre caractère important des propriétés de la surface cellulaire. Ces dernières sont considérées comme un indice fiable et contribue à l'efficacité de la colonisation, aux interactions non spécifiques avec le système gastro-intestinal de l'hôte et le microbiote intestinal (Ubbink and Schär-Zammaretti, 2003). Ceci affecte leur survie et leurs interactions avec leur propre espèce et avec d'autres bactéries (Lebeer *et al.*, 2008). Par conséquent, les critères tels que l'auto-agrégation, la co-agrégation, le récepteur d'électrons et l'hydrophobicité ont été évalués dans le présent travail.

L'auto-agrégation est une propriété recherchée qui présente la capacité des probiotiques à s'agréger aux autres membres de la même espèce et peut être observée microscopiquement pour la formation d'amas bactériens (Trunk *et al.*, 2018). L'agrégat de certains probiotiques peut exercer un effet bénéfique sur l'hôte, en empêchant les pathogènes d'atteindre la surface muqueuse pour coloniser ce dernier (Crowe *et al.*, 1996). Les isolats sélectionnés ont montré des pourcentages élevés d'auto-agrégation allant de 90 à 100%. D'autre part, la co-agrégation est la capacité des probiotiques à s'agréger avec des agents pathogènes et peut jouer un rôle dans l'exclusion des microorganismes pathogènes (Turpin *et al.*, 2012; Nithya and Halami 2013). En outre, Collado *et al.*, (2008) a rapporté que les organismes non co-aggrégants sont facilement éliminés du système gastro-intestinal (Collado *et al.*, 2008). Dans le présent travail, la co-agrégation des isolats a été évaluée contre *E. coli* (ATCC25922). Les isolats obtenus ont montré des propriétés de liaison élevées et des capacités d'adhésion aux agents pathogènes. Une autre caractéristique de surface est l'adhérence bactérienne à l'hôte (cellules muqueuses ou épithéliales) qui peut refléter l'efficacité de colonisation du système gastro-intestinal, la capacité d'exclure les agents pathogènes et de favoriser l'immunomodulation (Collado *et al.*, 2008; Ekmecki *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2009; Turpin *et al.* 2012). L'évaluation de l'hydrophobicité est considérée comme un déterminant majeur de l'adhésion aux cellules

Discussion

épithéliales de l'intestin, et du potentiel de formation de biofilm (Schillinger *et al.*, 2005; Ekmekci *et al.*, 2009). Pour évaluer le potentiel d'adhérence des isolats sélectionnés aux surfaces, deux solvants ont été utilisés ; le xylène, un solvant apolaire qui reflète l'hydrophobicité de la surface cellulaire, et le chloroforme (solvant basique) pour la mesure du donneur d'électrons. Les isolats sélectionnés présentaient des valeurs de BATH allant de 1 à 100% où les plus hauts pourcentages présentent une forte affinité pour le xylène et au chloroforme.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

L'objectif initial de cette étude est l'exploration d'écosystèmes particuliers, pauvres en matière organique pour la recherche et l'isolement de Bactéries sporulantes organotrophes développant de potentialités diverses en rapport avec la santé de l'homme. En effet, des isolats du genre *Bacillus* ont été obtenus à partir de sédiments de grottes, de différentes régions Algériennes, qualifiées d'écosystèmes souterrains. Ces isolats ont été criblés pour leur capacité à produire des enzymes extracellulaires et pour leurs potentialités probiotiques.

L'isolement des bactéries du genre *Bacillus*, à partir des grottes, conclue que des Bactéries de type trophique organotrophe peuvent supporter les conditions si difficiles et particulières de ces écosystèmes, ce qui constitue une approche nouvelle à exploiter.

Treize isolats identifiés définitivement dans la présente étude ont montré une capacité à dégrader deux substrats causant des troubles gastriques les plus courants en l'occurrence ; le lactose et la gliadine et ce, grâce à la production de bêta-galactosidase et de gliadinase, enzymes extracellulaires qualifiées d'enzymes digestives. En outre, cette étude a montré, dans les conditions *in vitro*, que ces isolats manifestent une résistance aux conditions de suc gastrique et du liquide intestinal, ce qui leur confère l'aptitude probiotique. Pour ce faire, les tests du *safety assessment* (activité γ -hémolytique positive et un lécithinase négatif) permettent, *a priori*, de les reconnaître, généralement, comme sans danger. De ce fait, ces enzymes, peuvent servir dans la prévention des effets indésirables de l'indigestion du lactose et de la gliadine chez les patients intolérants à ces produits. Ces potentialités procurent aux isolats sélectionnés des utilités certaines, permettant de développer de nouvelles stratégies et de vision quant à l'introduction des *Bacillus* des milieux oligotrophes dans la filière probiotique.

Au terme de cette si importante recherche, certains points demeurent incomplets et d'autres ont surgi, ce qui constitue des fenêtres pour une recherche future en particuliers :

1. Etude des propriétés probiotiques *in vivo* des isolats sélectionnés ;
2. Etude approfondie des protéases produites par les isolats ;
3. Recherche de la présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans les plasmides chez les isolats ;
4. Prévoir une approche métagénomique des sédiments de grottes pour cribler des gènes d'intérêt ;
5. Production des isolats en *scaling up* et développement de produit fini formulé.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Aarti C, Khusro A, Varghese R, et al (2017) In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. *LWT - Food Sci Technol* 86:438–446. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.055>
- Abdelmoteleb A, Troncoso-Rojas R, Gonzalez-Soto T, González-Mendoza D (2017) Antifungal activity of autochthonous *Bacillus subtilis* isolated from *prosopis juliflora* against phytopathogenic fungi. *Mycobiology* 45:385–391. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.4.385>
- AFNOR, 31-103 NNX (1989) Détermination du pH dans l'eau, Méthode électrométrique. AFNOR Ed 1989:3–10
- Agamennone V, Krul CAM, Rijkers G, Kort R (2019) A practical guide for probiotics applied to the case of antibiotic-associated diarrhea in the Netherlands. *Pharm Weekbl* 154:17–24
- Ahamada Rachid N, Doğruöz Güngör N (2022) Screening of bioactive compounds for biomedical and industrial uses from Actinobacteria isolated from the Parsik Cave (Turkey). *Johnson Matthey Technol Rev*. <https://doi.org/10.1595/205651322X16482034395036>
- Allen HK, Cloud-Hansen KA, Wolinski JM, et al (2009a) Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA Cell Biol* 28:109–117. <https://doi.org/10.1089/dna.2008.0812>
- Allen MA, Goh F, Burns BP, Neilan BA (2009b) Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay. *Geobiology* 7:82–96. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2008.00187.x>
- Alvarez-Sieiro P, Redruello B, Ladero V, et al (2015) Solubilization of gliadins for use as a source of nitrogen in the selection of bacteria with gliadinase activity. *Food Chem* 168:439–444. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.085>
- Amann RI (1995) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Mol Microb Ecol Man* 4:331–345. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0351-0_23
- Amorim JC, Piccoli RH, Duarte WF (2018a) Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Res Int* 107:518–527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.054>
- Amorim JC, Piccoli RH, Duarte WF (2018b) Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Res Int* 107:518–527. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.054>
- Angelis M De, Rizzello CG, Fasano A, et al (2006) VSL#3 probiotic preparation has the capacity to hydrolyze gliadin polypeptides responsible for Celiac Sprue. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1762:80–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.09.008>
- Armstrong I, Omoregie N, Senian YE, et al (2016) SHORT COMMUNICATION Screening

- for Urease-Producing Bacteria from Limestone Caves of Sarawak. *Borneo J Resour Sci Technol* 6:37–45
- Ashayerizadeh O, Dastar B, Samadi F, et al (2017) Study on the chemical and microbial composition and probiotic characteristics of dominant lactic acid bacteria in fermented poultry slaughterhouse waste. *Waste Manag* 65:178–185.
<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.04.017>
- Bae JM (2018) Prophylactic efficacy of probiotics on travelers' diarrhea: an adaptive meta-analysis of randomized controlled trials. *Epidemiol Health* 40:e2018043.
<https://doi.org/10.4178/EPIH.E2018043>
- Bakshi A, Stephen S, Borum ML, Doman DB (2012) Emerging therapeutic options for celiac disease: Potential alternatives to a gluten-free diet. *Gastroenterol Hepatol* 8:582–588
- Barton HA, Jurado V (2007) What's Up Down There? Microbial Diversity in Caves
Microorganisms in caves survive under nutrient-poor conditions and are metabolically versatile and unexpectedly diverse. *Microbe* 2:132–138
- Bastian F, Jurado V, Nováková A, et al (2010) The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology* 156:644–652. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036160-0>
- BAUER, AW (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 45:149–158
- Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss CJ (1996) Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 7:47–53.
[https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)
- Belyagoubi L, Belyagoubi-Benhammou N, Jurado V, et al (2018) Antimicrobial activities of culturable microorganisms (Actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. *Int J Speleol* 47:189–199. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.47.2.2148>
- Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, et al (2015) Tackling antibiotic resistance: The environmental framework. *Nat Rev Microbiol* 13:310–317.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Berger-Bächli B (2002) Resistance mechanisms of gram-positive bacteria. *Int J Med Microbiol* 292:27–35. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00185>
- Berger M, Sarantopoulos C, Ongchangco D, et al (2015) Rapid isolation of gluten-digesting bacteria from human stool and saliva by using gliadin-containing plates. *Exp Biol Med* 240:917–924. <https://doi.org/10.1177/1535370214564748>
- Bhakta JN, Ohnishi K, Munekage Y, Iwasaki K (2010) Isolation and probiotic characterization of arsenic-resistant lactic acid bacteria for uptaking arsenic. *World Acad Sci Eng Technol* 71:470–477. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1083023>
- Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, et al (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7:1–11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>

- Bouabdellah M, Slack JF (2016) Mineral Deposits of North Africa
- Brigidi P, Vitali B, Swennen E, et al (2001) Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. *Res Microbiol* 152:735–741. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01254-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01254-2)
- Brown MG, Balkwill DL (2009) Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microb Ecol* 57:484–493. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9431-6>
- Butel MJ (2014) Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine Mal Infect* 44:1–8. <https://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2013.10.002>
- Camarca A, Anderson RP, Mamone G, et al (2009) Intestinal T Cell Responses to Gluten Peptides Are Largely Heterogeneous: Implications for a Peptide-Based Therapy in Celiac Disease. *J Immunol* 182:4158–4166. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803181>
- Cassone M, Serra P, Mondello F, et al (2003) Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* Subtype *boulardii* Fungemia in Patients Neighboring Those Treated with a Probiotic Preparation of the Organism. *J Clin Microbiol* 41:5340–5343. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5340-5343.2003/ASSET/E900490F-A7CC-40ED-8F87-9DE7EFC21AA4/ASSETS/GRAPHIC/JM1130171002.JPEG>
- Casula G, Cutting SM (2002) *Bacillus* probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 68:2344–2352. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2344-2352.2002/ASSET/457D8B94-4B6E-4B76-B6B1-EF53695403D2/ASSETS/GRAPHIC/AM0521491007.JPEG>
- Chun E, Yoon S, Parveen A, Jin M (2018) Alleviation of irritable bowel syndrome-like symptoms and control of gut and brain responses with oral administration of *Dolichos Lablab* L. In a mouse model. *Nutrients* 10:. <https://doi.org/10.3390/nu10101475>
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol* 226:1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- Collignon B (1992) La spéléologie en Algérie. *Spelunca* n°24 14–24
- Collignon B (1991) Les principaux karst d'Algérie. In: Acte du 9eme congrès national de la SSS. pp 37–43
- Committee ES (2014) Scientific Opinion on a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for the safety assessment of botanicals and botanical preparations. *EFSA J* 12:1–38. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3593>
- Courbon, P. Chabert C (1986) Atlas des grandes cavités mondiales. Publié avec le concours l'Union Int Spéléologie la Fédération Fr Spéléologie
- Criselda Percival G, Chamundeeswari M, Rachel Lovlyna F, et al (2019) Production and partial purification of β -galactosidase enzyme from probiotic *Bacillus subtilis* SK09. *Indian J Biotechnol* 18:139–144

- Crowe LM, Reid DS, Crowe JH (1996) Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J* 71:2087–2093. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79407-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79407-9)
- Cutting SM (2011a) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28:214–220. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- Cutting SM (2011b) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28:214–220. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.03.007>
- Dainese-Plichon R, Schneider S, Piche T, Hébuterne X (2014) Malabsorption et intolérance au lactose chez l'adulte. *Nutr Clin Métabolisme* 28:46–51. <https://doi.org/10.1016/J.NUPAR.2013.12.002>
- Dale HF, Rasmussen SH, Asiller ÖÖ, Lied GA (2019) Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutr* 2019, Vol 11, Page 2048 11:2048. <https://doi.org/10.3390/NU11092048>
- De Conno B, Pesce M, Chiurazzi M, et al (2022) Nutraceuticals and Diet Supplements in Crohn's Disease: A General Overview of the Most Promising Approaches in the Clinic. *Foods* 2022, Vol 11, Page 1044 11:1044. <https://doi.org/10.3390/FOODS11071044>
- De Mandal S, Chatterjee R, Kumar NS (2017) Dominant bacterial phyla in caves and their predicted functional roles in C and N cycle. *BMC Microbiol* 17:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1002-x>
- De Re V, Caggiari L, Tabuso M, Cannizzaro R (2013) The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. *Clin Biochem* 46:552–560. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2012.10.038>
- de Sousa Moraes LF, Grzeskowiak LM, de Sales Teixeira TF, do Carmo Gouveia Peluzio M (2014) Intestinal microbiota and probiotics in celiac disease. *Clin Microbiol Rev* 27:482–489. <https://doi.org/10.1128/CMR.00106-13>
- De Souza Oliveira RP, Perego P, Converti A, De Oliveira MN (2009) Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin. *LWT - Food Sci Technol* 42:1015–1021. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2009.01.002>
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol* 31:438–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
- Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, et al (2008) Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. *Curr Issues Mol Biol* 2008, Vol 10, Pages 37-54 10:37–54. <https://doi.org/10.21775/CIMB.010.037>
- Donato JJ, Moe LA, Converse BJ, et al (2010) Metagenomic analysis of apple orchard soil reveals antibiotic resistance genes encoding predicted bifunctional proteins. *Appl Environ Microbiol* 76:4396–4401. <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-09>
- Donkor ON, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP (2007) Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting

- enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait* 87:21–38.
<https://doi.org/10.1051/LAIT:2006023>
- Driks A (2002) Overview: Development in bacteria: Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci* 59:389–391. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8430-x>
- Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, et al (2004) Characterization of *Bacillus* Probiotics Available for Human Use. *Appl Environ Microbiol* 70:2161–2171.
<https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004>
- Duc LH, Hong HA, Cutting SM (2003) Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Vaccine* 21:4215–4224.
[https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00492-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00492-4)
- Duchaufour Ph (1991) Pédologie. Sol, végétation, environnement. In: Calow P (ed) *Handbook of ecotoxicology*, Blackwell., p 397
- Ekmekci H, Aslim B, Ozturk S (2009) Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 53:59–65.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2009.00115.x>
- Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, et al (2017) *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol* 8:1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01490>
- Enache, M., & Faghi AM (1999) Detection of extracellular halophilic amylase activity from the extreme halophilic genus *Haloferax*. *Proc Inst Biol* 143–146
- Erkut C, Penkov S, Khesbak H, et al (2011) Trehalose renders the dauer larva of *Caenorhabditis elegans* resistant to extreme desiccation. *Curr Biol* 21:1331–1336.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.064>
- Eslami M, Youse B, Kokhaei P, Moghadas AJ (2019) Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Are probiotics useful for therapy of *Helicobacter pylori* diseases ? 64:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.02.010>
- Fakhry S, Sorrentini I, Ricca E, et al (2008) Characterization of spore forming *Bacilli* isolated from the human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 105:2178–2186.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03934.x>
- Fan H, Du J, Liu X, et al (2019) Effects of pentasa-combined probiotics on the microflora structure and prognosis of patients with inflammatory bowel disease. *Turkish J Gastroenterol* 30:680. <https://doi.org/10.5152/TJG.2019.18426>
- Fares C, Menga V, Martina A, et al (2015) Nutritional profile and cooking quality of a new functional pasta naturally enriched in phenolic acids, added with β -glucan and *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. *J Cereal Sci* 65:260–266.
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.07.017>
- Faron ML, Ledebner NA, Buchan BW (2016) Resistance mechanisms, epidemiology, and approaches to screening for vancomycin-resistant *Enterococcus* in the health care setting. *J Clin Microbiol* 54:2436–2447. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-16>

Références bibliographiques

- Favier C, Neut C, Mizon C, et al (1996) Differentiation and identification of human faecal anaerobic bacteria producing β -galactosidase (a new methodology). *J Microbiol Methods* 27:25–31. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(96\)00925-6](https://doi.org/10.1016/0167-7012(96)00925-6)
- Fedorak RN, Feagan BG, Hotte N, et al (2015) The probiotic vsl#3 has anti-inflammatory effects and could reduce endoscopic recurrence after surgery for crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 13:928-935.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2014.10.031>
- Fenselau C, Havey C, Teerakulkittipong N, et al (2008) Identification of β -lactamase in antibiotic-resistant *Bacillus cereus* spores. *Appl Environ Microbiol* 74:904–906. <https://doi.org/10.1128/AEM.00788-07>
- Fernandez-Feo M, Wei G, Blumenkranz G, et al (2013) The cultivable human oral gluten-degrading microbiome and its potential implications in coeliac disease and gluten sensitivity. *Clin Microbiol Infect* 19:. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12249>
- Fiocchi A, Martelli A, De Chiara A, et al (2003) Primary dietary prevention of food allergy. *Ann Allergy, Asthma Immunol* 91:3–13. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)62050-9](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)62050-9)
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention* 5:1–34
- Food E, Authority S (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J* 10:1–10. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>
- Forsythe P, Bienenstock J (2010) Immunomodulation by Commensal and Probiotic Bacteria. <https://doi.org/103109/08820131003667978> 39:429–448. <https://doi.org/10.3109/08820131003667978>
- Frère J-M, Rigali S (2016) The alarming increase in antibiotic-resistant bacteria. *Drug Target Rev*
- Fuller R (2001) Handbook of Probiotics. *Int J Food Sci Technol* 36:224–224. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2001.00460.x>
- Ganji-Arjenaki M, Rafieian-Kopaei M (2018) Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J Cell Physiol* 233:2091–2103. <https://doi.org/10.1002/jcp.25911>
- Garcia Vilela E, De Lourdes De Abreu Ferrari M, Oswaldo Da Gama Torres H, et al (2008) Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scand J Gastroenterol* 43:842–848. <https://doi.org/10.1080/00365520801943354>
- Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G (2015) Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *ISME J* 9:207–216. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.106>
- Giralt J, Regadera JP, Verges R, et al (2008) Effects of Probiotic *Lactobacillus Casei* DN-114 001 in Prevention of Radiation-Induced Diarrhea: Results From Multicenter,

Références bibliographiques

- Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Trial. *Int J Radiat Oncol* 71:1213–1219.
<https://doi.org/10.1016/J.IJROBP.2007.11.009>
- Gozzetti A, Le Beau MM (2000) Fluorescence in situ hybridization: Uses and limitations. *Semin Hematol* 37:320–333. [https://doi.org/10.1016/S0037-1963\(00\)90013-1](https://doi.org/10.1016/S0037-1963(00)90013-1)
- Griffiths RI, Whiteley AS, O'Donnell AG, Bailey MJ (2000) Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl Environ Microbiol* 66:5488–5491. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000>
- Groth I, Vettermann R, Schuetze B, et al (1999) Actinomycetes in Karstic caves of northern Spain (Altamira and Tito Bustillo). *J Microbiol Methods* 36:115–122. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00016-0)
- Guarner F, Schaafsma GJ (1998) Probiotics. *Int J Food Microbiol* 39:237–238. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00136-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0)
- Gueimonde M, Sánchez B, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A (2013) Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol* 4:1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>
- Gunn J (2004) *Encyclopedia of Caves and Karst Science*
- H. Askri, A. Belmecheri, B. Benrabah, A. Boudjema, K. Boumendjel, M. Daoudi MD, T. Ghalem, A. M. Docca, H. Ghandriche, A. Ghomari, N. Guellati MK, R. Lounici, H. Naili, D. Takherist MT (2000) Géologie de l'Algérie, Contribution de SONATRACH Division Exploration, Centre de Recherche et Développement et Division Petroleum Engineering et Développement. S C H L U M B E R G E R W E C S O N A T R A C H
- Harwood CR (1989) *Bacillus, Biotechnology handb...*
- Herbrecht R, Nivoix Y (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Adverse Effect of *Saccharomyces boulardii* Probiotic Administration. *Clin Infect Dis* 40:1635–1637. <https://doi.org/10.1086/429926>
- Herrmann H, Bucksch H (2014) *Cone Karst*
- Hong HA, Khaneja R, Tam NMK, et al (2009a) *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res Microbiol* 160:134–143. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2008.11.002>
- Hong HA, Khaneja R, Tam NMK, et al (2009b) *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Res Microbiol* 160:134–143. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.11.002>
- Horikoshi K (1999) Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:735–750. <https://doi.org/10.1128/mmbr.63.4.735-750.1999>
- Hu S, Cao X, Wu Y, et al (2018) Effects of probiotic *Bacillus* as an alternative of antibiotics on digestive enzymes activity and intestinal integrity of piglets. *Front Microbiol* 9:2427. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02427/BIBTEX>
- Huang Y, Adams MC (2004) In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of

Références bibliographiques

- potential probiotic dairy propionibacteria. *Int J Food Microbiol* 91:253–260.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.001>
- Hyronimus B, Le Marrec C, Hadj Sassi A, Deschamps A (2000) Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 61:193–197.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00366-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00366-4)
- Ishibashi N, Yamazaki S (2001) Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 73:465s-470s.
<https://doi.org/10.1093/AJCN/73.2.465S>
- ISO 11265 (1994) Soil quality — Determination of the specific electrical conductivity.
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/7303276e-d089-486b-afe5-a90b75fe8831/iso-11265-1994>. Accessed 11 Oct 2022
- Ivarsson A (2005) The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach—some lessons to be learnt. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19:425–440. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2005.02.005>
- Jayawardana IA, Montoya CA, McNabb WC, Boland MJ (2019) Possibility of minimizing gluten intolerance by co-consumption of some fruits – A case for positive food synergy? *Trends Food Sci Technol* 94:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.10.003>
- Jurado V, Boiron P, Kroppenstedt RM, et al (2008) *Nocardia altamirensis* sp. nov., isolated from Altamira Cave, Cantabria, Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:2210–2214.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65482-0>
- Kalakuntla AS, Nalakonda G, Nalakonda K, et al (2019) Probiotics and *Clostridium Difficile*: A Review of Dysbiosis and the Rehabilitation of Gut Microbiota. *Cureus* 11:.
<https://doi.org/10.7759/CUREUS.5063>
- Kang CH, Gu T, So JS (2018) Possible probiotic lactic acid bacteria isolated from oysters (*Crassostrea gigas*). *Probiotics Antimicrob Proteins* 10:728–739.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9315-5>
- Kappelmann N, Lewis G, Dantzer R, et al (2017) Antidepressant activity of anti-cytokine treatment: A systematic review and meta-analysis of clinical trials of chronic inflammatory conditions. *Brain Behav Immun* 66:e2.
<https://doi.org/10.1016/J.BBI.2017.07.023>
- Khare A, Thorat G, Bhimte A, Yadav V (2018) Mechanism of action of prebiotic and probiotic. ~ 51 ~ *J Entomol Zool Stud* 6:51–53
- Klimchouk A, Lowe D, Cooper A, Sauro U (1996) Gypsum karst of the world. *Int journal speleology* 25 (3–4):
- Koning F (2012) Celiac disease: Quantity matters. *Semin Immunopathol* 34:541–549.
<https://doi.org/10.1007/s00281-012-0321-0>
- Konuray G, Erginkaya Z (2018) Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. *Foods* 7:.
<https://doi.org/10.3390/foods7060092>
- Kuktaite R, Newson WR, Rasheed F, et al (2016) Monitoring Nanostructure Dynamics and Polymerization in Glycerol Plasticized Wheat Gliadin and Glutenin Films: Relation to

- Mechanical Properties. ACS Sustain Chem Eng 4:2998–3007.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b01667>
- Kumar, D. J. M. ; Sudha, M. ; Devika, S. ; Balakumaran, M. D. ; Kumar, M. R. ; Kalaichelvan PT (2012) Production and optimization of β -galactosidase by *Bacillus* sp. MPTK 121, isolated from dairy plant soil. Ann Biol Res Vol.3:pp.1712-1718 ref.28
- Kunduhoglu B, Hacıoglu S (2021) Probiotic Potential and Gluten Hydrolysis Activity of *Lactobacillus brevis* KT16-2. Probiotics Antimicrob Proteins 13:720–733.
<https://doi.org/10.1007/s12602-020-09723-x>
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- LANE DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid Tech Bact Syst 115–175
- Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y (2012) *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. PLoS One 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030744>
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ (2008) Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. Microbiol Mol Biol Rev 72:728–764.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00017-08/ASSET/8FEC1D2F-E9DD-4E91-971E-C912C6B27934/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0040821960004.JPEG>
- Lee A, Cheng KC, Liu JR (2017a) Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential. PLoS One 12:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182220>
- Lee CS, Kim SH (2020) Anti-inflammatory and Anti-osteoporotic Potential of *Lactobacillus plantarum* A41 and *L. fermentum* SRK414 as Probiotics. Probiotics Antimicrob Proteins 12:623–634. <https://doi.org/10.1007/S12602-019-09577-Y/FIGURES/5>
- Lee S, Lee J, Jin YI, et al (2017b) Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. LWT - Food Sci Technol 79:518–524.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.040>
- Liévin-Le Moal V, Servin AL (2014) Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: From probiotics to gastrointestinal anti- infectious biotherapeutic agents. Clin Microbiol Rev 27:167–199.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00080-13/ASSET/982A1DA6-E339-413F-886D-E481C78D12E3/ASSETS/GRAPHIC/ZCM9990924530004.JPEG>
- Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. Science (80-) 147:747–748.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.147.3659.747>
- Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, et al (2008) Live probiotic *Bifidobacterium lactis* bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. Clin Exp Immunol 152:552–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03635.x>
- Liong MT (2008) Safety of probiotics: translocation and infection. Nutr Rev 66:192–202.
<https://doi.org/10.1111/J.1753-4887.2008.00024.X>

Références bibliographiques

- Liu MM, Li ST, Shu Y, Zhan HQ (2017) Probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea: A meta-Analysis of randomized controlled trials. *PLoS One* 12:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178870>
- Logan NA, Berge O, Bishop AH, et al (2009) Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59:2114–2121. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.013649-0/CITE/REFWORKS>
- Lovell RM, Ford AC (2012) Global Prevalence of and Risk Factors for Irritable Bowel Syndrome: A Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10:712-721.e4. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2012.02.029>
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, et al (2004) ARB: A software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* 32:1363–1371. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh293>
- Maity C, Gupta, PhD AK, Saroj DB, et al (2020) Impact of a Gastrointestinal Stable Probiotic Supplement *Bacillus coagulans* LBSC on Human Gut Microbiome Modulation. *J Diet Suppl* 0:1–20. <https://doi.org/10.1080/19390211.2020.1814931>
- Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, et al (2019) Evaluation of the in vitro cholesterol-lowering activity of the probiotic strain *Bacillus coagulans* MTCC 5856. *Int J Food Sci Technol* 54:212–220. <https://doi.org/10.1111/IJFS.13926>
- Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, et al (2006) Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol* 157:241–247. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2005.09.002>
- Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, et al (2006) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int Dairy J* 16:189–199. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.009>
- Marteau P (2006) Probiotics, prebiotics, synbiotics: ecological treatment for inflammatory bowel disease? *Gut* 55:1692–1693. <https://doi.org/10.1136/GUT.2004.051458>
- Marteau P, Rambaud J-C (1993) Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol Rev* 12:207–220. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.1993.TB00019.X>
- Martín R, Miquel S, Ulmer J, et al (2014) Gut ecosystem: how microbes help us. *Benef Microbes* 5:219–233. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0057>
- Matarante A, Baruzzi F, Cocconcelli PS, Morea M (2004) Genotyping and toxigenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains occurring in industrial and artisanal cured sausages. *Appl Environ Microbiol* 70:5168–5176. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5168-5176.2004>
- Matei G, Matei S, Mocanu V (2016) Isolation of New Probiotic Microorganisms From Soil and Screening for Their Antimicrobial Activity. 15:21–26. <https://doi.org/10.15551/fppzt.v15i1.524>
- Meier H, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH (1999) Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G+C content.

- Syst Appl Microbiol 22:186–196. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80065-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80065-4)
- Miller JH (1972) Experiments in molecular genetics
- Mirashrafi S, Moravejolahkami AR, Balouch Zehi Z, et al (2021) The efficacy of probiotics on virus titres and antibody production in virus diseases: A systematic review on recent evidence for COVID-19 treatment. *Clin Nutr ESPEN* 46:1–8. <https://doi.org/10.1016/J.CLNESP.2021.10.016>
- Mitelmão FCR, Bergamaschi C de C, Gerenutti M, et al (2021) The effect of probiotics on functional constipation in adults: Double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Medicine (Baltimore)* 100:e24938. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000024938>
- Mohkam M, Nezafat N, Berenjian A, et al (2016) Identification of Bacillus Probiotics Isolated from Soil Rhizosphere Using 16S rRNA, recA, rpoB Gene Sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics Antimicrob Proteins* 8:8–18. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9208-z>
- Montalto M, Curigliano V, Santoro L, et al (2006) Management and treatment of lactose malabsorption. *World J Gastroenterol* 12:187. <https://doi.org/10.3748/WJG.V12.I2.187>
- Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, et al (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:6463–6472. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09978-7/FIGURES/1>
- Montijo-prieto S De, Ruiz-l M, Ruiz-bravo A (2015) A Lactobacillus plantarum strain isolated from kefir protects against intestinal infection with Yersinia enterocolitica O9 and modulates immunity in mice. 166:626–632. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.010>
- Morelli L (2007) In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. *Int Dairy J* 17:1278–1283. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2007.01.015>
- Mostafa AAF (2012) Caves of the Nile Valley (Governorate of Assiut, Middle Egypt): a long-term interaction between human societies and their environment. <http://journals.openedition.org/geomorphologie> 37–44. <https://doi.org/10.4000/GEOMORPHOLOGIE.9719>
- Müller G, Gastner M (1971) The “Karbonat-Bombe”, a simple device for the determination of carbonate content in sediment, soils, and other materials. *Neues Jahrb. für Mineral. - Monatshefte* 10:466–469
- Muneer F, Andersson M, Koch K, et al (2016) Innovative Gliadin/Glutelin and Modified Potato Starch Green Composites: Chemistry, Structure, and Functionality Induced by Processing. *ACS Sustain Chem Eng* 4:6332–6343. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00892>
- Munita JM, Bayer AS, Arias CA (2015) Evolving Resistance among Gram-positive Pathogens. *Clin Infect Dis* 61:S48–S57. <https://doi.org/10.1093/cid/civ523>
- Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Chenoll E, et al (2013) Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. *Br J Nutr* 109:. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005600>

Références bibliographiques

- Natarajan J, Christobell C, Mukesh Kumar DJ, et al (2012) Isolation and characterization of α -galactosidase producing *Bacillus* sp. from dairy effluent. *World Appl Sci J* 17:1466–1474
- Nithya V, Halami PM (2013) Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. *Ann Microbiol* 63:129–137. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0453-4>
- O'Toole PW, Cooney JC (2008) Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008:1–9. <https://doi.org/10.1155/2008/175285>
- Oh JH, Jang YS, Kang D, et al (2019a) Efficacy and Safety of New Lactobacilli Probiotics for Unconstipated Irritable Bowel Syndrome : *Nutrients* 11:2887
- Oh JH, Jang YS, Kang D, et al (2019b) Efficacy and Safety of New Lactobacilli Probiotics for Unconstipated Irritable Bowel Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutr* 2019, Vol 11, Page 2887 11:2887. <https://doi.org/10.3390/NU11122887>
- Pan D, Hill AP, Kashou A, et al (2011) Electrophoretic transfer protein zymography. *Anal Biochem* 411:277–283. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.015>
- Papista C, Gerakopoulos V, Kourelis A, et al (2012) Gluten induces coeliac-like disease in sensitised mice involving IgA, CD71 and transglutaminase 2 interactions that are prevented by probiotics. *Lab Invest* 92:625–635. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.13>
- Patel AK, Ahire JJ, Pawar SP, et al (2009) Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. *Food Res Int* 42:505–510. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.013>
- Pelto L, Isolauri E, Lillus EM, et al (1998) Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 28:1474–1479. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1998.00449.x>
- Peng M, Tabashsum Z, Anderson M, et al (2020) Effectiveness of probiotics, prebiotics, and prebiotic-like components in common functional foods. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 19:1908–1933. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12565>
- Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, et al (2004) Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci* 67:309–317. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.11.003>
- Perumal Jayaprabha Agaliya (2012) Screening of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented idli batter for probiotic properties. *African J Biotechnol* 11:12856–12864. <https://doi.org/10.5897/ajb12.1825>
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, et al (2005) Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 22:495–512. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2036.2005.02615.X>

- Pinto-Sanchez MI, Hall GB, Ghajar K, et al (2017) Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 153:448-459.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.05.003>
- Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al (2007) SILVA : a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. 35:7188–7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Qoiffait PE, Quinif Y (1977) La karstification de l'Azerou el Kebir (Algérie du Nord) Approche globale de la speleogenese du massif. *Bull la société d'Histoire Nat l'Afrique du Nord* 68:79–100
- Rashmi BS, Gayathri D (2017) Molecular characterization of gluten hydrolysing *Bacillus* sp. and their efficacy and biotherapeutic potential as probiotics using Caco-2 cell line. *J Appl Microbiol* 123:759–772. <https://doi.org/10.1111/jam.13517>
- Rashmi BS, Gayathri D, Vasudha M, et al (2020) Gluten hydrolyzing activity of *Bacillus* spp isolated from sourdough. *Microb Cell Fact* 19:1–11. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01388-z>
- Rautela R, Rawat S, Rawat R, et al (2017) Microbial diversity of Gumki cave and their potential role in enzyme production. *Environ Conserv J* 18:115–122. <https://doi.org/10.36953/ecj.2017.18315>
- Rewers M (2005) Epidemiology of celiac disease: What are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? *Gastroenterology* 128:S47–S51. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.030>
- Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J (2004) Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 6:981–989. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00664.x>
- Ritter AC, Paula A, Correa F, et al (2018) Characterization of *Bacillus subtilis* Available as Probiotics. *J Microbiol Res* 8:23–32. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20180802.01>
- Rizzello CG, De Angelis M, Di Cagno R, et al (2007) Highly efficient gluten degradation by lactobacilli and fungal proteases during food processing: New perspectives for celiac disease. *Appl Environ Microbiol* 73:4499–4507. <https://doi.org/10.1128/AEM.00260-07>
- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, et al (2000) Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84:197–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Salciarini D, Godt JW, Savage WZ, et al (2006) Modeling regional initiation of rainfall-induced shallow landslides in the eastern Umbria Region of central Italy. *Landslides* 3:181–194. <https://doi.org/10.1007/S10346-006-0037-0/TABLES/5>
- Savadogo A, Ouattara AC, Bassole HI, Traore SA (2009) Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African J Biotechnol* 5:. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i9.42771>
- Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, et al (2004) Phylogenetic diversity of

- bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonín and La Garma). *FEMS Microbiol Ecol* 47:235–247.
[https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00280-0](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00280-0)
- Schallmeyer M, Singh A, Ward OP (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol* 50:1–17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Schillinger U, Guigas C, Holzapfel WH (2005) In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *Int Dairy J* 15:1289–1297.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.12.008>
- Schoster A, Guardabassi L, Staempfli HR, et al (2016) The longitudinal effect of a multi-strain probiotic on the intestinal bacterial microbiota of neonatal foals. *Equine Vet J* 48:689–696. <https://doi.org/10.1111/evj.12524>
- Senapati S, Dash J, Sethi M, Chakraborty S (2020) Bioengineered probiotics to control SARS-CoV-2 infection. 2:0–3. <https://doi.org/10.3897/rio.6.e54802>
- Servin AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28:405–440.
<https://doi.org/10.1016/J.FEMSRE.2004.01.003>
- Shane AL, Cabana MD, Vidry S, et al (2010) Guide to designing, conducting, publishing, and communicating results of clinical studies involving probiotic applications in human participants. <https://doi.org/10.4161/gmic.1412707> 1:243–253.
<https://doi.org/10.4161/GMIC.1.4.12707>
- Sharma M, Wasan A, Sharma RK (2021) Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. *Food Biosci* 41:100993. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100993>
- Sharma PP, Gupta T, Schwager EE, et al (2014) Subdivision of arthropod cap-n-collar expression domains is restricted to Mandibulata. *Evodevo* 5:.
<https://doi.org/10.1186/2041-9139-5-3>
- Sharma S, Singh P (2014) Isolation and Characterization of -Galactosidase Enzyme Producing Microbe and Optimization of its Enzyme Activity under different culture condition. *IntJCurrMicrobiolAppSci* 3:148–155
- Shewale RN, Sawale PD, Khedkar CD, et al (2014) SELECTION CRITERIA FOR PROBIOTICS: A REVIEW. *Int J Probiotics Prebiotics* 9:17–22
- Shinde T, Vemuri R, Shastri MD, et al (2019a) Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *J Funct Foods* 52:100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.031>
- Shinde T, Vemuri R, Shastri MD, et al (2019b) Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *J Funct Foods* 52:100–108.
<https://doi.org/10.1016/J.JFF.2018.10.031>
- Simone C De, Ciardi A, Grassi A, et al (1992) Effect of *bifidobacterium bifidum* and *lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood b lymphocytes.

Références bibliographiques

- Immunopharmacol Immunotoxicol 14:331–340.
<https://doi.org/10.3109/08923979209009228>
- Singh K, Rao A (2021) Probiotics: A potential immunomodulator in COVID-19 infection management. *Nutr Res* 87:1–12. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2020.12.014>
- Singhal N, Maurya AK, Mohanty S, et al (2019) Evaluation of bile salt hydrolases, cholesterol-lowering capabilities, and probiotic potential of enterococcus faecium isolated from rhizosphere. *Front Microbiol* 10:1–9.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01567>
- Siraj NM, Sood K, Yadav RNS (2017) Isolation and Identification of Potential Probiotic Bacteria from Cattle Farm Soil in Dibrugarh District. *Adv Microbiol* 07:265–279.
<https://doi.org/10.4236/aim.2017.74022>
- Smecuol E, Hwang HJ, Sugai E, et al (2013) Exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effects of bifidobacterium infantis natrene life start strain super strain in active celiac disease. *J Clin Gastroenterol* 47:139–147.
<https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31827759ac>
- Sommer F, Bäckhed F (2013) The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol* 11:227–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2974>
- Son SH, Jeon HL, Jeon EB, et al (2017) Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* Ln4 from kimchi: Evaluation of β -galactosidase and antioxidant activities. *LWT - Food Sci Technol* 85:181–186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.018>
- Sornplang P, Piyadeatsoontorn S (2016) Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *J Anim Sci Technol* 58:1–11. <https://doi.org/10.1186/S40781-016-0108-2/TABLES/1>
- Stamatakis A, Ludwig T, Meier H (2005) RAxML-III : a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *21:456–463*.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti191>
- Sugita T, Kikuchi K, Makimura K, et al (2005) Trichosporon species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Appl Environ Microbiol* 71:7626–7629. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7626-7629.2005>
- Tam NKM, Uyen NQ, Hong HA, et al (2006) The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol* 188:2692–2700. <https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2692-2700.2006>
- Tamang JP, Shin DH, Jung SJ, Chae SW (2016a) Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front Microbiol* 7:578.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00578/BIBTEX>
- Tamang JP, Watanabe K, Holzapfel WH (2016b) Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front Microbiol* 7:.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Tamboli CP, Caucheteux C, Cortot A, et al (2003) Probiotics in inflammatory bowel disease: a critical review. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:805–820.

[https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00076-3)

- Thakur N (2016) Probiotics: Selection criteria, safety and role in health and disease Proteomic and Genomic insights into the effect of piperine and eugenol on biofilm formation in food borne *Cronobacter sakazakii* View project Bioactive peptide(s)/ Enzyme(s) production from whey for industrial application View project
- Thompson T, Méndez E (2008) Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal. *J Am Diet Assoc* 108:1682–1687. <https://doi.org/10.1016/J.JADA.2008.07.012>
- Tobias J, Olyaei A, Laraway B, et al (2022) *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* EVC001 Administration Is Associated with a Significant Reduction in the Incidence of Necrotizing Enterocolitis in Very Low Birth Weight Infants. *J Pediatr* 244:64-71.e2. <https://doi.org/10.1016/J.JPEDS.2021.12.070>
- Tomova I, Lazarkevich I, Tomova A, et al (2013) Diversity and biosynthetic potential of culturable aerobic heterotrophic bacteria isolated from Magura Cave, Bulgaria. *Int J Speleol* 42:65–76. <https://doi.org/10.5038/1827-806X.42.1.8>
- Toth M, Smith C, Frase H, et al (2010) An antibiotic-resistance enzyme from a deep-sea bacterium. *J Am Chem Soc* 132:816–823. <https://doi.org/10.1021/ja908850p>
- Trunk T, Khalil HS, Leo JC (2018) Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol* 4:140. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2018.1.140>
- Turpin W, Humblot C, Noordine ML, et al (2012) Lactobacillaceae and cell adhesion: Genomic and functional screening. *PLoS One* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038034>
- Ubbink J, Schär-Zammaretti P (2003) The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations. *Eur Cells Mater* 6:108
- Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I (2004) *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. *J Clin Gastroenterol* 38:S86–S90. <https://doi.org/10.1097/01.mcg.0000128925.06662.69>
- V. Decu, C. Jubethies, B. Collignon, Liberton B (2001) Encyclopaedia Biospeleologica Tome III. In: Juberthie, C. and VD (ed) Encyclopaedia Biospeleologica Tome III, III. Société de Biospéologie, Bucarest (ACADEMIE ROUMAINE, pp 1478–1496
- Van den Burg B (2003) Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol* 6:213–218. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00060-2)
- Vandooren J, Geurts N, Martens E, et al (2013) Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods* 10:211–220. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2371>
- Vasiljevic T, Shah NP (2008) Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J* 18:714–728. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2008.03.004>
- Vitali B, Minervini G, Rizzello CG, et al (2012) Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. *Food Microbiol* 31:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.027>

- Wagh SK, Gadge PP, Padul M V. (2018) Significant hydrolysis of wheat gliadin by bacillus tequilensis (10bT/HQ223107): A Pilot Study. *Probiotics Antimicrob Proteins* 10:662–667. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9331-5>
- Wells JM (2011) Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact* 10:1–15. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S17/FIGURES/4>
- West J, Logan RFA, Hill PG, Khaw KT (2007) The Iceberg of Celiac Disease: What Is Below the Waterline? *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:59–62. <https://doi.org/10.1016/J.CGH.2006.10.020>
- Woodford N, Jones BL, Baccus Z, et al (1995) Linkage of vancomycin and high-level gentamicin resistance genes on the same plasmid in a clinical isolate of enterococcus faecalis. *J Antimicrob Chemother* 35:179–184. <https://doi.org/10.1093/jac/35.1.179>
- Xu H, Jeong HS, Lee HY, Ahn J (2009) Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett Appl Microbiol* 49:434–442. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x>
- Yang Y, Li Z, Song W, et al (2019) Metagenomic insights into the abundance and composition of resistance genes in aquatic environments: Influence of stratification and geography. *Environ Int* 127:371–380. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.062>
- Zamakhchari M, Wei G, Dewhirst F, et al (2011) Identification of rothia bacteria as gluten-degrading natural colonizers of the upper gastro-intestinal tract. *PLoS One* 6:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024455>
- Zheng M, Zhang R, Tian X, et al (2017) Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Front Microbiol* 8:1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00908>
- Zielińska D, Kolożyn-Krajewska D, Laranjo M (2018) Food-Origin Lactic Acid Bacteria May Exhibit Probiotic Properties: Review. *Biomed Res Int* 2018:.. <https://doi.org/10.1155/2018/5063185>
- Zommiti M, Bouffartigues E, Maillot O, et al (2018) In vitro assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of pediococcus pentosaceus MZF16 isolated from artisanal tunisian meat "dried ossban. *Front Microbiol* 9:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02607>

ANNEXES

Annexe 1

Coloration de GRAM

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre ;
- Prélever un ose d'une colonie et mélanger avec la goutte d'eau physiologique, strier et fixer à la chaleur par passage rapide sur la flamme d'un bec benzène ;
- Ajouter le Violet de Gentiane pendant 1mn, jeter le colorant ;
- Ajouter le Lugol pendant 1mn ;
- Décolorer avec de l'alcool pendant 30 secondes ;
- Ajouter le deuxième colorant, la Fushine et laisser 1 mn puis laver à l'eau ;
- Sécher la lame et mettre une goutte d'huile à immersion puis passer à l'observation microscopique au grossissement X100.

ANNEXE 2

Composition des milieux de culture

Luria Bretani (LB)

Tryptone 10g

Extrait de levure 10g

NaCl 5g

Agar 5g

Egg yolk agar

Pancreatic digest of casein 10g

Beef extract 3g

Yeast extract 1g

Sodium chloride 15 g

Egg yolk emulsion 100ml

Setch Article Bacillus

Gélose Columbia (g/l)

Peptone 23 g

Amidon de maïs 1 g

Chlorure de sodium 5 g

Agar 10 g

Sang humain 5%

Tryptic soy agar (TSA)

Digestion pancréatique de caséine 15g

Digestion peptique de soja 5g

Chlorure de sodium 5g

Agar 15g

Annexe

Muller–Hinton

Infusion de viande 2,0

Hydrolysate de caséine 17,5

Amidon de maïs 1,5

Ca²⁺ 20 mg

Mg²⁺ 10 mg

ANNEXE 3

Composition des gels et solutions d'électrophorèses

Gel de séparation 13% :

Eau MiliQ : 3.2ml

Acry/Bis 30% : 2.67ml

Tris 1.5M, pH 8.8 : 2 ml

SDS 10% : 80 μ l

APS : 80 μ l

TEMED : 8 μ l

Gel de séparation 8% :

Eau MiliQ : 1.96 ml

Acry/Bis 30% : 1.64 ml

Tris 1.5M, pH 8.8 : 1.23 ml

SDS 10% : 50 μ l

APS : 50 μ l

TEMED : 5 μ l

Gel de concentration 10%

Eau MiliQ : 2.6 ml

Acry/Bis 30%: 1 ml

Tris 1.5M, pH 6.8: 1.25 ml

SDS 10%: 50 μ l

APS : 50 μ l

TEMED : 5 μ l

Gel de concentration 3%

Eau MiliQ : 0.78 ml

Acry/Bis 30%: 0.3 ml

Annexe

Tris 1.5M, pH 6.8: 0.375 ml

SDS 10%: 15 µl

APS: 15 µl

TEMED: 1.5 µl

Solution de migration pH 8

100 mmol/L de Tris

100 mmol/L d'HEPES

0,1% de SDS

Solution d'incubation de zymographie pH 7.5 (per 250ml)

1% Triton X-100, 2.5ml of 100%

12.5 ml de 1M Tris-HCl

625 µl de 1M CaCl₂

2.5 µl de 0.1M ZnCl₂

232 ml of H₂O

2ml of 2% NaN₃

Solution de rinçage de zymographie

6.25ml Triton X-100

12.5 ml de 1M Tris-HCl

625 µl de 1M CaCl₂

2.5 µl de 0.1M ZnCl₂

232 ml of H₂O

2ml of 2% NaN₃

ANNEXE 4

Composition des tampons

Tampon phosphate pH 7,2

Phosphate dipotassique d'hydrogène 1.1g

Dihydrophosphate de potassium 0.23g

Chlorure de sodium 8.5g

Tampon Z (par litre) :

0.06M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.04M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0.01M KCl

0.001M MgSO_4 ()

0.05M β -mercaptoethanol (BME)

RESUMÉS

Résumé

Nom : Rehamnia

Prénom : Baraa

Spécialité : Biotechnologie microbienne et Bioprocédés

Recherche et isolement de bactéries du genre *Bacillus* de différents écosystèmes particuliers algériens : étude de potentialités probiotiques et enzymatiques

Avec la découverte de nombreuses grottes sur la planète Mars et l'exploration de différents types de grottes sur Terre, l'intérêt et l'utilisation des microorganismes, qui représentent une des mémoires, de ces grottes ont, considérablement, augmenté au cours des dernières années. Aussi, le but de cette étude est de présenter les premiers résultats, de l'isolement des bactéries sporulantes cultivables, à partir de dix différentes grottes en Algérie, à des profondeurs allant jusqu'à 450 m.

En effet, deux cent cinquante isolats ont été obtenus de cet isolement et leur potentiel probiotique a été testé avec différentes méthodes en l'occurrence ; l'innocuité, la croissance à 37°C, la survie dans le suc gastrique et le liquide intestinal simulé, la sensibilité aux antibiotiques, la présence d'enzymes digestives telle que la β -galactosidase et la gliadinase et les propriétés de surface et adhésion cellulaire). Treize de ces isolats, appartenant soit, au genre *Bacillus* soit, au genre *Paenibacillus*, selon les analyses de FISH et de séquençage de l'ARNr 16S, ont montré un riche spectre de potentiel enzymatique et probiotique.

Les évaluations phylogénétiques ont révélé que tous les isolats sélectionnés sont affiliés aux différents taxa de *Bacilli* au sein de *Firmicutes* soient: *B. gobiensis*, *B. subtilis*, *B. tequilensis*, *B. zhangzhouensis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. simplex* et *P. pabuli*.

Les propriétés développées par ces souches et leurs enzymes en particulier, permettent de les présenter comme des candidats potentiels pour la transformation des aliments et de la réduction de l'effet des troubles digestifs. Ces résultats suggèrent, en outre, que les écosystèmes souterrains peuvent servir d'une source potentielle de bactéries à utilités Biotechnologiques avérées.

MOTS CLES : Ecosystèmes souterrains, géobiologie des grottes, intolérance au lactose, β -galactosidase, intolérance au gluten, probiotique, *Bacillus*, *Paenibacillus*.

Abstract

Nom : Rehamnia

Prénom : Baraa

Spécialité : Biotechnologie microbienne et Bioprocédés

Research and isolation of *Bacillus* genera from different particular Algerian Ecosystems: study of probiotic and enzymatic potentialities.

With the discovery of numerous caves on planet Mars and the exploration of different types of caves on Earth, the interest and use of cave microorganisms has increased significantly during the last years. Hence, the purpose of this study is to present the first novel data on the presence of culturable, spore-forming bacteria in 10 different caves in Algeria, at depths down to 450 m. Two hundred fifty spore-forming isolates were obtained and their probiotic potential was tested with different methods (pathogenicity, growth at 37°C, survival in gastric juice and simulated intestinal fluid, antibiotic sensitivity, presence of digestive enzymes such as β -galactosidase and gliadinase and cell surface properties). 13 of these tested strains (affiliated either to *Bacillus* or *Paenibacillus*, according to 16S rRNA analyses by FISH and gene sequencing) showed a rich spectrum of enzymatic and probiotic potential. These strains and their enzymes may therefore serve as useful candidates for future research in food processing and in reducing the effect of digestive disorders. These findings also suggest that novel strains with biotechnological potential can be discovered in pristine, subsurface ecosystems.

Phylogenetic evaluation revealed that all selected isolates are affiliated to different Bacilli taxa within Firmicutes: *B.gobiensis*, *B.subtilis*, *B.tequilensis*, *B.zhangzhouensis*, *B.pumilus*, *B.megaterium*, *B.simplex* and *B.pabuli*.

KEY WORDS Subsurface, cave geobiology, gliadinase, beta-galactosidase, lactose, probiotics, antibiotic resistance, spore-forming bacteria, *Bacillus*, *Paenibacillus*.

الاسم : براءة

اللقب: رحمانية

عزل بكتيريا من نوع *Bacillus* من نظم بيئية جزائرية خاصة: دراسة إمكانات البروبيوتيك و إنتاج الإنزيمات الخارجية

ملخص

مع اكتشاف العديد من الكهوف على كوكب المريخ واستكشاف أنواع مختلفة من الكهوف على الأرض، ازداد الاهتمام باستخدام الميكروبات الموجودة في الكهوف بشكل ملحوظ خلال السنوات الماضية. ومن ثم ، فإن الغرض من هذه الدراسة هو تقديم بيانات جديدة والأولى من نوعها لزراعة بكتيريا بروبيوتيك من 10 كهوف تصل إلى عمق 450 متر تحت سطح الأرض، من عدة مناطق مختلفة من الجزائر. تم الحصول على مائتين وخمسين عزلة مكونة للأبواغ وتم تقييم بعض قدراتها البروبيوتيكية (سلامتها للاستعمال، النمو في درجة حرارة 37 °C ، مقاومتها للظروف المحاكاة للمعدة والأمعاء، حساسيتها للمضادات الحيوية، قدراتها الانزيمية الهضمية كقدرتها على هضم اللاكتوز والجليادين، وخصائص سطح الخلية)

أظهرت 13 من هذه العزلات المختبرة (التي تم التأكد من هويتها على أنها من نوع *Bacillus* أو *Paenibacillus* بواسطة تقنية التهجين المشع الموقعي FISH و تسلسل القواعد الجين ARNr 16S) طيفا غنيا من الإمكانات الإنزيمية والبروبيوتيك. لذلك قد تمكن هذه السلالات و إنزيماتها إمكانات بحثية مستقبلية في معالجة أو تقليل تأثير اضرابات الجهاز الهضمي. تشير هذه النتائج أيضا إلى أنه يمكن اكتشاف سلالات جديدة ذات إمكانات تكنولوجية حيوية في النظم الإيكولوجية البكر تحت سطح الأرض.

الكلمات المفتاحية: الأنظمة البيئية تحت أرضية، بيوجيولوجيا الكهوف، البروبيوتيك، حساسية الغلوتين، حساسية اللاكتوز، لاكتوز، غليادين، *Bacillus* ، *Paenibacillus* .

Année universitaire : 2022-2023	Thèse présentée par : REHAMNIA Baraa																				
Pour l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle en Biotechnologie microbienne et bioprocédés																					
<u>Intitulé</u> Recherche et isolement de bactéries du genre <i>Bacillus</i> de différents écosystèmes particuliers algériens : étude de potentialités probiotiques et enzymatiques																					
<p>Avec la découverte de nombreuses grottes sur la planète Mars et l'exploration de différents types de grottes sur Terre, l'intérêt et l'utilisation des microorganismes, qui représentent une des mémoires, de ces grottes ont, considérablement, augmenté au cours des dernières années. Aussi, le but de cette étude est de présenter les premiers résultats, de l'isolement des bactéries sporulantes cultivables, à partir de dix différentes grottes en Algérie, à des profondeurs allant jusqu'à 450 m.</p> <p>En effet, deux cent cinquante isolats ont été obtenus de cet isolement et leur potentiel probiotique a été testé avec différentes méthodes en l'occurrence ; l'innocuité, la croissance à 37°C, la survie dans le suc gastrique et le liquide intestinal simulé, la sensibilité aux antibiotiques, la présence d'enzymes digestives (tel que la β-galactosidase et la gliadinase et les propriétés de surface et adhésion cellulaire). Treize de ces isolats, appartenant soit, au genre <i>Bacillus</i> soit, au genre <i>Paenibacillus</i>, selon les analyses de FISH et de séquençage de l'ARNr 16S, ont montré un riche spectre de potentiel enzymatique et probiotique.</p> <p>Les évaluations phylogénétiques ont révélé que tous les isolats sélectionnés sont affiliés aux différents taxa de <i>Bacilli</i> au sein de <i>Firmicutes</i> soient: <i>B. gobiensis</i>, <i>B. subtilis</i>, <i>B. tequilensis</i>, <i>B. zhangzhouensis</i>, <i>B. pumilus</i>, <i>B. megaterium</i>, <i>B. simplex</i> et <i>P. pabuli</i>.</p> <p>Les propriétés développées par ces souches et leurs enzymes en particulier, permettent de les présenter comme des candidats potentiels pour la transformation des aliments et de la réduction de l'effet des troubles digestifs. Ces résultats suggèrent, en outre, que les écosystèmes souterrains peuvent servir d'une source potentielle de bactéries à utilités Biotechnologiques avérées.</p>																					
Mots-clefs : Ecosystèmes souterrains, géobiologie des grottes, intolérance au lactose, β -galactosidase, intolérance au gluten, probiotique, <i>Bacillus</i> , <i>Paenibacillus</i> .																					
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (Université Frères Mentouri, Constantine 1).																					
Jury <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 20%;">Président :</td> <td style="width: 30%;">Khedara Abdelkarim</td> <td style="width: 15%;">MCA</td> <td style="width: 35%;">Université Frères Mentouri, Constantine 1.</td> </tr> <tr> <td>Directeur de thèse :</td> <td>KACEM CHAOUICHE Noredine</td> <td>Professeur</td> <td>Université Frères Mentouri, Constantine 1.</td> </tr> <tr> <td>Co-directeur de thèse :</td> <td>LEE Natuschka</td> <td>Professeur</td> <td>Umea University, Sweden.</td> </tr> <tr> <td>Examineur 1 :</td> <td>MIHOUBI Ilhem</td> <td>Professeur</td> <td>Université Frères Mentouri, Constantine 1.</td> </tr> <tr> <td>Examineur 2 :</td> <td>AITKAKI Asma</td> <td>MCA</td> <td>Université de Boumerdes.</td> </tr> </table>		Président :	Khedara Abdelkarim	MCA	Université Frères Mentouri, Constantine 1.	Directeur de thèse :	KACEM CHAOUICHE Noredine	Professeur	Université Frères Mentouri, Constantine 1.	Co-directeur de thèse :	LEE Natuschka	Professeur	Umea University, Sweden.	Examineur 1 :	MIHOUBI Ilhem	Professeur	Université Frères Mentouri, Constantine 1.	Examineur 2 :	AITKAKI Asma	MCA	Université de Boumerdes.
Président :	Khedara Abdelkarim	MCA	Université Frères Mentouri, Constantine 1.																		
Directeur de thèse :	KACEM CHAOUICHE Noredine	Professeur	Université Frères Mentouri, Constantine 1.																		
Co-directeur de thèse :	LEE Natuschka	Professeur	Umea University, Sweden.																		
Examineur 1 :	MIHOUBI Ilhem	Professeur	Université Frères Mentouri, Constantine 1.																		
Examineur 2 :	AITKAKI Asma	MCA	Université de Boumerdes.																		