

UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement (ED104)

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : **Ingénierie des Fonctions Biologiques**

Présentée par

Nuria VIECO SAIZ

Pour l'obtention du grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Soutenance le 28 Février 2019 devant le jury composé de :

Potentiel probiotique et activités anti-*Clostridium perfringens* établies *in vitro* et *in vivo* pour des souches du genre *Lactobacillus* nouvellement isolées du caecum de poulets

Mr. Djamel DRIDER	Professeur, Université de Lille	Directeur de thèse
Mme. Frédérique GANCEL	Maitre de conférences, Université de Lille	Co-encadrante de thèse
Mme. Martine BOULIANNE	Professeur, Université de Montréal	Rapporteur
Mme. Anne Christine LALMANACH	Chargée de recherche-HDR INRA, Tours	Rapporteur
Mme. Julie BOUCKAERT	Chargée de recherche CNRS, Université de Lille	Examineur
Mr. Georges DAUBE	Professeur, Université de Liège	Examineur
Mr. Benoît FOLIGNE	Professeur, Université de Lille	Président du jury
Mr. Gilles SALVAT	Directeur Général Délégué à la recherche de l'Anses	Examineur
Mr. Eric AUCLAIR	Directeur R&D de Phileo (Lesaffre International)	Invité
Mr. Yanath BELGUESMIA	Ingénieur de recherche- Université de Lille	Invité

*A todos aquellos que han creído en mí
y me han apoyado*

*A tous ceux qui ont cru en moi
et m'ont soutenu*

Remerciements

En tout premier lieu, je tiens particulièrement à remercier Mme. Anne-Christine Lalmanach et Mme. Martine Boulianne pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens également à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture du manuscrit.

Je remercie :

Le Pr. Pascal Dhulster de m'avoir accueillie au sein de l'Institut Charles Viollette où j'ai pu réaliser la plus grande partie de mes travaux.

Agradezco al madrileño de corazón, el Pr. Djamel Drider la confianza que depositó en mí para la realización de este proyecto y el haberme acogido en su equipo. Gracias por guiarme en las reflexiones científicas tras la obtención de resultados y por ser de vez en cuando mi profesor de idiomas. Admiro tu pasión por la ciencia, tus grandes ideas científicas y tu capacidad para conectar con las personas.

Le Dr. Frédérique Gancel pour son support, encadrement et empathie. Pour m'avoir montré comment valoriser mes résultats, voir le côté positif des choses et m'encourager à m'améliorer chaque jour.

Le Dr. Yanath Belguesmia pour les grands moments vécus ensemble surtout les derniers temps, pour son énorme patience et son humour. C'est une énorme chance pour un jeune chercheur de travailler à ses côtés.

Hamza, qui m'a aidé toujours et que je considère comme un collègue-chercheur clairvoyant, un ami d'exception et presque un frère.

Corinne Boistel pour répondre toujours à mes petites questions, à Matthieu Duban pour m'avoir montré la magie de l'ADN et Dr. Gabrielle Chataigne pour son aide précieuse dans plusieurs méthodes analytiques.

A l'équipe de la plateforme Realcat, surtout à Egon pour avoir mis à disposition tous les moyens disponibles.

Dr. Benoit Cudennec pour ses conseils scientifiques dans le domaine de cultures cellulaires, et sans oublier à Rezak Mendil car son nom est synonyme de Caco-2 et HT-29. Merci pour me guider dans mes premiers pas dans la manipulation de cellules eucaryotes.

En sachant que la liste est immense, et comme je ne voudrais oublier personne, je remercie de façon globale, les doctorants, postdocs et ingénieurs au sein de l'Institut Charles Viollette, pour les moments de partage au niveau scientifique comme humain, pour rigoler, se relaxer ou manger la glorieuse nourriture du RU ensemble. Particulièrement je voudrais remercier Ludivine pour nos

balades anti-stress faites de temps en temps, à mon grand ami Mahammed pour nos conversations et son support ; et à Cyril pour son immense aide et son grand cœur.

Du côté de l'entreprise je tiens à remercier Eric Auclair, pour sa vision appliquée de la recherche, pour m'encourager à prendre contact avec des collègues et chercheurs, pour me montrer l'importance du travail en équipe, et pour m'avoir donné cette expérience exceptionnelle de faire une thèse CIFRE.

Je remercie Ruth pour m'avoir suivi en toute cette période, pour son support et discussion scientifique.

Je ne veux pas oublier au reste de l'équipe R&D, les cocottes Clotilde, Julie, Eloise, Claire, Aurore, Johanna, Cécile et les sudistes Christine, Nadege, Virginie et Jean-Philippe. J'ai trouvé le département très dynamique et ouvert, il m'a été vraiment facile me sentir à l'aise avec vous. un grand merci également au reste de Phileo. Et une grande pensée à Alain, Tadele et Jimmie qui, même de loin, m'ont aidé.

Je tiens également à remercier tous les membres de la plateforme bactérie pour m'avoir faire sentir comme un autre membre de l'équipe. Je voudrais remercier en particulier Dr. Christel Garrigues et Dr. Rober Kemperman pour mettre à ma disposition les équipements disponibles dans leurs laboratoires et aussi pour avoir partagé avec moi leurs expérience et conseils scientifiques et humains. Un grand merci à Florent Le Broc pour me dédier de son temps et à Marion Damman qui m'a encouragé à continuer dans les moments difficiles.

Aussi un grand merci au Renaud Toussaint et toute son équipe pour m'avoir initié à des techniques modernes. Merci Julie pour le temps que vous m'avez consacré.

A Adrián, por su apoyo en todos los aspectos de mi vida, por ver todo lo positivo que llevo dentro, y tener la paciencia para hacerme verlo, y porque tus risas suben el ánimo a cualquiera. La distancia es difícil pero no con una persona como tú, gracias por complementarme y hacerme mejor.

A mi familia, que desde lejos ha sabido como apoyarme y alegrarme las tardes sombrías, que de vez en cuando, solo de vez en cuando aparecen en Lille. A mi padre, por sus llamadas telefónicas, apoyándome desde lejos y teniendo fe ciega en mi criterio. A mi hermana pequeña, Lidia, aunque realmente es la mayor por su protección y apoyo, que se siente sin necesidad de comunicarse. Pero a quien realmente debo agradecer es a mi madre, única en el mundo, por estar ahí en cada momento de debilidad, tristeza o falta de fortaleza, una de las mujeres más valientes que conozco, por todos sus viajes relámpago y sus "Bonjoures" mañaneros.

En résumé, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin á la réalisation de ce modeste travail de recherche.

Merci à tous! Gracias a todos !

Table de matières

RESUME.....	IX
ABSTRACT	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES TABLEAUX.....	XIV
ABREVIATIONS	XVI
INTRODUCTION GENERALE.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	8
I. LA FILIERE AVIAIRE	9
<i>I.1. La production mondiale de volaille.....</i>	<i>9</i>
<i>I.2. Les maladies zoonotiques et aviaires</i>	<i>13</i>
II. L'ENTERITE NECROTIQUE.....	21
<i>II.1. Etiologie</i>	<i>21</i>
<i>II.2. Pathologie</i>	<i>21</i>
<i>II.3. Epidémiologie et symptomatologie</i>	<i>24</i>
<i>II.4. Facteurs de prédisposition.....</i>	<i>27</i>
<i>II.5. Modèles animaux servant à l'étude de l'entérite nécrotique</i>	<i>32</i>
<i>II.6. Lutte contre l'entérite nécrotique.....</i>	<i>33</i>
III. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES EN SANTE ANIMALE.....	34
<i>III.1. Antibiotiques utilisés dans les élevages industriels</i>	<i>35</i>
<i>III.2. Les antibiotiques utilisés chez la volaille.....</i>	<i>37</i>
<i>III.3. Mécanismes de résistance et transmission</i>	<i>39</i>
<i>III.4. Mesures d'action contre la résistance aux antibiotiques.....</i>	<i>41</i>
<i>III.5. Le concept de seule sante ou One-Health.....</i>	<i>45</i>
<i>III.6. Les stratégies alternatives aux antibiotiques.....</i>	<i>46</i>
IV. LES PROBIOTIQUES	49
<i>IV.1. Critères de sélection des probiotiques</i>	<i>50</i>
<i>IV.2. Historique.....</i>	<i>50</i>
<i>IV.3. Marché des probiotiques et domaines d'applications</i>	<i>51</i>

IV.4. Sûreté et innocuité.....	52
IV.5. La genèse des probiotiques	53
V. LES BACTERIES LACTIQUES ET LE POTENTIEL PROBIOTIQUE.....	54
V.1. Définition, systématique, taxonomie.....	54
V.2. Physiologie	55
V.3. Intérêts industriels des bactéries lactiques.....	57
V.4. Résistance aux conditions gastro-intestinales.....	58
V.5. Adhésion aux cellules intestinales	59
V.6. Mécanisme d'action contre les bactéries pathogènes	59
V.7. Effets bénéfiques associés aux probiotiques.....	62
V.8. Innocuité des bactéries lactiques.....	63
V.9. Culture de barrière.....	63
VI. AUTRES PROBIOTIQUES	66
VI.1. Les bactéries probiotiques autres que les bactéries lactiques	66
VI.2. Les levures probiotiques.....	68
STRATEGIE EXPERIMENTALE ET OBJECTIFS DE LA THESE.....	70
MATERIELS ET METHODES	74
1. ISOLEMENT DE BACTERIES LACTIQUES	75
1.1. Préparation du caecum.....	75
1.2. Milieux de dénombrement et d'isolement des bactéries lactiques	76
1.3. Isolement après enrichissement	76
2. IDENTIFICATION DES SOUCHES	76
2.1. Tests préliminaires d'identification des bactéries lactiques et conservation	76
2.2. Identification moléculaire et proximité génétique des bactéries lactiques isolées.....	77
2.3. Séquençage du génome	79
3. ACTIVITES ANTI-CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.....	80
3.1. Test des slabs	80
3.2. Test des puits.....	81
3.3 Lectures des tests	81
3.4. Recherche moléculaire des composants antibactériens.....	82

4. ÉTUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE	82
4.1. Dosage de l'acide lactique.....	82
4.2. Formation de biofilms par les souches de bactéries lactiques	83
4.3. Fermentation des carbohydrates par les bactéries lactiques isolées	84
4.4. Etude de la résistance aux conditions gastro-intestinales du poulet.....	84
4.5. Propriétés d'agrégation.....	87
4.6. Adhésion aux cellules intestinales	88
4.7. Innocuité des souches sélectionnées	90
5. SURVIE DES BACTERIES LACTIQUES ISOLEES DANS LES CONDITIONS DE STOCKAGE, ET LORS DE L'ADMINISTRATION AUX ANIMAUX.....	92
5.1. Survie des bactéries au procédé de lyophilisation et leur conservation sous forme déshydratée	92
5.2. Survie des souches de lactobacilles en suspension aqueuse.....	93
5.3. Inhibition croisée des souches de bactéries lactiques	93
6. ÉVALUATION <i>IN VIVO</i> DES TROIS SOUCHES SELECTIONNEES COMME CANDIDATS PROBIOTIQUES.	94
6.1. Environnement des poulets et régime alimentaire.....	94
6.2. Vaccination	94
6.3. Traitements des différents lots	96
6.4. Administration de <i>C. perfringens</i>	97
6.5. Administration des bactéries lactiques	97
6.6. Mesures effectuées sur les oiseaux	98
7. ANALYSES STATISTIQUES.....	98
RESULTATS ET DISCUSSION.....	99
1. DENOMBREMENTS ET IDENTIFICATION DES BACTERIES ISOLEES	100
1.1. Identification moléculaire des bactéries lactiques et étude de leur proximité génétique	101
1.2. Détermination de la proximité génétique des lactobacilles par Random Amplified Polymorphic DNA.....	103
2. ACTIVITE ANTI- <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>	108
2.1. Activité antimicrobienne en slabs	108

2.2. <i>Activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et filtrés</i>	111
2.3. <i>Détection moléculaire des métabolites antibactériens</i>	112
3. ETUDE DU POTENTIEL PROBIOTIQUE	115
3.1. <i>Dosage de l'acide lactique produit</i>	115
3.2. <i>Formation de biofilms par les bactéries lactiques isolées</i>	118
RECAPITULATIF DE LA PREMIERE SELECTION DE SOUCHES	121
3.3. <i>Résistance des souches aux conditions gastro-intestinales du poulet</i>	122
3.4. <i>Test d'activité contre différentes souches de Clostridium</i>	127
3.5. <i>Etude des propriétés d'agrégation des souches</i>	128
SYNTHESE DES RESULTATS PORTANT SUR LA SELECTION DE SOUCHES	134
3.6. <i>Adhésion aux cellules intestinales</i>	135
4. INNOCUITE DES SOUCHES SELECTIONNEES	138
4.1. <i>Activité hémolytique</i>	139
4.2. <i>Résistance aux antibiotiques</i>	139
4.3. <i>Cytotoxicité envers les cellules eucaryotes de la lignée HT-29</i>	141
5. DESCRIPTION DES PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DES SOUCHES.....	142
5.1. <i>Survie des bactéries à la lyophilisation et conservation sous forme déshydratée</i>	143
5.2. <i>Survie des souches de lactobacilles en suspension aqueuse</i>	144
5.3. <i>Inhibition croisée des souches de bactéries lactiques</i>	145
6. SEQUENÇAGE ET ANALYSE DES GENOMES	145
6.1. <i>Recherche de gènes codant des molécules antibactériennes putatives</i>	146
6.2. <i>Recherche moléculaire des propriétés d'innocuité</i>	147
6.3. <i>Caractérisation prédictive du métabolisme des souches</i>	149
6.4. <i>Prédiction des capacités probiotiques</i>	150
6.5. <i>Prédiction des capacités technologiques</i>	151
7. TEST <i>IN VIVO</i>	151
7.1. <i>Essai de croissance ou performance zootechnique pendant la phase de démarrage</i>	152
7.2. <i>Effet des souches sur l'entérite nécrotique</i>	155
CONCLUSION GENERALE	160
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165

RESUME

Potentiel probiotique et activités anti-*Clostridium perfringens* établies *in vitro* et *in vivo* pour des souches du genre *Lactobacillus* nouvellement isolées du caecum de poulets

Dans cette étude, nous avons isolé et évalué le potentiel probiotique et l'effet barrière de nouvelles souches de bactéries lactiques contre l'entérite nécrotique du poulet de chair, une infection qui cause des lésions intestinales, mais aussi qui diminue le poids des oiseaux et entraînant dans certains cas leur mort. Le recours aux antibiotiques pour prévenir cette infection, et comme facteurs de croissance est prohibé depuis 2006 en Europe, par la directive 1831/2003/CE. Ainsi, le développement de stratégies alternatives aux antibiotiques reste un objectif louable sur les plans scientifique, industriel et sociétal. Dans cette optique, nous avons procédé à l'isolement et évaluation de nouvelles souches de bactéries lactiques, plus particulièrement de lactobacilles, comme flores probiotiques et potentiellement protectrices contre l'entérite nécrotique. Les bactéries lactiques sont capables de produire plusieurs molécules antagonistes comme l'acide lactique, ou encore les acides gras et phénylactique, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle et les bactériocines. Outre cet arsenal, les bactéries lactiques bénéficient du double statut GRAS/QPS (innocuité et sécurité des souches), et sont pour autant utilisables dans divers secteurs de la biotechnologie et de l'agroalimentaire. Les bactéries lactiques sont capables de former des biofilms et d'exercer de nombreuses fonctions biologiques de grande importance, les rendant ainsi des microorganismes de choix pour des applications probiotiques.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont porté sur la caractérisation des effets barrière et probiotique de nouvelles souches de bactéries lactiques appartenant au genre *Lactobacillus*, et plus particulièrement aux espèces *Lactobacillus reuteri* et *Lb. salivarius*. Ces souches ont été isolées de caeca de poulets sains élevés dans la région des Hauts-de-France. Les résultats que nous avons obtenus ont permis de mettre en évidence les activités antagonistes de ces nouvelles souches, notamment contre *Clostridium perfringens*; bactérie responsable de l'entérite nécrotique. Cet antagonisme est d'abord mis en évidence *in vitro* sur un milieu gélosé. Il est attribué à la production d'acide lactique, comme principale molécule antagoniste. Les propriétés d'agrégation, d'adhésion et de formation de biofilms de ces nouvelles souches et leur résistance aux conditions gastro-intestinales de poulets reconstituées ont également été étudiées et établies dans le cadre de cette

thèse. Les souches que nous avons nouvellement isolées et sélectionnées se sont avérées être non-hémolytiques. Par ailleurs, les propriétés de résistance au procédé de lyophilisation, à la conservation ainsi que la viabilité aux conditions d'administration aux animaux ont été également étudiées. Ces critères technologiques nous ont permis d'établir la faisabilité de leur production à grande échelle avant une possible commercialisation. Les génomes des souches ayant donné des activités les plus intéressantes sur le plan de l'antagonisme et qualification probiotique ont été séquencés. Il faut noter que la validation de ces activités et plus particulièrement de l'effet anti-*C. perfringens* a été réalisée avec succès *in vivo* sur des modèles de poulets de chair.

ABSTRACT

Probiotic features and *in vitro* and *in vivo* evidences on anti-*Clostridium perfringens* activities of novel Lactobacilli from chicken ceca origin

Here, we propose the use as probiotic novel lactic acid bacteria (LAB), mainly lactobacilli for their anti-*Clostridium perfringens* properties. This Gram-positive, spore-forming and harmful bacterium is responsible of necrotic enteritis in broilers. This infection is characterized by severe intestinal lesions, weight loss and ultimately death. The use of antibiotics to prevent necrotic enteritis or just as growth promoters has been banned in Europe since 2006 based on the EU regulation 1831/2003/CE.

Antibiotics replacement in the animal production is therefore an area where research is extremely active. In this project, we have successfully isolated novel lactobacilli strains endowed with anti-*C. perfringens* activity and additional probiotic features. LAB are recognized as GRAS/QPS organisms and can offer advantages for industrial applications.

In this study, LAB strains were isolated from healthy chicken caeca. These LABs, mainly those belonging to *Lactobacillus reuteri* and *Lb. salivarius* species have revealed high capabilities to inhibit *in vitro* *C. perfringens* through lactic acid production. In addition to produce lactic acid, these strains newly isolated were able to form biofilms and display high aggregation and adhesion scores. The resulted to be non-hemolytic and resist to simulated gastro-intestinal conditions in strain dependent-manner.

Technological properties as resistance to freeze-drying process, conservation and viability were determined and allowed to shape and predict scale production of these novel LAB strains. Genomes of Lactobacilli with relevant fulfilling antagonistic activities and probiotic grade were sequenced and analyzed. To conclude this study, *in vivo* assays were successfully tested in challenged birds. Interestingly and remarkably, these strains allowed birds to gain weight and avoid lesions caused by *C. perfringens*.

Liste des Figures

Figure 1. Observation au microscope optique de <i>Clostridium perfringens</i> après coloration différentielle de Gram	3
Figure 2. Segments d'intestins de poulets	4
Figure 3. Evolution de la production mondiale des différents types de viandes de 2015 à 2017 ...	9
Figure 4. Production de viandes par région et par type de viande.	10
Figure 5. Consommation de viande de poulet entre 1990 et 2026 pour différents pays	11
Figure 6. Panel A) Distribution de la production de la viande de volaille dans le monde. Panel B) Distribution de la production totale de viande de poulet en 2016 dans le monde (données exprimées en pourcentages).....	12
Figure 7. Représentation de la structure cristalline de la toxine NetB	23
Figure 8. Organisation génétique des loci spécifiques associés aux entérites nécrotiques	24
Figure 9. Nécrose à <i>C. perfringens</i> dans le jéjunum de poulets.	25
Figure 10. Coupes histologiques du jéjunum de poulets sain (Panel A) et infecté avec <i>Clostridium perfringens</i> (Panel B).	26
Figure 11. Réseau de facteurs de prédisposition à l'entérite nécrotique	28
Figure 12. Répartition des ventes en 2015 (en mg/UCP) des méthodes d'administration des agents antimicrobiens vétérinaires pour les élevages industriels, dans 30 pays européens	36
Figure 13. Catégories et commercialisation, en 2015, des agents antimicrobiens vétérinaires en pourcentages des ventes totales d'espèces productrices d'aliments, en mg / UCP dans 30 pays européens.....	36
Figure 14. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	40
Figure 15. Répartition des ventes totales, en 2015, d'agents antimicrobiens vétérinaires (en tonnes de matière active) par pays.....	43
Figure 16. Concept de seule-santé dite <i>One-Health</i> sur la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques.	46
Figure 17. Effets et apports des probiotiques sur la santé et la production des animaux.....	52
Figure 18. Taxonomie des bactéries lactiques.....	55
Figure 19. Voies d'utilisation du glucose chez les bactéries lactiques	56
Figure 20. Substances antibactériennes produites par les bactéries lactiques	60
Figure 21. Mécanismes d'action des probiotiques dans le renforcement de la barrière épithéliale	64
Figure 22. Structure de jonctions serrés des cellules épithéliales	65
Figure 23. Illustration du tractus gastro-intestinal du poulet	75
Figure 24. Réaction catalysée par Gld (Glycérol déshydratase).....	82
Figure 25. Reconstitution des conditions gastro-intestinales.	85
Figure 26. Etats physiologiques des bactéries.....	86
Figure 27. Répartition des espèces de <i>Lactobacillus</i> isolées dans des échantillons de caeca.	102
Figure 28. Electrophorèse sur gel d'agarose montrant les profils d'amplification PCR-RAPD pour 10 souches de <i>Lactobacillus reuteri</i>	103

Figure 29. Arbre phylogénétique généré à partir de l'analyse des amplicons de la PCR-RAPD obtenus à partir des souches <i>Lactobacillus reuteri</i> en utilisant le logiciel PyElph 1.4	104
Figure 30. Electrophorèse sur gel d'agarose montrant les profils d'amplification PCR-RAPD pour 10 souches de <i>Lactobacillus salivarius</i>	105
Figure 31. Arbre phylogénétique généré à partir de l'analyse des amplicons de RAPD-PCR obtenus à partir des souches <i>Lactobacillus salivarius</i> en utilisant le logiciel PyElph 1.4.	106
Figure 32. Détection du fragment du gène <i>gldC</i> par PCR.....	114
Figure 33. Arbre décisionnel résumant la première sélection des souches isolées.	121
Figure 34. Autoagrégation (%) des souches de bactéries lactiques isolées.....	129
Figure 35. Pourcentage d'adhésion des souches bactériennes aux cellules Caco-2 par la méthode de dénombrement sur boîte et par PCR quantitative (qPCR).....	135
Figure 36. Corrélation entre l'autoagrégation et le taux d'adhésion aux cellules intestinales de la lignée cellulaire Caco-2.....	138
Figure 37. Viabilité cellulaire (%) de la lignée cellulaire eucaryote HT-29, après 24 h de contact avec les bactéries lactiques.....	142
Figure 38. Survie des souches lyophilisées	144
Figure 39. Test d'activité croisée en spots	145
Figure 40. Prédiction de la présence de gènes de bactériocines dans les génomes des souches de <i>Lactobacillus salivarius</i>	146
Figure 41. Gène putatif de l'entérolysine A dans les génomes des souches de <i>Lactobacillus salivarius</i>	147
Figure 42. Gènes potentiels codant la synthèse de la bactériocine LS2 dans les génomes de <i>Lactobacillus salivarius</i>	147
Figure 43. Lésions de l'entérite nécrotique.....	156

Liste des Tableaux

Tableau 1. Pourcentage de réduction de l'administration d'antibiotiques aux volailles en France pour les années 2014-2015 versus 2011, selon l'ANSES, 2016.	6
Tableau 2. Pathologies aviaires et agents pathogènes.....	13
Tableau 3. Typage de <i>Clostridium perfringens</i> en fonction des toxines produites	22
Tableau 4. Revue de certaines conditions prédisposantes testées dans les modèles expérimentaux d'entérite nécrotique	32
Tableau 5. Antibiotiques utilisés dans les élevages industriels pour traiter l'entérite nécrotique	33
Tableau 6. Antibiotiques utilisés dans l'élevage de volaille dans les états membres de l'OIE	38
Tableau 7. Exposition des volailles aux antibiotiques (Années 2014-2015 versus 2011).....	44
Tableau 8. Probiotiques utilisés en productions animales	54
Tableau 9. Souches de <i>Clostridium</i> utilisées comme bactéries cibles	81
Tableau 10. Conditions de pHs et biles testées.....	84
Tableau 11. Composition des régimes par ingrédients (g/100g).....	95
Tableau 12. Composition approximative des régimes (g/100g)	96
Tableau 13. Expérimentation animale (essai <i>in vivo</i>)	97
Tableau 14. Dénombrements des bactéries lactiques (UFC/g) dans le caecum des 3 poulets....	100
Tableau 15. Etudes montrant les bactéries lactiques prédominant dans les caeca de poulets.....	107
Tableau 16. Activités anti- <i>Clostridium perfringens</i> DSM756 des bactéries lactiques.	109
Tableau 17. Activités anti- <i>Clostridium perfringens</i> ANSES Clin1	110
Tableau 18. Amorces utilisées la recherche des gènes codant les bactériocines.	112
Tableau 19. Production d'acide lactique (g/L) par les souches isolées des caeca après incubation pendant 20 h dans le milieu MRS à 37°C.....	117
Tableau 20. Formation de biofilms par les bactéries lactiques.	120
Tableau 21. Survie des levures (Actisaf) aux différents pHs.....	123
Tableau 22. Survie des levures (Actisaf) à différents pourcentages (%) de bile	124
Tableau 23. Conditions expérimentales finales simulant le tractus gastro-intestinal du poulet.	125
Tableau 24. Survie des bactéries lactiques aux conditions gastro-intestinales du poulet.	125
Tableau 25. Halos d'activité produits par Lactobacilles contre <i>Clostridium</i>	128
Tableau 26. Coagrégation des souches de <i>Lactobacillus</i> avec des agents pathogènes	131
Tableau 27. Survie des bactéries pathogènes et coagrégation avec les souches de lactobacilles	134
Tableau 28. Sensibilités des souches lactobacilles aux antibiotiques	140
Tableau 29. Effet du processus de lyophilisation selon des cryoprotecteurs.....	143
Tableau 30. Survie bactérienne (%) après mises en suspensions aqueuses.	144
Tableau 31. Données génétiques des souches de lactobacilles sélectionnées.....	146
Tableau 32. Conditions testées <i>in vivo</i> (expérimentation animale).....	152
Tableau 33. Effets sur le poids vif des poulets, la consommation alimentaire et la FCR (Feed Conversion Ratio) après supplémentation des <i>Lactobacillus</i>	153

Tableau 34. Lésions intestinales. Pourcentages de mortalité, poids des animaux, FCR trouvés au 17^{ème} jour de l’essai. 157

Abréviations

Abs	Absorbance
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	ADN ribosomique
AGP	Antibiotics Growth Promoters
ALEA	Animal Level of Exposure to Antimicrobials
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APF	Promoteurs de l'agrégation
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosine TriPhosphate
B.	<i>Bacillus</i>
Bifido.	<i>Bifidobacterium</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSH	<i>Bile Salt Hydrolase</i>
BTS	<i>Bacterial Test Standard</i>
C.	<i>Clostridium</i>
CGE	<i>Center for Genomic Epidemiology</i>
CPE	<i>Clostridium perfringens</i> Enterotoxin
CPF	Promoteurs de coagrégation
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
C_t	<i>threshold cycle</i>
db	double brin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTPs	Désoxyribonucléotides
DO	Densité Optique
DON	Déoxynivalénol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen Diamine TetrAcetate
EEE	Espace Economique Européen
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>

ERV	Entérocoques résistants à la vancomycine
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FB	Fumonisines
FCR	<i>Feed Conversion Ratio</i>
FOS	Fructo-OligoSaccharides
Gld	Glycérol déshydratase
GLEAM	<i>Global Livestock Environmental Assessment Model</i>
GOS	Galacto-OligoSaccharides
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HCCA	<i>A-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IFN	InterFéroN
IL	InterLeukin
IR	InfraRouge
LAMVAB	<i>Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol green</i>
Lb.	<i>Lactobacillus</i>
Lc.	<i>Lactococcus</i>
M.	<i>Mycobacterium</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time of Flight</i>
MATE	<i>Multidrug And Toxic Compound Extrusion</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MRS	de Man Rogosa et Sharpe
Mt	Million de tonnes
m/z	masse moléculaire / charge de l'ion
NetB	<i>Necrotic Enteritis B-like Toxin</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NSP	<i>Non-Starch Polysaccharides</i>
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
OMI	Isomaltooligosaccharides

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OTUs	<i>Operational Taxonomic Units</i>
PAM	Peptides AntiMicrobiens
pb	paire de base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>Ped.</i>	<i>Pediococcus</i>
ppm	partie par million
p/p	poids/poids
p/v	poids/volume
qPCR	PCR quantitative
QPS	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RAST	<i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
S.	<i>Salmonella</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
spp.	Espèce
<i>Strep.</i>	<i>Streptococcus</i>
SVF	Sérum de Veau Fœtal
<i>Sch.</i>	<i>Saccharomyces</i>
TLR2	<i>Toll-like receptor 2</i>
TNF	Tumor Necrosis Factor
UCP	Unité de Correction de la Population
UE	Union Européenne
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultraviolet
VBNC	Cellules Viables mais Non Cultivables
v/v	volume/ volume
XOS	XyloOligoSaccharides
ZO	protéines de jonction serrée <i>Zonula Occludens</i>
6-PG/PK	6-PhosphoGluconate/PhosphoKétolase

Introduction Générale

L'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les élevages industriels est un sujet controversé et ce depuis plusieurs années. En effet, de plus en plus de pays dans le monde légifèrent dans le sens de leur interdiction comme facteurs de croissance. Depuis 2006, les pays de l'Union Européenne (règlement 1831/2003/CE) puis le Mexique, la Nouvelle-Zélande et la Corée du Sud ont adopté des lois interdisant l'utilisation des antibiotiques de manière préventive dans les élevages (**Laxminarayan et al., 2015**). Les raisons de cette interdiction sont liées au développement de l'antibiorésistance, un phénomène de plus en plus inquiétant qui est essentiellement attribué à l'utilisation abusive des antibiotiques dans le secteur de l'élevage. Selon une étude britannique, si rien n'est fait pour endiguer ce phénomène, en 2050 les infections dues à des pathogènes résistant aux antibiotiques seront la première cause de mortalité au Royaume-Uni, devançant ainsi les décès causés par d'autres maladies comme le cancer (**O'Neill, 2014**). La prise de conscience vis-à-vis de cette problématique sociétale, a poussé les organisations internationales de santé, telles que l'OMS, la FAO et l'OIE, à appeler à la recherche d'alternatives viables pour diminuer l'utilisation abusive des antibiotiques. Pour aider à faire face à la problématique de l'antibiorésistance, un concept majeur appelé *One Health* a été proposé. Ce concept vise une meilleure gestion des antibiotiques, et une meilleure appréhension de l'antibiorésistance dans les domaines de la santé humaine et animale mais aussi dans l'environnement et l'industrie agro-alimentaire. L'usage abusif des antibiotiques a participé à la dissémination des antibiotiques dans l'environnement, rendant possible les interactions avec des bactéries pathogènes. Dans la nature, ces interactions entre bactéries environnementales et résidus d'antibiotiques, peuvent se traduire par l'acquisition et le développement de nouveaux mécanismes de résistance transmissibles horizontalement et donc difficilement contrôlables (**Patz et Hahn, 2013**). Le concept *One Health* ne vise pas seulement des solutions à l'antibiorésistance liées à la santé humaine, mais aussi le contrôle d'une façon transversale (**Patz et Hahn, 2013**).

La production mondiale de viande d'élevage devrait augmenter de près de 40 Mt entre 2016 et 2026. Cette croissance principalement liée à la production de viande de volailles, devrait passer de 117 Mt à 132 Mt, soit une augmentation de 13%. Concernant la viande de porc, celle-ci passera de 116 Mt à 128 Mt, soit une augmentation de 10%. La production de viande de bœuf, de veau et de mouton devrait augmenter selon le rapport conjoint de l'OCDE/FAO (**2017**). L'augmentation de la production de viande dans la prochaine décennie serait cependant plus lente dans les pays développés, avec une augmentation de 6%, mais serait plus marquée dans les pays en voie de

développement, avec une augmentation de 21%, selon un rapport conjoint de l'OCDE et FAO (2018).

La production de viande de volaille représente la principale filière dans l'industrie des produits carnés. Ceci s'explique par son coût de production plus faible comparativement à celui des viandes rouges, notamment en raison du temps de production et des frais liés à l'alimentation du bétail (OECD/FAO, 2017). Selon un rapport récent OCDE/FAO (2018), le niveau de consommation de viande de volaille a augmenté au niveau mondial durant les 5 dernières années et est estimé juste pour l'année 2018 à 119.208,2 kilotonnes (OCDE/FAO, 2018). La viande de volaille est une source de protéines de haute qualité, de faible teneur en matières grasses et contenant majoritairement des acides gras insaturés (<http://www.fao.org/poultry-production-products/products-processing/en/>).

Parmi les germes problématiques dans la filière aviaire, on retrouve *Clostridium perfringens*, une bactérie à Gram-positif (Figure 1), appartenant à la famille des *Clostridiaceae* de l'ordre des *Clostridia*. Cette bactérie sporulée, anaérobie stricte mais aérotoleante, produit différentes toxines dont NetB (Dridier et Salvat, 2015).

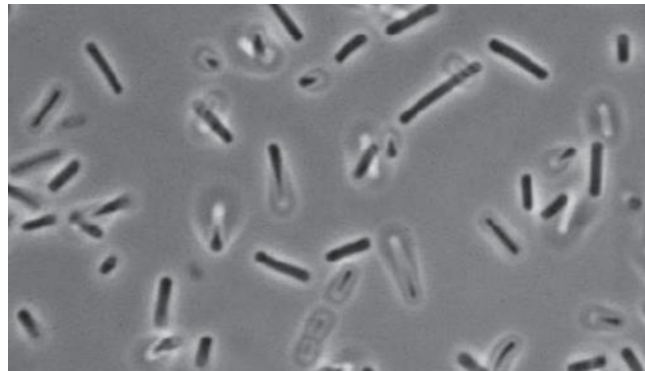


Figure 1. Observation au microscope optique de *Clostridium perfringens* après coloration différentielle de Gram (ANSES, 2010)

Clostridium perfringens est un agent pathogène ubiquitaire pouvant infecter aussi bien l'Homme que les animaux. Il impacte fortement les élevages de volaille où il est responsable de l'entérite nécrotique, une infection caractérisée par des nécroses et une inflammation du tractus gastro-intestinal (Figure 2). L'infection est accompagnée plus généralement d'une diminution

significative de la croissance des individus dans les élevages touchés et d'une mortalité élevée (M'Sadeq et al., 2015)

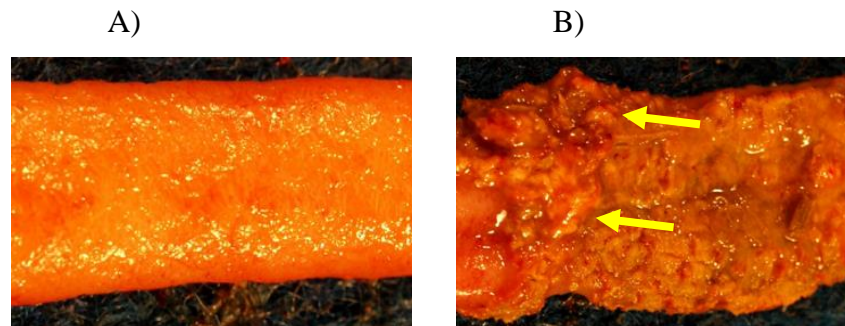


Figure 2. Segments d'intestins de poulets Panel A) échantillons non infectés, Panel B) échantillons infectés par *C. perfringens*, et illustrations des lésions et dommages (Shojadoost et al., 2012).

Les lésions produites dans le cas d'une entérite nécrotique sont dues à la capacité de certaines souches de *C. perfringens* à sécréter la toxine NetB et la toxine de type alpha (Keyburn et al., 2008; Rood et al., 2018). La toxine NetB est le principal facteur de virulence lié à l'entérite nécrotique aviaire. Cette toxine est responsable de la destruction de la *lamina propria*, de la matrice extracellulaire et des jonctions intercellulaires (Navarro et al., 2018; Rood et al., 2016). La toxine alpha est une métalloenzyme à Zinc ayant une activité hémolytique et dermonécrotique (Sakurai et al., 2004). Elle est responsable de la dégradation extensive de la membrane plasmatique accompagnée par une libération de la lactate déshydrogénase qui caractérise la nécrose (Navarro et al., 2018). Les souches de *Clostridium* sont généralement classées en plusieurs biotypes (A, B...), selon les toxines qu'elles produisent. Les souches produisant les toxines NetB et la toxine de type alpha sont actuellement incluses dans le tout nouveau type G (Navarro et al., 2018). En plus de la virulence des souches de *C. perfringens*, des facteurs de prédisposition sont nécessaires pour induire la maladie, parmi lesquels la coccidiose, la présence de mycotoxines, les agents d'immunosuppression, les facteurs nutritionnels ou les facteurs anthropiques de management des élevages (Shojadoost et al., 2012).

L'entérite nécrotique à *C. perfringens* se développe sous plusieurs formes, clinique ou subclinique. Les symptômes cliniques sont caractérisés par une relative immobilité des oiseaux, une dépression, une anorexie, l'apparition de diarrhée et une diminution de l'appétit. Un autre signe caractéristique est la litière humide (Paiva et McElroy, 2014; Williams, 2005). En ce qui concerne la forme subclinique, il n'y a pas de pic de mortalité, ni de signes cliniques apparents (Timbermont

et al., 2011). Cette forme génère plus de pertes économiques à cause de son caractère silencieux et, par conséquent, l'impossibilité de détecter des manifestations typiques de l'infection (**M'Sadeq et al., 2015**). Les antibiotiques utilisés pour traiter l'entérite nécrotique sont la pénicilline, le lincosamide, l'amoxicilline, l'ampicilline, la narasine et les ionophores (**Landoni et Albarellos, 2015; Marshall et Levy, 2011**). Avant leur interdiction dans les élevages, certains antibiotiques comme la virginiamycine, l'avilamycine, l'avoparcine, la bacitracine, la bambermycine, l'érythromycine, le lasalocide, la néomycine, l'oléandomycine, l'ormetoprim, la procaïne pénicilline, la roxarsonne et les tétracyclines ont été utilisés comme facteurs de croissance pour promouvoir la croissance des poulets (**Marshall et Levy, 2011**).

Ainsi en 2016 en France, le volume total moyen des ventes d'antibiotiques à destination du secteur de la volaille était de l'ordre de 139 tonnes. L'indicateur ALEA permettant d'évaluer l'exposition des animaux aux antibiotiques, appliqué depuis 1999, semble décliner annuellement en raison de la mise en place du plan ECOANTIBIO (plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire). En France, les valeurs obtenues en 2016, ont montré une baisse de 20,5 % par rapport à la moyenne des deux années précédentes (2014 et 2015).

D'après les données ALEA, sur ces deux dernières années, les volailles ont été traitées majoritairement avec des polypeptides, des tétracyclines, des pénicillines, et de façon moindre avec des sulfamides et du triméthoprim (**ANSES, 2016**) (**Tableau 1**). Malgré l'arsenal thérapeutique disponible, les pertes économiques dues à l'entérite nécrotique, dans le monde, sont estimées à 6 milliards de dollars (**Wade et Keyburn, 2015**) et l'interdiction de l'utilisation des antibiotiques en prophylaxie dans la filière a augmenté la fréquence des épisodes épidémiques dus à *C. perfringens* (**Caly et al., 2015**).

Pour faire face à cette situation, la recherche d'alternatives aux antibiotiques est devenue, depuis quelques années, une nécessité absolue et représente un défi majeur pour le secteur de l'élevage. Actuellement, plusieurs alternatives sont considérées pour leur efficacité et leur faisabilité, et ce afin de réduire l'utilisation des antibiotiques dans ce secteur. Ces alternatives incluent l'utilisation des probiotiques d'origines fongique ou bactérienne. Les probiotiques sont, selon l'OMS/FAO, des microorganismes vivants apportant des bénéfices à la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates/suffisantes (**FAO/OMS, 2002**).

Tableau 1. Pourcentage de réduction de l'administration d'antibiotiques aux volailles en France pour les années 2014-2015 versus 2011, selon l'ANSES, 2016.

	% réduction
Aminoglycosides	54,44
Fluoroquinolones	29,73
Lincosamides	94,15
Macrolides	18,65
Pénicillines	9,4
Pleuromutilines	74,28
Polypeptides	17,3
Quinolones	32,03
Sulfamides	16,88
Tétracyclines	31,96
Triméthopriime	17,96
Total	22,05

Les bactéries lactiques font partie du microbiote normal du poulet et produisent des substances antimicrobiennes comme les acides organiques, les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, l'éthanol ou le CO₂ ... (Pessione, 2012). Elles peuvent également entrer en compétition avec les autres microorganismes, induisant le contrôle des agents pathogènes par un mécanisme dit d'exclusion compétitive (Callaway et al., 2008). Certaines de ces bactéries lactiques agissent sur le système immunitaire (immuno-stimulation) de l'hôte et induisent la production de cytokines de type IL-6 (Kiczorowska et al., 2017). Elles augmentent la biodisponibilité de certains nutriments utilisés par les cellules épithéliales intestinales (Liao et Nyachoti, 2017; Russo et al., 2014; Sharifuzzaman et Austin, 2017), ou peuvent stimuler la production de mucus par les cellules intestinales (Ljungh et Wadström, 2006; Park et al., 2016).

L'usage des probiotiques ne vise pas uniquement une application comme facteurs de croissance, il vise aussi à répondre aux attentes du consommateur, qui est de plus en plus sensibilisé aux questions liées aux conditions d'élevage des animaux et à l'usage des antibiotiques dans cette industrie.

L'objectif de ce travail est de sélectionner des souches de bactéries lactiques dotées d'activités anti-*C. perfringens* et présentant des qualités probiotiques en vue de leur éventuelle application dans les élevages de volaille. Cette étude vise, donc, à isoler et caractériser de nouvelles souches

de bactéries lactiques qui pourront être utilisées pour contrôler l'entérite nécrotique causée par *C. perfringens* et être également utilisées comme facteurs de croissance dans les élevages de volailles.

Dans ces perspectives, nous avons isolé de nouvelles souches de bactéries lactiques, à partir de caeca de poulets élevés dans la région des Hauts-de-France. Les souches ont été isolées sur des milieux favorables aux bactéries lactiques comme les milieux MRS, (**de Man et al., 1960**), LAMVAB (**Hartemink et al., 1997**), ou encore Elliker (**Elliker et al., 1956**). Les souches isolées ont été identifiées par la technique de spectrométrie de masse et les doublons ont été écartés parmi les souches par une approche de biologie moléculaire dite RAPD-PCR. Elles ont ensuite été testées pour leur activité antagoniste, particulièrement contre *C. perfringens*.

Une fois l'activité antagoniste démontrée, la recherche des molécules impliquées dans cet antagonisme, puis une première caractérisation du potentiel probiotique de ces souches antagonistes ont été réalisées. Le potentiel probiotique inclut des critères spécifiques comme la capacité à former des biofilms, à l'instar de ceux formés par des agents pathogènes. Ce premier test a permis une première sélection et un classement des souches isolées. Des tests additionnels, toujours en lien avec la caractérisation des probiotiques, ont été réalisés sur ces souches; il s'agissait notamment d'étudier la résistance aux conditions mimant l'environnement gastro-intestinal du poulet, l'évaluation de leur innocuité dénotée par l'absence de certains effets adverses comme leur activité hémolytique, la cytotoxicité, et la résistance aux antibiotiques. Les souches ont également été étudiées pour leurs capacités d'agrégation et d'adhésion aux cellules eucaryotes, Caco-2 et HT-29, d'origine intestinale.

Lors de notre approche expérimentale, nous avons utilisé plusieurs techniques de microbiologie classique et de biologie moléculaire (PCR, qPCR et cytométrie en flux) afin de mieux aboutir dans nos résultats et compléter la caractérisation de nos souches. Cela nous a permis de sélectionner trois souches d'intérêt : deux souches de *Lactobacillus salivarius* (*Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430) et une souche de *Lactobacillus reuteri* (*Lb. reuteri* ICVB416).

Les capacités antagonistes de ces souches et leur potentiel probiotique pour une application contre l'entérite nécrotique ou pour le bien-être des animaux ont été évaluées *in vivo*.

Revue Bibliographique

I. La filière aviaire

La volaille domestiquée peut être élevée pour la production d'œufs, viande à destination de la consommation humaine ou pour la production de plumes. Le terme "volaille" couvre un large éventail d'oiseaux, allant des races de poules indigènes et commerciales aux canards de Barbarie, canards colverts, dindes, pintades, oies, cailles, pigeons, autruches ou faisans.

I.1. La production mondiale de volaille

En 2017, la production mondiale de viande a augmenté de 1,25% pour atteindre 323 Mt et elle devrait progresser encore de près de 15% à l'horizon 2027, afin d'atteindre près de 371 Mt (OECD/FAO, 2018a). La croissance de la demande en produits carnés est principalement due à la croissance démographique, à l'urbanisation et à la hausse des revenus dans les pays en développement (**Figure 3**).

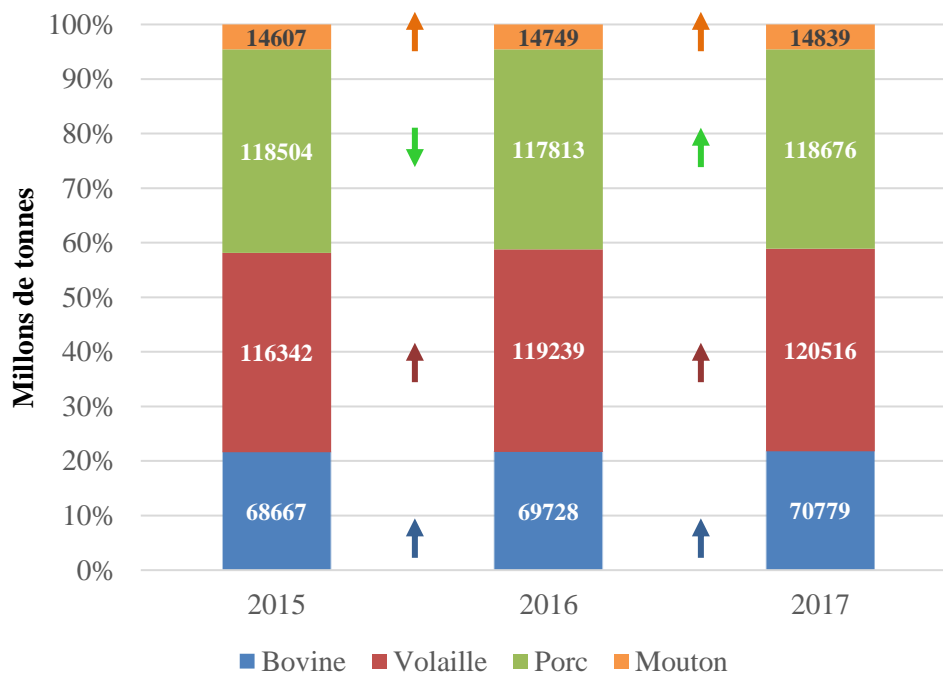


Figure 3. Evolution de la production mondiale des différents types de viandes de 2015 à 2017 (FAO, 2018).

Dans certains pays en développement, la croissance de la production est soutenue par l'augmentation de la productivité. Ainsi le poids des carcasses est plus élevé par unité de bétail et l'efficacité du rendement de l'utilisation des aliments pour animaux ne cesse de s'améliorer. (OECD/FAO, 2018a). A l'horizon 2027, les pays en développement représenteront 76% de l'augmentation de la production de viande, alors que les pays développés n'en représenteront que 24% (Figure 4). Parmi tous les types de viandes, la production de la volaille enregistre la plus forte expansion dans les pays en développement. La production mondiale de viande continue d'être dominée par le Brésil, la Chine, l'Union européenne, la Fédération de Russie et les États-Unis (OECD/FAO, 2018a).

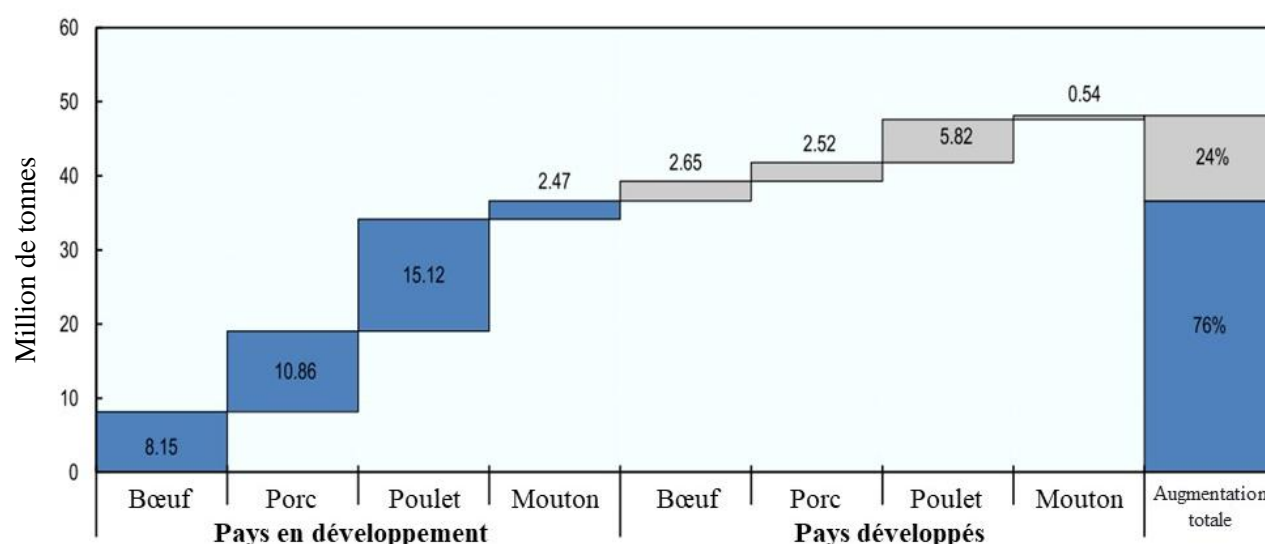


Figure 4. Production de viandes par région et par type de viande. Augmentation estimée en 2027 par rapport à 2015-2017. Le taux est mesuré par millions de tonnes de viande équivalent prêt à cuire (OECD/FAO, 2018a).

Pour la période 2015-2030 (<http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e05b.htm>); la production la plus importante sera celle de la viande de poulet (2,4%), suivie par les viandes ovine et bovine (1,8 et 1,2 % respectivement); alors que la viande de porc enregistre uniquement 0,8% d'augmentation. La consommation de viande de poulet a augmenté légèrement ces dernières années et les projections laissent à croire à la continuité de cette tendance. Selon un rapport de l'OCDE, la consommation de viande de volaille est estimée pour l'année 2018 à 119,2 Mt, et les États-Unis restent le plus grand pays consommateur avec 48,83 Kg de viande per capita (Figure 5).

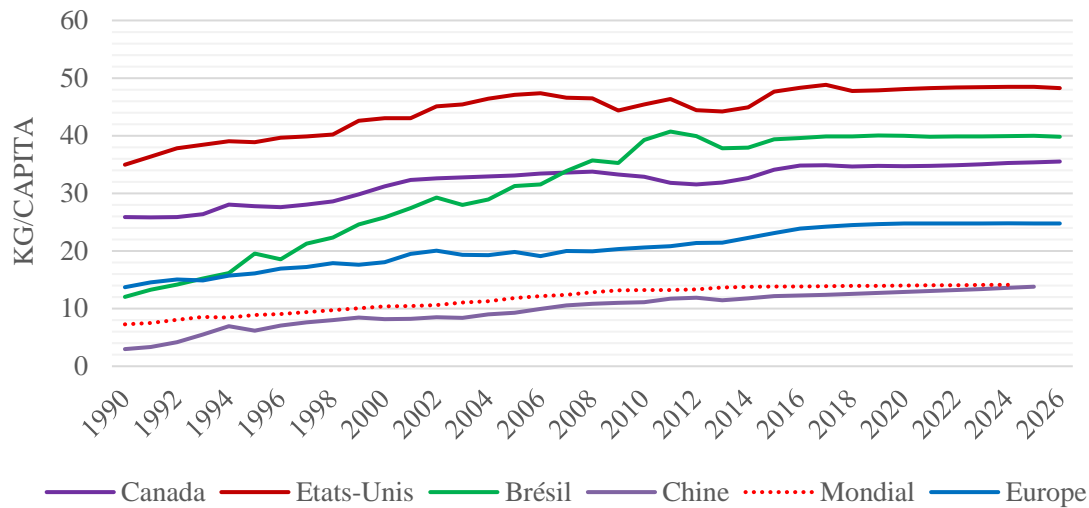


Figure 5. Consommation de viande de poulet entre 1990 et 2026 pour différents pays (Kg/capita). Source : OECD-FAO Agricultural Outlook (**Edition 2017**).

Le poulet reste dominant parmi les autres types de produits carnés consommés car il est économiquement abordable et disponible. Il n'est associé à aucun tabou religieux ou culturel, le contenu en graisses est faible et offre un meilleur apport protéique par rapport aux autres types de viandes (**De Castro Cardoso et al., 2013; Farrell, 2012; Mottet et Tempio, 2017**). Le poulet et les œufs contiennent des protéines de haute qualité, de plus, on y trouve des vitamines et des minéraux importants pour la croissance et l'organisme humain (**Farrell, 2012**). Les œufs, en particulier, contiennent 13 vitamines et minéraux essentiels, et des protéines pour environ 70 calories par œuf (**Mottet et Tempio, 2017**). Les volailles sont bien adaptées à l'intensification de production en raison de leur taux de conversion élevés et de leur taux de reproduction rapide à faibles coûts (**OECD/FAO, 2017**). Au niveau environnemental, la volaille consomme le moins d'eau par kg de croissance que les autres espèces (**Mekonnen et Hoekstra, 2012**). Tous ces paramètres font de la volaille la principale source mondiale de protéines animales, suivie par le porc, ces dernières années. La viande de poulet est la viande de volaille la plus consommée, suivie de celles des dindes et des canards (**Figure 6**). Les poules fournissent près de 92% de la production mondiale d'œufs. Selon les régions du globe, la proportion d'œufs produits par les espèces de volaille autres que le poulet représente 13% des œufs en Asie, 1% sur le continent américain (avec 3% en Amérique latine), 0,6% en Océanie et 0,9% en Europe, alors qu'en Afrique elle est

pratiquement inexistante (<http://www.fao.org/poultry-production-products/production/poultry-species/en>). Les estimations du GLEAM viennent de révéler que la production mondiale d'œufs est d'environ 73 Mt (GLEAM2.0., 2018).

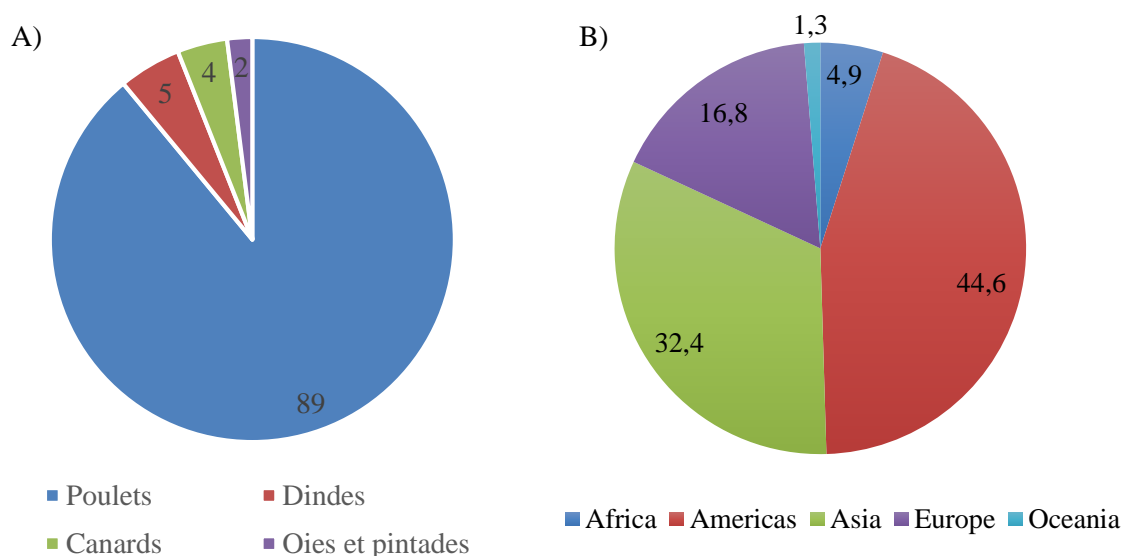


Figure 6. Panel A) Distribution de la production de la viande de volaille dans le monde. Panel B) Distribution de la production totale de viande de poulet en 2016 dans le monde (données exprimées en pourcentages). Source : FAOSTAT (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>) (Aout 2018).

Depuis le début des années 60, la consommation mondiale de viande de volaille a été multipliée par cinq. La plus forte croissance a eu lieu en Asie et en Amérique latine. La volaille est particulièrement importante pour les petits exploitants et les communautés rurales et urbaines pauvres. Elle est principalement produite dans le cadre d'opérations intensives à grande échelle, ce qui en fait l'un des sous-secteurs agricoles à la croissance la plus rapide (Mottet et Tempio, 2017).

Entre 2000 et 2030, la demande de viande de volaille par habitant devrait augmenter de 271% en Asie du Sud, de 116% en Europe orientale et en Asie centrale, de 97% au Moyen-Orient et en Afrique du Nord et de 91% en Asie orientale et dans le Pacifique (<http://www.fao.org/poultry-production-products/products-processing/en/>).

I.2. Les maladies zoonotiques et aviaires

L'industrie mondiale de la volaille est devenue un secteur générant des profits importants dont le succès est intimement lié à la santé des animaux et plus précisément aux tractus gastro-intestinaux sains, qui assurent la conversion efficace des aliments. Le tractus gastro-intestinal de volaille est exposé à plusieurs types d'infections, celles-ci peuvent être catégorisées en fonction de l'agent pathogène incriminé. Ces infections peuvent être d'origines bactérienne, fongique, virale ou parasitaire (**Tableau 2**).

Tableau 2. Pathologies aviaires et agents pathogènes

(<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/gemp/avis/cards.html>)

Bactériennes	
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Salmonella</i> - <i>Chlamydochila</i> - <i>Clostridium</i> - <i>Campylobacter</i> - <i>Mycobacterium</i> - <i>Mycoplasma</i> - <i>Pasteurella multocida</i> - <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> - <i>Erysipelas</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Bordetella,</i> - <i>Avibacterium</i> - <i>Yersenia pseudotuberculosis,</i> - <i>Riemerella anatipestifer,</i> - <i>Staphylococcus,</i> - <i>Streptococcus,</i> - <i>Coxiella,</i> - <i>Pseudomonas</i> - Autres
Fongiques	
<ul style="list-style-type: none"> - <i>Aspergillus</i> - <i>Candida</i> - <i>Microsporium gallinae</i> - <i>Ochroconis</i> (ou <i>Dactylariosis</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Cryptococcus</i> - <i>Macrorhabdus ornithogaster</i> - Autres
Virales	
<ul style="list-style-type: none"> - Herpes Virus - Laryngotrachéite infectieuse aviaire - Maladie de Marek - Entérite Virale du canard (DVE) - Coronavirus (Bronchite infectieuse Aviaire) - Paramyxovirus aviaires (Maladie de Newcastle) - Virus de l'influenza (ex. H5N1 (grippe aviaire)) - Enterovirus 	<ul style="list-style-type: none"> - Retrovirus de la leucose aviaire du sarcome - Birnavirus (Bursite infectieux (IBD)) - Metapneumovirus aviaire - Poxvirus aviaire - Circovirus (Anémie infectieuse du poulet (CIAV)) - Parvovirus - Reovirus aviaires - Adénovirus aviaires - Papovavirus

<ul style="list-style-type: none"> - Encephalomyélite aviaire - Hépatite virale du canard (DVH) 	<ul style="list-style-type: none"> - Astrovirus - Autres
Parasitaires	
<ul style="list-style-type: none"> - par Protozoïde <ul style="list-style-type: none"> • <i>Eimeria</i> (Coccidioses) • <i>Atoxoplasma</i> • <i>Histomonas</i> • <i>Cryptosporidium</i> • <i>Sarcocystis</i> • <i>Toxoplasma</i> • <i>Microsporidia</i> • <i>Trichomona</i> • <i>Leucocytozoon</i> • <i>Plasmodium</i> (Malaria aviaire) 	<ul style="list-style-type: none"> - par nématodes <ul style="list-style-type: none"> • <i>Ascaris</i> • <i>Capillariasis</i> • <i>Setaria</i> • <i>Syngamus</i> • <i>Hétérakis</i> • Nématodes du proventricule et gésier - Cestodes - Trématodes - Arthropodes (acariens, poux, puces, tiques)

Les infections bactériennes les plus courantes chez les oiseaux sont les infections à *Escherichia coli*, salmonelloses, l'entérite nécrotique (*C. perfringens*), les infections à *Mycoplasma*, le choléra aviaire, la dermatite gangréneuse et la tuberculose aviaire.

I.2.1. Les zoonoses

a) Les zoonoses virales

Les maladies zoonotiques représentent une problématique majeure de santé publique. Une zoonose est une maladie infectieuse ou parasitaire transmise d'un animal vertébré (chien, vache, poule, cochon...) à l'Homme. En général, les humains peuvent contracter ces maladies de deux manières, soit à partir des oiseaux vivants ou par exposition ou consommation de viande ou de produits à base d'œufs provenant d'oiseaux infectés. Les salmonelloses, les campylobactérioses, la grippe aviaire (H5N1) sont les infections le plus fréquemment transmises par la volaille (**Dale et Brown, 2013**). La grippe aviaire est considérée comme la pathologie la plus importante. En effet, les virus de type A de la famille des *Orthomyxoviridae* représentent la majorité des agents responsables des gripes humaines, mais aussi celles touchant les animaux domestiques, y compris les oiseaux (**Lee et Saif, 2009**). Le virus grippal de type A présente deux types de protéines de

surface, l'hémagglutinine (H) et la neuraminidase (N), qui régissent le cycle de vie viral depuis l'entrée jusqu'à la libération des virions (Alexander et Capua, 2008; Chen et al., 2013). La virulence du virus en termes de capacité de propagation et la sévérité des symptômes dépend du type de protéines H et N présentes. Les virus hautement pathogènes appartiennent aux sous-types H5 ou H7. La volaille infectée meurt rapidement, souvent dans les 48 à 72 h suivant l'infection. La pathogenèse implique une infection des capillaires sanguins avec un œdème et une hémorragie résultante touchant de multiples zones, rapidement suivies d'une défaillance de plusieurs organes. Le système respiratoire, digestif et/ou nerveux de nombreuses espèces d'oiseaux est également affecté. Les oiseaux infectés excrètent le virus dans les matières fécales et les décharges oculonasales. Les virus qui sont capables de se transmettre aux humains sont le H5N1, le H7N2, le H7N3, le H7N7, le H9N2, le H7N9 et le H10N7 (Chen et al., 2013).

Outre les virus grippaux, la maladie la plus dévastatrice de la volaille rurale est la maladie de Newcastle (Alexander, 2000; Awan et al., 1994). Cette maladie est épidémique, causée par des formes virulentes du paramyxovirus, chez la volaille et peut causer des pertes économiques importantes (Alexander, 2001). Cette maladie a un potentiel zoonotique mais demeure beaucoup moins grave chez l'Homme que l'influenza aviaire. Le virus ne représente pas une menace importante ou grave pour la santé humaine. Les infections cliniques chez l'homme résultent généralement d'une exposition à des concentrations de virus particulièrement élevées (Iowa State University, 2016).

b) Les zoonoses bactériennes

La tuberculose aviaire est causée par *Mycobacterium avium* et moins fréquemment par *M. genavense*. Ces bactéries se propagent par voies fécale et orale (fécale-orale), lorsque des oiseaux infectés contaminent l'environnement. C'est une maladie importante affectant les oiseaux et les mammifères. Le tableau clinique se caractérise par une faiblesse chronique et progressive. La diarrhée est fréquente et certains oiseaux peuvent présenter des signes de faiblesses respiratoires et la mort subite reste occasionnelle (OIE, 2014). Chez l'Homme, l'infection par *M. avium* se développe principalement chez les patients immunodéprimés et reste extrêmement rare chez les individus immunocompétents (Dale et Brown, 2013).

Par ailleurs, les infections causées par *Campylobacter* et *Salmonella* sont des causes majeures de maladies d'origine alimentaire et sont principalement associées à la consommation de volaille

insuffisamment cuite et/ou à la consommation de produits contaminés par la viande de volaille crue (**Grant et al., 2016**).

Les *Campylobacter* spp. sont des organismes commensaux colonisant l'intestin des bovins, moutons, porcs et oiseaux, cependant, les volailles sont les hôtes les plus communs (**Grant et al., 2016; Silva et al., 2011**). Les oiseaux sont naturellement infectés par transmission horizontale (voie fécale-orale). Les *Campylobacter* s'établissent dans le tractus intestinal avec une charge bactérienne élevée dans le caeca (**Awad et al., 2018**). Dans les élevages, les bactéries se propagent rapidement, infectant plus de 90% des oiseaux en 2 semaines. L'omniprésence des bactéries dans l'environnement rend l'éradication et la prévention de l'infection à la ferme pratiquement impossibles (**Dale et Brown, 2013**).

Campylobacter jejuni et *Campylobacter coli* sont deux espèces thermotolérantes et responsables de campylobactérioses chez l'Homme, provoquant des diarrhées et parfois des atteintes plus importantes. Le plus souvent chez l'Homme; il s'agit de *Campylobacter jejuni* (**Dale et Brown, 2013; Kaakoush et al., 2015**). Les principales voies d'exposition sont les aliments (en particulier la viande de poulet, la contamination croisée accidentelle de la volaille crue par des aliments prêts à consommer) et le contact direct avec les animaux (**Dale et Brown, 2013; Grant et al., 2016**). La contamination de la viande résulte d'une mauvaise manipulation dans les abattoirs, où la transmission se fait par les fuites du tractus intestinal souillant la peau et la carcasse (**Silva et al., 2011**). La campylobactériose est la maladie gastro-intestinale la plus fréquemment enregistrée en Europe depuis 2005 et reste selon ECDC (**2016**) en augmentation constante. Selon une étude relativement ancienne, la majorité des cas de campylobactériose (70%) sont liés à la consommation de viande de poulet (**Allos, 2001**). Ainsi, il a été montré que plusieurs organites et mécanismes incluant les flagelles, l'adhésion à la muqueuse intestinale, la production de toxines, la capacité invasive induisant l'augmentation de la perméabilité intestinale qui contribue à la translocation paracellulaire ou transcellulaire de la bactérie elle-même, sont associés donc à la pathogénicité de *Campylobacter* (**Awad et al., 2018; Silva et al., 2011**).

La symptomatologie apparaît 2 à 5 jours avec l'apparition de nausées, de douleurs abdominales, d'une diarrhée aqueuse ou sanglante et une fièvre occasionnelle pouvant durer de un jour à une semaine. Rarement, la maladie peut se propager dans le sang et entraîner des complications pouvant provoquer la mort (généralement chez les individus immunodéprimés) (**Dale et Brown, 2013; Grant et al., 2016**). Il est de plus en plus admis que l'infection à *Campylobacter jejuni* est un

important facteur de causalité pour le syndrome de Guillain–Barré, qui est la cause la plus fréquente de paralysie neuromusculaire aiguë (**Rees et al., 1995**). La production d'une réponse immunitaire contre l'infection à *Campylobacter jejuni* par la production des gangliosides génère une réaction croisée qui favorise le développement de la maladie (**Giesecke et McCarthy, 2001**).

La salmonellose est la deuxième infection gastro-intestinale en Europe, après les campylobactérioses (**EFSA et ECDC, 2017**). Il s'agit d'une cause importante d'épidémies d'origine alimentaire dans l'UE/EEE (ECDC, 2016), voire dans le monde (**Lamas et al., 2018**). Elle est causée par plusieurs sérovars différents de *Salmonella enterica*, dont la plupart provoquent des maladies chez l'Homme (**Dale et Brown, 2013**). Les souches de *S. enterica* sont capables de produire chez l'homme un des quatre syndromes suivants: fièvre entérique (typhoïde), une entérocolite/diarrhée, une bactériémie et un portage asymptomatique chronique (**Coburn et al., 2007**). Les isolats cliniques humains les plus courants sont les sérotypes *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium et Enteritidis. Les sérovars de *Salmonella* non typhoïdiques sont une cause majeure de maladies d'origine alimentaire aiguë dans le monde entier (**Santos et al., 2009**). La plupart des sérovars infectent les poulets sans provoquer la maladie apparente. Certains sérovars, tels que Pullorum et Gallinarum, sont des pathogènes spécifiques des poulets mais ne sont pas infectieux chez l'homme (**Dale et Brown, 2013**).

Les infections causées par les salmonelles sont majoritairement d'origine alimentaire incriminant la consommation des produits aviaires (**Roy et al., 2001**). Cependant, les infections par contact avec des animaux incluant des volailles vivantes sont possibles (**Gaffga et al., 2012**). Les volailles peuvent être infectées par *Salmonella* après contact avec des oiseaux infectés ou par des aliments contaminés voire par transmission verticale de poules infectées, c'est-à-dire, la transmission poule-œuf (**Roy et al., 2001**). Le système reproducteur de la poule peut être infecté par *Salmonella* Enteritidis alors que la pondeuse ne présente aucun signe clinique. Les œufs et leurs contenus pourront être contaminés lors de leur formation dans l'ovaire ou après leur ponte (**Howard et al., 2012**). De la même façon, les carcasses peuvent être contaminées, si après l'abattage les matières provenant du tube digestif entrent en contact avec elles (**Dale et Brown, 2013**).

Dans le tractus gastro-intestinal humain, *Salmonella* pénètre dans les cellules épithéliales détruisant l'épithélium et engendre des ulcères et une diarrhée. Les symptômes apparaissent généralement 12 à 72 h après la consommation d'aliments contaminés et durent de 4 à 7 jours. Chez les humains immunocompétents, ils sont marqués par un début aigu, des crampes, des douleurs

abdominales et une diarrhée avec ou sans sang. Les nausées et les vomissements sont également fréquents (Coburn et al., 2007; Dale et Brown, 2013). Chez les individus immunodéprimés, la maladie peut évoluer en une infection sanguine invasive vers d'autres organes (septicémie) et peut avoir une issue fatale (Grant et al., 2016; Kariuki et al., 2015).

Coburn et al. (2007) estiment que l'incidence des salmonelles non typhoïdes dans le monde varie de 200 millions à 1,3 milliards. Ces estimations varient considérablement en raison du manque diagnostic et de rapports concordants. Dans l'UE/EEE le nombre de cas de salmonelloses déclarés continue de diminuer. Cette diminution est principalement attribuable à la mise en œuvre de programmes efficaces de lutte contre *Salmonella*, en particulier dans la production de volaille (ECDPC, 2016).

I.2.2. Maladies aviaires

Il existe d'autres maladies étudiées en raison de leur intérêt économique pour la filière volaille. Celles-ci touchent directement les animaux et peuvent générer des pertes financières importantes, en raison du taux de mortalité élevé et de la faible efficacité alimentaire. *E. coli* et les clostridies sont considérés parmi les agents les plus importants des maladies entériques chez les volailles (Cooper et al., 2013).

a) La colibacillose

La colibacillose est une maladie qui peut impacter tous les producteurs de volaille dans le monde. Elle se caractérise par une grande diversité de lésions chez la volaille (Dziva et Stevens, 2008). Il s'agit d'une maladie infectieuse systémique affectant une grande variété d'oiseaux (Porter, 1998). Elle est causée par certaines souches d'*E. coli* produisant des facteurs de virulence comme les adhésines (fimbriaires ou afimbriaires), la résistance au sérum et des toxines (comme VT2y ou « *Escherichia coli vacuolating factor* ») (Stordeur et Mainil, 2002). Les souches d'*E. coli* responsables de la colibacillose sont des pathogènes extra-intestinaux, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se déplacer à travers les muqueuses intestinales ou respiratoires (Dziva et Stevens, 2008; Porter, 1998). La principale voie d'entrée est le tractus respiratoire via l'inhalation de particules de poussière contaminées par des *E. coli* excrétées du tractus digestif d'animaux sains (Stordeur et Mainil, 2002). La contamination par ces bactéries constitue souvent des infections secondaires suite à une irritation des muqueuses respiratoires causée par des infections virales telle

la bronchite infectieuse à *Coronavirus*. Les bactéries diffusent dans le corps de l'animal par le sang entraînant une inflammation localisée dans plusieurs organes et en provoquant une septicémie pouvant entraîner la mort subite de l'animal (**Dziva et Stevens, 2008**).

b) Les entérites à clostridies

Clostridia vient du nom grecque « Klostro » qui signifie fuseau ou petite bobine car les bactéries prennent la forme d'allumette, de bâton de tambour ou de fuseau : ce sont des bacilles larges à extrémités carrés. Les bactéries de ce groupe sont classées dans le phylum des *Firmicutes*. Elles sont anaérobies, à Gram-positif et productrices de spores. Ubiquistes elles se retrouvent dans l'environnement et dans le tractus gastro-intestinal des animaux (**Prescott et al., 2016**). La plupart des espèces du genre *Clostridium* sont non pathogènes.

Beaucoup de ces espèces sont largement utilisées dans les fermentations industrielles par exemple, dans la synthèse de composés chimiques tels que l'acétate, le butyrate, le lactate, l'éthanol, le dioxyde de carbone ou les solvants (**Cooper et al., 2013**). Par fermentation de substrats, elles peuvent produire des biocarburants comme l'hydrogène. On peut noter également l'utilisation de *C. beijerinckii* pour fermenter les déchets alimentaires (**Han et Shin, 2004; Kim and Austin, 2008**). Les clostridies peuvent fermenter une large gamme de substrats – les glucides simples ou le glycérol et les polysaccharides complexes tels que les matériaux lignocellulosiques (**Udaondo et al., 2017**). Néanmoins, ils sont plus connus pour leur rôle pathogènes telles que *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum* (**Cooper et al., 2013**).

D'un point de vue taxonomique, le genre *Clostridium* est très complexe et hétérogène (**Udaondo et al., 2017**). Initialement dans le genre *Clostridium* contenait toutes les bactéries en bâtonnets anaérobies à Gram-positif, capables de former des endospores. Après l'avènement des techniques moléculaires et l'étude des ADNr 16S, il a été proposé de créer différents clusters dans ce genre. Les vrais représentants du genre *Clostridium* proches de l'espèce type, *C. butyricum*, ont été regroupés dans le cluster I ou *Clostridium stricto sensu* (**Collins et al., 1994; Gupta et Gao, 2009**). Le genre *Clostridium* comprend actuellement 181 espèces décrites (**Keto-Timonen et al., 2006**) moins de la moitié fait partie du cluster I (**Wiegel, J., Tanner, R., Rainey, 2006**).

Outre l'entérite nécrotique causée par *C. perfringens*, qui se manifeste généralement chez les poulets de chair, que nous aborderons dans la section suivante, les clostridies provoquent plusieurs atteintes parmi lesquelles l'entérite ulcéreuse, causée par *C. colinum*. Elle constitue l'autre maladie

entérique clostridienne majeure de la volaille. Les autres infections entériques à *Clostridium* comprennent les infections causées par *C. difficile*, *C. septicum*, *C. fallax* et *C. baratii* (Cooper et al., 2013).

L'entérite ulcéreuse causée par *C. colinum*, est une maladie entérique hautement mortelle affectant principalement les cailles en captivité (Kondo et al., 1988). Cette infection a été signalée chez d'autres oiseaux, notamment les poulets, les dindes et les faisans (Porter, 1998). Il faut noter que l'entérite ulcéreuse est très fréquemment observée chez les jeunes oiseaux (Cooper et al., 2013). La mortalité chez les poulets varie de 2% à 10%. Après l'infection orale, la bactérie adhère aux villosités intestinales, causant une inflammation et des ulcères dans l'intestin grêle et les caeca. *C. colinum* peut alors migrer vers le foie, produisant de petits foyers nécrotiques ou zones de nécrose hépatique et aussi splénique (Cooper et al., 2013; Porter, 1998). Les symptômes peuvent survenir sans signes ou avec une perte de poids. Une diarrhée aqueuse et blanchâtre initialement, puis sanglante quand la maladie est plus développée, survient au cours de l'infection. Les animaux présentent aussi une dépression, de l'apathie et des plumes à l'aspect ébouriffé. Des épidémies ponctuelles ont été décrites avec d'autres espèces comme *C. baratii* et *C. fallax* (Cooper et al., 2013).

C. difficile est une bactérie plutôt associée aux infections nosocomiales (infections liées aux soins hospitaliers) (Keessen et al., 2011). Elle est aussi un colonisateur de l'intestin et une cause possible de diarrhées chez les animaux destinés à l'alimentation (Gould et Limbago, 2010). Néanmoins, il n'est pas établi que les oiseaux infectés transmettent le pathogène aux humains même s'il est retrouvé dans un large pourcentage de viandes de consommation (2-15%) (Curry et al., 2012; Harvey et al., 2011; Weese et al., 2010).

C. septicum est une bactérie responsable de la gangrène gazeuse traumatique et de la myonécrose clostridienne chez l'animal et chez l'Homme, en particulier chez les dindes et poulets. *C. septicum* produit 4 toxines majeures (α , β , γ et δ) responsables de lésions tissulaires et de toxémie (Koransky et al., 1979). Il n'existe pas de données sur la répartition et les sources de *C. septicum* dans les installations de production de volaille (Thachil et al., 2012).

Le botulisme animal, également appelé "limberneck" est principalement causé par *C. botulinum*, une bactérie toxigène. En effet, cette bactérie produit des neurotoxines botuliques de types C et D responsables du botulisme. Cette infection a augmenté dans plusieurs pays Européens depuis 2000 (Skarin et al., 2013). Les oiseaux atteints meurent d'un arrêt cardiaque, d'une insuffisance

respiratoire ou des deux, conséquence d'une paralysie ascendante (**Sato et al., 2016**). Les principales sources de contamination sont les invertébrés, l'eau potable, le système de ventilation et le sol (**Souillard et al., 2014**).

II. L'entérite nécrotique

L'entérite nécrotique est une maladie affectant les élevages dans toutes les régions avicoles du monde (**Timbermont et al., 2011**). Elle est responsable chaque année de pertes économiques colossales dans le monde, celles-ci sont évaluées à plus de 6 milliards de dollars. Ces pertes sont dues aux coûts des mesures de contrôle de la maladie et à la diminution de la production en termes de poids et de mortalité des animaux dans les élevages (**Wade et Keyburn, 2015**). L'entérite nécrotique est plus fréquente chez les poulets de chair, cependant les poules pondeuses et les dindes peuvent également être touchées.

II.1. Etiologie

C. perfringens est le microorganisme pathogène responsable de l'entérite nécrotique. Son nom dérive du latin du *perfringere* « casser », car la culture dans la masse « casse » la gélose par une production abondante de gaz (**Veillon et Zuber, 1898**).

II.2. Pathologie

C. perfringens est responsable d'un grand nombre de maladies chez l'Homme et les animaux (**Paiva et McElroy, 2014**), allant des infections histotoxiques aux infections entériques (**Uzal et al., 2014**). Celles-ci comprennent la gangrène gazeuse, l'intoxication alimentaire par *C. perfringens* de type A, les maladies gastro-intestinales non alimentaires associées à l'entérotoxine (CPE) et l'entérite nécrotique chez l'animal (entérotoxémie) ou l'Homme. Le potentiel pathogène de *C. perfringens* est lié aux toxines extracellulaires et aux enzymes hydrolytiques, dont le portage génétique est souvent plasmidique. *C. perfringens* se distingue des autres clostridies par son caractère immobile et sa capacité à réduire les nitrates. La capacité de *C. perfringens* à provoquer des maladies dépend de la production de certaines toxines. Selon la toxine produite, *C. perfringens* est alors classé en différents types. Rood et al. (**2018**) ont proposé une grille de typage basée sur

ces toxines. Selon cette grille, *C. perfringens* responsable de l'entérite nécrotique chez la volaille est placé dans le groupe G (**Tableau 3**).

Tableau 3. Typage de *Clostridium perfringens* en fonction des toxines produites (**Rood et al., 2018**).

Toxinotype	α -toxine	β -toxine	ϵ -toxine	i -toxine	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	\pm	-
D	+	-	+	-	\pm	-
E	+	-	-	+	\pm	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Lors du développement de l'entérite nécrotique, *C. perfringens* attaque la paroi intestinale en produisant diverses enzymes et toxines extracellulaires qui vont dégrader les cellules de l'intestin pour obtenir des nutriments. Ces toxines et enzymes ont des activités et des rôles spécifiques dans le processus de la maladie. Une action synergique a d'ailleurs été suggérée entre ces toxines. Les enzymes extracellulaires et les facteurs de virulence semblent être synthétisés d'une manière coordonnée (**Ohtani et Shimizu, 2015**). Les souches pathogènes présentent des gènes codant pour des systèmes de transport d'acides aminés et de sucres permettant l'absorption des nutriments libérés. La dégradation de cellules intestinales compense l'absence des gènes impliqués dans la biosynthèse de nombreux acides aminés (**Shimizu et al., 2002**).

Dans un premier temps, les études sur l'entérite nécrotique ont identifié l'alpha-toxine comme le principal facteur de virulence. Cependant, Keyburn et al., (**2006**) ont démontré que cette hypothèse était erronée grâce au développement de mutants alpha-toxine négatifs. Keyburn et al. (**2008**) ont démontré qu'une nouvelle toxine, appelée NetB serait essentielle pour le développement de l'entérite nécrotique aviaire (**Keyburn et al., 2008, 2010**). La toxine NetB de *C. perfringens* est une toxine de 33-kDa formant des β -pores, elle présente une similarité avec la β -toxine de *C. perfringens* (38% d'identité de la séquence en aminoacides), gamma-toxine de *C. perfringens* (40% d'identité), l'alpha-hémolysine de *Staphylococcus aureus* (30% d'identité) et la gamma-toxine de

S. aureus (23% d'identité) (Paiva et McElroy, 2014; Yan et al., 2013). Le gène codant NetB est porté par des plasmides et est placé dans le locus de pathogénicité NELoc-1 (Lepp et al., 2010).

La toxine NetB forme des pores d'une taille de 1,6 nm de diamètre qui cassent la bicouche lipidique de la membrane cellulaire provoquant des changements dans les voies de transduction du signal de l'hôte (Rood et al., 2016) et permettant la sortie des ions Ca^{2+} , Na^+ ou Cl^- ce qui entraîne la lyse osmotique de la cellule (Keyburn et al., 2008; Savva et al., 2013). La toxine interagit avec le cholestérol membranaire présent et forme des structures de 7 monomères en forme d'anneau comme illustré dans la Figure 7 (Rood et al., 2016; Savva et al., 2013).

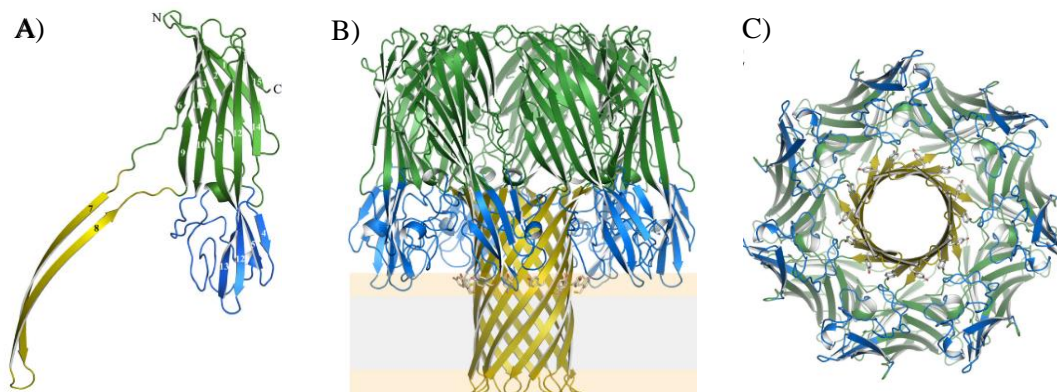


Figure 7. Représentation de la structure cristalline de la toxine NetB. (Panel A) Structure monomérique (Panel B) Structure du complexe heptamérique représentant les conditions de la membrane cytoplasmique (Panel C) Vision apicale du pore de la toxine (Savva et al., 2013).

La virulence de *C. perfringens* est déterminée par un système de régulation à deux composantes, appelé VirR/VirS. Ce système contrôle plus de 150 gènes incluant des gènes codant des toxines comme NetB, des hyaluronidases, des sialidases, des enzymes catalytiques ou encore ceux codant des transporteurs (Ohtani et Shimizu, 2015; Prescott et al., 2016). La production de la toxine NetB est corrélée à l'activation du système VirR/VirS, en réponse à une forte densité cellulaire de *C. perfringens* (Timbermont et al., 2011).

Par comparaison de plusieurs génomes de *C. perfringens*, Lepp et al. (2010), ont établi que la virulence est loci dépendante, c'est-à-dire de la localisation des gènes sur le support génétique, comme indiquée sur la Figure 8. Ces locus de pathogénicité, plasmidiques (NELoc-1 et NELoc-3) ou chromosomique (NELoc-2), regroupent des gènes de virulence potentiels pouvant contribuer à la diversité de *C. perfringens* en tant qu'agent pathogène (Lepp et al., 2010; Parreira et al., 2012).

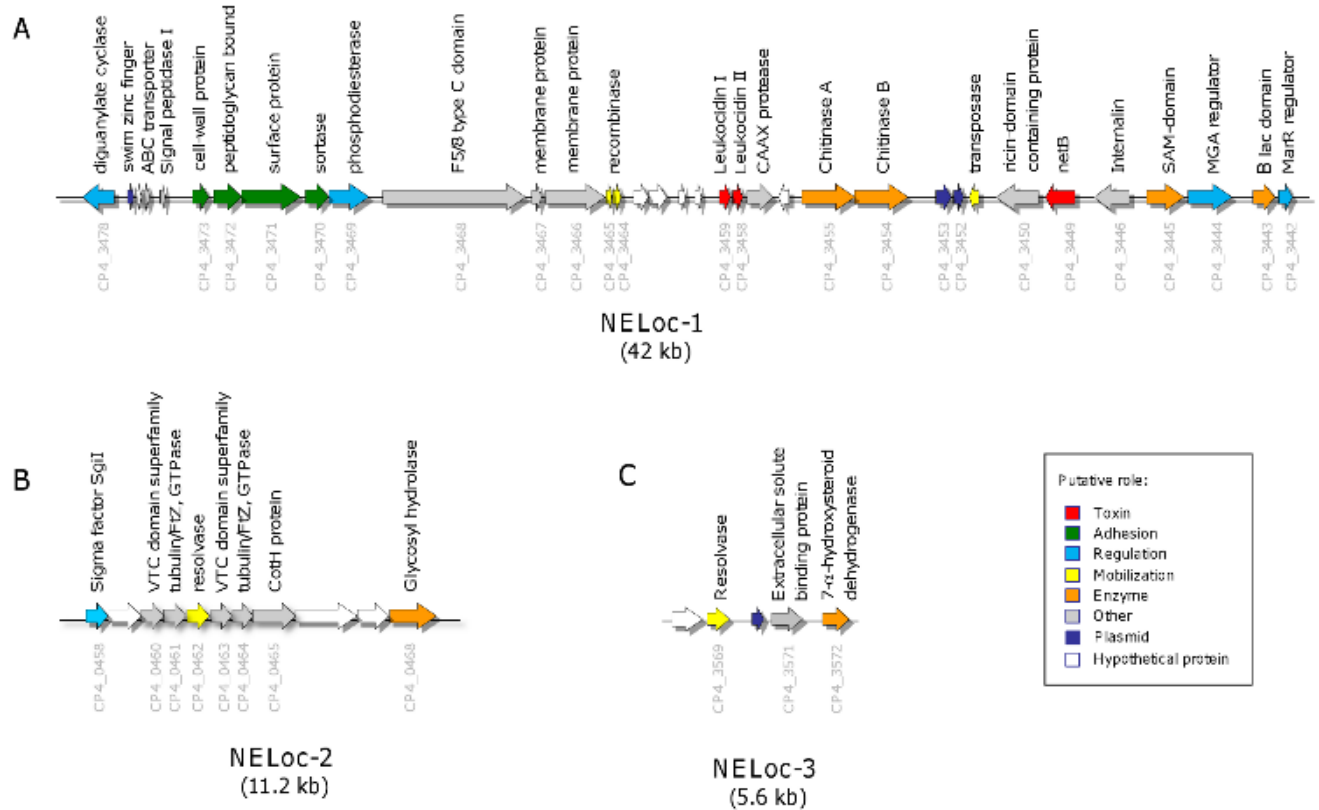


Figure 8. Organisation génétique des loci spécifiques associés aux entérites nécrotiques (Lepp et al. 2010). NELoc-1 (42 kb) et NELoc-3 (5,6kb) sont présents sur des plasmides. NELoc-2 est localisé dans une région du chromosome de 11,2 kb. Les gènes sont représentés par flèches. Dans la partie du dessus les fonctions prédites sont spécifiées et au-dessous les étiquettes de locus.

La transmission de plasmides par conjugaison permet de transférer des gènes conférant de nouvelles fonctions biologiques aux bactéries. Ainsi, Lacey et al. (2017) ont montré que la transmission du plasmide codant pour la toxine NetB est possible entre des souches de *C. perfringens* pathogènes et non-pathogènes, même si leurs contenus chromosomiques sont très différents. Ce transfert horizontal peut avoir lieu dans le tractus gastro-intestinal du poulet, transformant les souches commensales ou non pathogènes de *C. perfringens* en souches pathogènes (Barbara et al., 2008; Lacey et al., 2017).

II.3. Épidémiologie et symptomatologie

L'entérite nécrotique apparaît chez les poulets de chair âgés de 2 à 6 semaines (Cooper et Songer, 2009), ce qui correspond à une période où le système immunitaire du poussin est immature ceci jusqu'à environ 3 ou 4 semaines (Caly et al., 2015; Cooper et al., 2013; La Ragione et

Woodward, 2003). Les poulets contractent la maladie par exposition aux cellules végétatives ou aux spores des souches pathogènes de *C. perfringens*, présentes dans les fermes d'élevage (les murs, la saleté à l'extérieur de l'entrée, les ventilateurs, le sol, les abreuvoirs, les conduites d'eau, la litière contaminée, les boîtes de livraison des poussins, les bottes du personnel), la nourriture ou par la contamination croisée avec des animaux infectés (**Caly et al., 2015; M'Sadeq et al., 2015**).

Il existe deux types d'entérite nécrotique, lorsque la classification est établie par des critères symptomatologiques. L'entérite aigüe et l'entérite subclinique. Les signes les plus fréquents pour établir l'entérite aigüe sont des poulets somnolents, manquant de tonus et d'appétit, présentant diarrhées, déshydrations ou inappétence (**Cooper et Songer, 2009**). L'intestin grêle est généralement distendu avec du gaz et la paroi intestinale est mince et friable. La muqueuse est tapissée d'une pseudomembrane jaune-brune ou verte biliaire (**Cooper et Songer, 2009; Opengart, 2008; Timbermont et al., 2011**) (**Figure 9**). Les poulets meurent souvent en 1 à 2 h. Les taux de mortalité associés à l'entérite nécrotique sont généralement compris entre 2 et 10% mais parfois des taux de 50% sont rapportés (**Cooper et al., 2013; M'Sadeq et al., 2015; Paiva et McElroy, 2014**). L'affection est caractérisée par l'augmentation soudaine de la mortalité des cheptels, les oiseaux meurent généralement sans signes avant-coureurs (**M'Sadeq et al., 2015**).

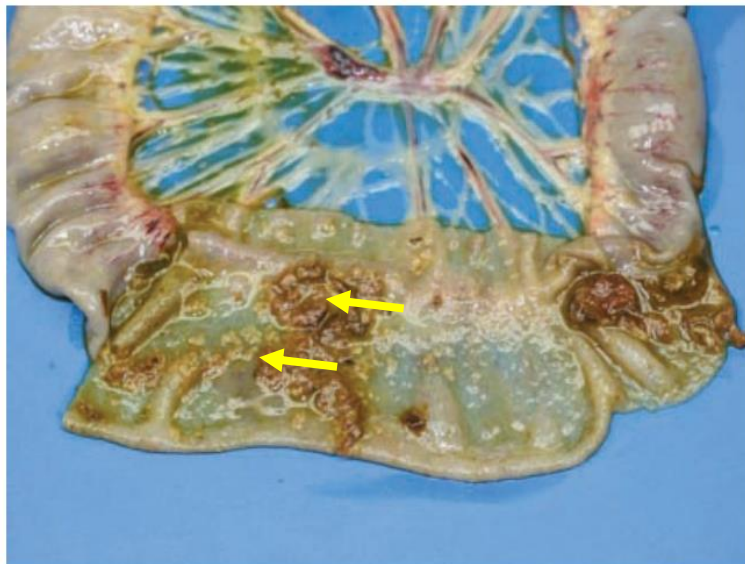


Figure 9. Nécrose à *C. perfringens* dans le jéjunum de poulets. Présence des zones de nécrose muqueuse recouvertes de pseudomembrane (**Cooper et al., 2013**)

La forme subclinique affecte négativement les taux de conversion des aliments, c'est-à-dire que les animaux doivent consommer plus d'aliment pour avoir le même gain du poids ; en outre il n'y a pas une mortalité significative. Ce type d'entérite nécrotique est problématique car il a un impact négatif sur la productivité et la rentabilité ayant pour résultat des poulets de taille et de poids réduits (Savva et al., 2013), en raison de dommages chroniques de la muqueuse intestinale (Timbermont et al., 2011). Lors d'une infection subclinique, les bactéries peuvent atteindre la circulation sanguine et la voie biliaire (M'Sadeq et al., 2015). Les animaux malades présentent des lésions macro et microscopiques généralement dans le jéjunum et l'ilium mais celles-ci peuvent apparaître également dans le duodénum et les caeca (Opengart, 2008), ou dans d'autres organes, tels que le foie et les reins (Timbermont et al., 2011). Au niveau microscopique, des effets sont observés selon le stade de l'infection. Les premiers stades de l'entérite nécrotique induisent de fortes réactions inflammatoires à *C. perfringens*. La lamina propria est hyperémique et infiltrée par de nombreuses cellules inflammatoires, principalement des granulocytes hétérophiles. La progression des lésions se produit généralement des apex des villosités aux cryptes (Figure 10). Dans les stades ultérieurs de l'entérite nécrotique, les lésions apparaissent comme des nécroses coagulatives diffuses et sévères de la muqueuse (Opengart, 2008; Smyth, 2016; Timbermont et al., 2011).

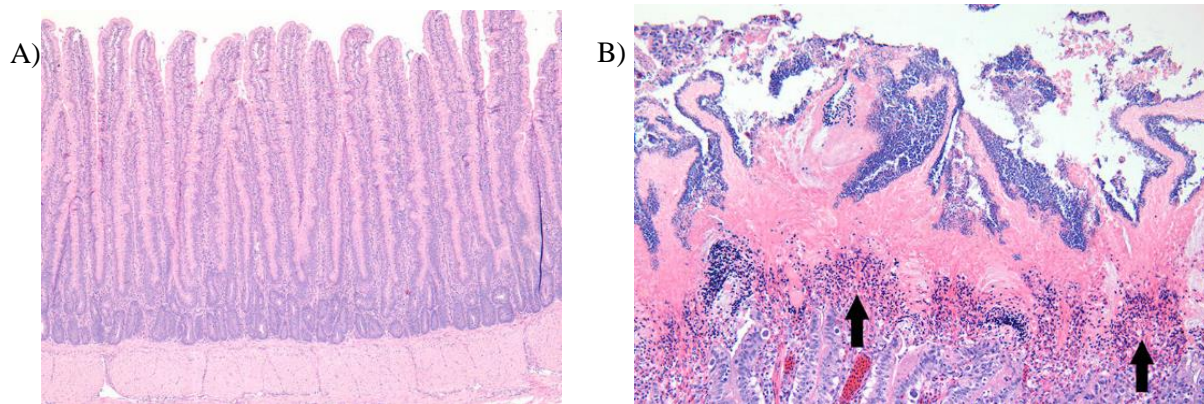


Figure 10. Coupes histologiques du jéjunum de poulets sain (Panel A) et infecté avec *Clostridium perfringens* (Panel B). A) Les villosités sont très longues et représentent l'essentiel de l'épaisseur de la paroi intestinale. B) Avec le développement de l'entérite nécrotique la partie superficielle de la muqueuse est nettement éosinophile (nécrose coagulative) et est séparée de la muqueuse viable par une zone intense d'inflammation hétérophile (flèches). Les souches de *C. perfringens* en bleu recouvrent le coagulum nécrotique (Smyth, 2016).

II.4. Facteurs de prédisposition

C. perfringens est présent naturellement dans l'intestin. En tant que bactérie opportuniste, elle a besoin que l'équilibre intestinal soit compromis pour coloniser, proliférer et exprimer les toxines, et ainsi provoquer la maladie (Broom, 2017; Caly et al., 2015; Immerseel et al., 2010). L'isolement de souches de *C. perfringens* porteurs de gènes *netB* chez des poulets sains indique que la simple infection par *C. perfringens* n'est pas seule suffisante pour induire la pathologie (Rood et al., 2016). Le déclenchement de l'entérite nécrotique nécessite la présence de conditions appelée facteurs de prédisposition comme schématisé dans la **Figure 11**.

a) La coccidiose

La coccidiose est le facteur de prédisposition le plus important pour le développement de l'entérite nécrotique; c'est une maladie causée par le parasite *Eimeria spp.* Certaines espèces (*E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. tenella*) induisent des lésions plus sévères que d'autres (*E. acervulina*, *E. mitis*, *E. praecox*). L'affection est dose dépendante; ainsi des doses infectieuses de $2 \cdot 10^4$ ou $5 \cdot 10^5$, pour des souches plus ou moins pathogènes respectivement, ont des effets délétères sur les poulets (Shojadoost et al., 2012). Cependant ces 2 maladies sont mutuellement prédisposantes l'une pour l'autre chez la volaille. *Eimeria* est un parasite qui colonise l'intestin grêle et tue les cellules épithéliales durant les étapes intracellulaires de son cycle de vie (Williams, 2005). Cette infection produit la fuite de plasma vers la lumière intestinale et le plasma constitue un substrat riche pour la croissance et la prolifération de *Clostridium* (Broom, 2017; Immerseel et al., 2010). D'un autre côté, la coccidiose induit une réponse inflammatoire par médiation des lymphocytes T qui augmentent de manière excessive la production de mucus intestinal. L'augmentation de mucine dans le lumen favorise également la croissance à *C. perfringens* en raison de la capacité de celui-ci à utiliser le mucus comme substrat (Collier et al., 2008; Timbermont et al., 2011).

b) Régime alimentaire

La composition de l'alimentation affecte les populations bactériennes de l'intestin, ce qui peut favoriser le développement de la maladie. Des régimes enrichis en céréales (blé, seigle, orge ou avoine), ou des régimes passant brusquement d'une teneur faible à une teneur élevée en protéines ont été utilisés pour produire expérimentalement l'entérite nécrotique. Le type de céréale utilisé peut favoriser le développement de l'entérite nécrotique. Les grains de céréales fournissent la majorité de l'amidon et des polysaccharides dans l'alimentation des poulets, et différentes céréales affectent le développement de l'entérite nécrotique (**Apajalahti et Vienola, 2016; Palliyeguru et Rose, 2014**). Les régimes enrichis en céréales comme l'orge et le blé entraînent une incidence accrue de la maladie (26 à 35%), par rapport à un régime à base de maïs (0 à 12%). Cela peut être dû à une augmentation du nombre de *C. perfringens* lors du régime alimentaire à base de blé ou d'orge (**Riddell et Kong, 1992; Shojadoost et al., 2012**). En effet, ces céréales (le blé, le seigle et l'orge) contiennent des taux élevés de polysaccharides non amylacés solubles dans l'eau (NSP) tels que les arabinoxylanes et les β -glucanes qui augmentent la viscosité du digesta et prédisposent les poulets à l'entérite nécrotique (**Annett et al., 2002; Shojadoost et al., 2012**). La viscosité plus élevée des digesta dans les régimes contenant du blé ou de l'orge entraîne un temps de transit prolongé dans l'intestin, qui peut être responsable de la corrélation directe entre la viscosité intestinale et la quantité des clostridies. Un régime avec de grandes quantités de NSP épaissit la couche d'eau non agitée de la muqueuse en interagissant avec les mucopolysaccharides ce qui peut réduire l'absorption et augmenter l'apport en nutriments aux microorganismes dans l'intestin favorisant ainsi la croissance de bactéries pathogènes dans le tractus gastro-intestinal (**Palliyeguru et Rose, 2014**). De même, l'épaississement de la couche muqueuse intestinale peut diminuer sa tension en oxygène, favorisant ainsi l'adhésion de *C. perfringens* sur la surface muqueuse (**Palliyeguru et Rose, 2014**).

L'autre facteur prédisposant à l'entérite nécrotique est un régime riche en protéines comme par exemple un régime à base de farine de poisson (**Drew et al., 2004; Wu et al., 2014**). Une augmentation des taux de protéines alimentaires de 24 à 38% a été associée à l'augmentation de risque d'entérite nécrotique (**Lee et al., 2018**). Le niveau de protéines brutes, la source de protéines et la teneur en acides aminés d'un régime alimentaire ont tous un effet significatif sur la population intestinale de *C. perfringens*. Ces protéines complètent les acides aminés que *C. perfringens* ne peut pas synthétiser (**Shimizu et al., 2002**). Les acides aminés peuvent jouer un rôle important dans

la prolifération de *C. perfringens*. Les taux élevés de glycine, et de lysine dans une moindre mesure, augmentent le risque d'épidémie clinique d'entérite nécrotique (**Dahiya et al., 2005; Wilkie et al., 2005**). Des acides aminés comme l'arginine ou l'acide glutamique réduisent au contraire l'entérite nécrotique en aidant à maintenir le microbiote normal. Un haut ratio de thréonine/lysine dans l'aliment ne prévient pas l'entérite nécrotique mais peut améliorer les performances des poulets (**Star et al., 2012**).

Les inhibiteurs de la trypsine présents dans les régimes à base de soja ou de pomme de terre augmentent la gravité des lésions de l'entérite nécrotique. En effet la trypsine détruit les toxines de *C. perfringens*. L'inhibition de cette enzyme est un facteur important prédisposant aux maladies entériques causées par les clostridies (**Palliyeguru et Rose, 2014; Shojadoost et al., 2012; Songer, 1996**). En ce qui concerne la complémentation de la nourriture avec des minéraux, l'addition de grosses quantités de calcium à la nourriture semble également favoriser le développement de la maladie (**Paiva et al., 2013**).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires produits par de nombreuses espèces de moisissures dont *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium*, qui se développent sur les matières premières des aliments pour animaux. Les mycotoxines contaminent une certaine partie de la nourriture utilisée dans les élevages industriels (**Schatzmayer et Streit, 2013 ; Filazi et al., 2017**). Les mycotoxines peuvent provoquer des dommages intestinaux favorisant la prolifération de *C. perfringens*. Par exemple, la présence de fumonisines (FB) crée un impact négatif sur le microbiote intestinal et l'animal hôte ce qui le prédispose à développer l'entérite nécrotique (**Antonissen et al., 2015**). La présence de déoxynivalénol (DON) dans la nourriture augmenterait de 27% le pourcentage de lésions dues à *C. perfringens*, en comparaison à une infection produite par la bactérie seule (**Antonissen et al., 2014**).

c) Les facteurs de management des élevages

Les facteurs liés à la gestion de l'approvisionnement en eau, au contrôle de la température et des systèmes de ventilation dans les élevages peuvent favoriser la maladie. L'effet de la litière humide permet la croissance de champignons et le développement ultérieur de *Clostridium*. C'est un phénomène courant dans les élevages anglais comme l'ont montré Hermans et Morgan (**2007**) dans environ 56% des fermes. La litière humide apparait quand il y a des fuites dans les abreuvoirs, lorsque les toits des installations sont vétustes ou à cause d'une mauvaise ventilation. La litière

atteint alors le seuil de saturation, perd sa friabilité et forme une couche humide en surface (**Palliyeguru et Rose, 2014**).

Les périodes de lumière sont aussi importantes comme facteur de prédisposition. Rodrigues et al. (**2018**) ont récemment rapporté que des alternances de lumière/obscurité de 18h/6h utilisées dans l'industrie prédisposent plus à développer la maladie que des périodes intermittentes de 6 heures. La génétique des oiseaux semble avoir une certaine influence sur la sensibilité à l'entérite nécrotique en raison de la réponse immunitaire à *C. perfringens* (**Hong et al., 2014; Jang et al., 2013**).

d) L'immunosuppression et le stress

Un état d'immunosuppression prédispose les animaux à l'entérite nécrotique car les facteurs qui entraînent habituellement une immunosuppression peuvent modifier l'environnement intestinal et le microbiote intestinal (**Paiva et McElroy, 2014**). L'infection par des virus tels que les virus de la maladie de Marek, de la bursite infectieuse et de l'anémie infectieuse de poulet peut avoir des effets immunosuppresseurs et créer ainsi des infections secondaires à *C. perfringens* (**Hoerr, 2010**).

Le stress a probablement les mêmes effets immunosuppresseurs que les agents pathogènes. Il affecte le microbiote protecteur et la morphologie intestinale. Il a été démontré que les facteurs de stress environnementaux dus à la chaleur ou au froid (**Calefi et al., 2018; Tsiouris et al., 2015**), de gestion globale (changements du régime alimentaire, état de la litière, humidité, surpopulation, ammoniac environnemental, programmes de vaccination) et physiologiques (maturité sexuelle) provoquent une immunosuppression, prédisposant les oiseaux à la maladie et pouvant affecter les animaux à court ou long terme (**Moore, 2016; Paiva et McElroy, 2014**).

Pour résumer, il est clair que presque tout ce qui cause du stress et entraîne un déséquilibre du microbiote du tractus gastro-intestinal représente un facteur de risque potentiel pour le développement de l'entérite nécrotique.

En dépit des efforts consentis, les mécanismes impliqués dans de nombreux facteurs de prédisposition sont encore mal compris, car il n'est pas toujours possible voire très difficile de reproduire expérimentalement les signes cliniques et les lésions de l'entérite nécrotique même quand les facteurs de prédisposition sont présents (**Van Immerseel et al., 2004**).

II.5. Modèles animaux servant à l'étude de l'entérite nécrotique

Plusieurs facteurs sont importants pour l'induction de l'entérite nécrotique *in vivo* au niveau expérimental et différents modèles de contamination peuvent être utilisés pour produire la maladie. Un des facteurs importants est le choix de la ou des souches virulentes de *C. perfringens* préalablement isolées d'animaux malades. Selon les modèles, les souches de *C. perfringens* peuvent être administrées par gavage, mélangés dans la nourriture ou de l'eau de boisson, ou d'une façon passive dans la litière. La dose et la fréquence d'administration varient selon les expériences comme le **Tableau 4** le montre. Les animaux sont prédisposés à l'infection par l'administration de virus (virus de la bursite infectieuse, virus de l'anémie du poussin et virus de la maladie de Marek) créant une immunosuppression et par une co-infection avec *Eimeria*. Les régimes à haute concentration de protéines favorisent la maladie (Lee et al., 2018; Uzal et al., 2015).

Tableau 4. Revue de certaines conditions prédisposantes testées dans les modèles expérimentaux d'entérite nécrotique

Challenge avec <i>C. perfringens</i>			Alternative évaluée	Référence
Jours de tests	Concentration de l'inoculum	Moyen d'administration		
J21	10 ⁵ UFC	Gavage	<i>Lactobacillus johnsonii</i> FI9785	La Ragione et al. (2004)
J14-J21	10 ⁸ UFC	Gavage	<i>Lb. acidophilus</i>	Li et al. (2018)
J14-J20	10 ⁸ UFC	Gavage	<i>Bacillus subtilis</i> et paroi de levure	Li et al. (2017)
J19-J20	10 ⁸ UFC	Nourriture	<i>Bacillus licheniformis</i>	Knap et al. (2010)
J19-J21	10 ⁸ UFC	Nourriture	<i>Bacillus subtilis</i> PB6	Jayaraman et al. (2018)
J14	10 ⁸ UFC	Nourriture	Extrait de levure et grains	Alizadeh et al. (2016)
J26-J27	J26 : 10 ⁹ -10 ¹⁰ UFC J27 : Mélangé avec la nourriture	Gavage Nourriture	Vaccination avec la toxine NetB recombinante	Keyburn et al. (2013)
J14-J20	10 ⁸ UFC	Gavage	Huiles essentielles et enzymes	Sun et al. (2015)
J14-J15	10 ⁸ - 10 ⁹ UFC	Gavage	Farine de poisson	Stanley et al. (2014)

J26	10 ⁹ UFC	Gavage	Réponse immunitaire	Park et al. (2008)
J17-J19	10 ⁷ UFC (2 fois/jour)	Gavage	Réponse immunitaire	McReynolds et al. (2004)
J14-J16	10 ⁸ UFC	Gavage	Réponse immunitaire	Fasina et Lillehoj (2018)
J15-J17 ou J19-J20	10 ⁷ UFC (2 fois/jour)	Gavage	Paroi de levure	Fowler et al. (2015)

II.6. Lutte contre l'entérite nécrotique

La meilleure manière de lutter contre l'entérite nécrotique est la prévention car après l'infection, le développement de la maladie est très rapide et la mortalité haute. Avant les interdictions, il était courant d'ajouter des antibiotiques dans l'eau ou des promoteurs de croissances, connus sous la dénomination AGP dans l'aliment (bacitracine, lincomycine, virginiamycine, pénicilline, avoparcine, avilamycine et nitrovine) (Paiva et McElroy, 2014; Williams, 2005). Les antibiotiques utilisés pour traiter la maladie sont indiqués dans le **Tableau 5**.

Tableau 5. Antibiotiques utilisés dans les élevages industriels pour traiter l'entérite nécrotique (Landoni et Albarells, 2015)

Antibiotiques utilisés contre l'Entérite Nécrotique	
Bactéricides	Bactériostatiques
Ampicilline	Lincomycine
Bacitracine	Tylosine
Néomycine	Avoparcine
Pénicilline G	
Streptomycine	
Spectinomycine	
Virginiamycine	

L'avoparcine, la bacitracine et la virginiamycine sont très efficaces dans la prévention et le contrôle de l'entérite nécrotique (Shojadoost et al., 2013). Mais l'utilisation excessive d'avoparcine peut créer un réservoir d'*Enterococcus* résistant à la vancomycine (ERV) (Cooper et Songer, 2009). Pour réduire ce risque, et du fait qu'elles appartiennent aux antibiotiques utilisés

en médecine humaine, ces molécules sont interdites comme AGP dans l'UE depuis 1997 et 1998 (EMA, 2015; Food and Veterinary Office, 2015). Après les restrictions sur l'usage des AGP, il y a des alternatives pour prévenir ou traiter l'entérite nécrotique, comme la vaccination avec *Eimeria* par exemple afin de réduire la prévalence de coccidiose, un facteur de prédisposition important d'entérite nécrotique. L'utilisation de toxoïdes de NetB peut offrir une bonne protection contre les entérites nécrotiques à *C. perfringens* (Paiva et McElroy, 2014). Cependant, les probiotiques comme *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Lactobacillus*, *Debaromyces hansenii*, *Saccharomyces boulardi* présentent également une stratégie de prévention intéressante (Caly et al., 2015). Moins décrite, l'utilisation de bactériophages, ou de leurs enzymes, est également envisageable. Zimmer et al. (2002) ont suggéré l'utilisation de la muréine hydrolase du bactériophage ϕ 3626 par exemple. L'adjonction de tanins, qui viennent de châtaignes, ou de mannan-oligosaccharides dans les régimes alimentaires des poulets réduits les lésions macroscopiques de l'EN (Caly et al., 2015; Diaz-Carrasco et al., 2016). La sélection génétique des lignées de poulets, peut également être envisagée pour réduire le risque de développement de l'entérite nécrotique dans les élevages de volailles. Ainsi certaines lignées de poulets peuvent produire naturellement de manière accrue des peptides antimicrobiens comme les gallinacines (renommées β -défensines aviaires ou AvBDs), à partir de leucocytes ou de cellules épithéliales intestinales, ayant des activités contre *Salmonella*, *Listeria* ou *E. coli* (Derache et al., 2009b, 2009a; Sadeyen et al., 2006) Ainsi certaines lignées peuvent produire des peptides antimicrobiens comme les gallinacines, à partir de leucocytes, ayant des activités contre *Listeria* ou *E. coli* (Cuperus et al., 2013).

III. Utilisation des antibiotiques en santé animale

Le code sanitaire de l'OIE pour les animaux terrestres définit les agents antimicrobiens comme « des médicaments essentiels qui tuent les micro-organismes ou arrêtent leur croissance » (OIE, 2018). Ces molécules comprennent des agents actifs contre les bactéries, les protozoaires, les virus et les champignons. La catégorie d'agent antimicrobien la plus utilisée, et qui présente actuellement le plus grand intérêt pour la santé publique, est la classe des antibactériens connu comme antibiotiques.

Au siècle dernier, les antibiotiques ont été, à juste titre, salués comme des « médicaments miracles » et ont été considérés comme l'une des avancées majeures de la médecine moderne (**Rossolini et al., 2014**). Leur développement et leur utilisation ont rapidement entraîné une diminution spectaculaire des taux de mortalité et de morbidité associés aux infections bactériennes courantes (**Levy, 1992**). A partir des années 1950, ils ont été utilisés comme promoteurs de croissance ou AGP, et ont permis d'améliorer la croissance chez les jeunes animaux (jusqu'à 8% de gain en poids) et aussi accroître l'efficacité de la conversion alimentaire (**Acar et al., 2000; Bywater, 2005; Dumonceaux et al., 2006**). L'utilisation d'agents antimicrobiens dans les élevages permet la croissance d'animaux sains, en réduisant l'incidence des maladies, une morbidité et une mortalité diminuées et une productivité accrue (**Page et Gautier, 2012**).

Les antibiotiques les plus efficaces ciblent les ribosomes (affectant la synthèse des protéines), l'ADN gyrase ou l'ADN topoisomérase (affectant la synthèse de l'ADN) ou la synthèse de la paroi cellulaire. D'autres antibiotiques ciblent la synthèse des ARN, les voies du métabolisme de l'acide folique (vitamine B9) et la membrane cellulaire bactérienne (**Lewis, 2013; Morar et Wright, 2010**).

III.1. Antibiotiques utilisés dans les élevages industriels

De nombreux types d'antibiotiques sont utilisés dans les élevages industriels (**OIE, 2013**). L'administration d'agents antimicrobiens dans les aliments pour animaux est l'une des pratiques les plus largement adoptées dans le monde (43,4%). L'aliment contenant les antibiotiques peut être présenté sous forme de mélange libre en vrac, de purée, de miettes ou de granulés. Une autre voie d'administration possible des antibiotiques est par l'addition à l'eau de boisson (28,6%), en particulier dans les élevages de porcs et de volailles (**Page et Gautier, 2012**)(**Figure 12**).

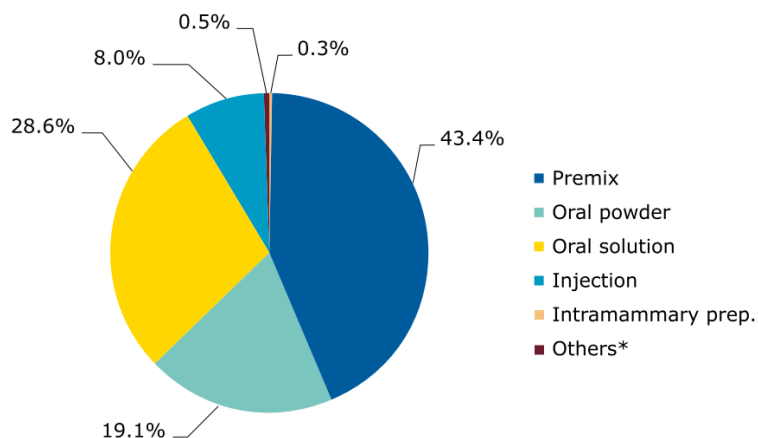


Figure 12. Répartition des ventes en 2015 (en mg/UCP¹) des méthodes d'administration des agents antimicrobiens vétérinaires pour les élevages industriels, dans 30 pays européens. (Source: European Medicines Agency and European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2017).

Les antibiotiques les plus fréquemment utilisés dans les élevages en Europe et aux Etats-Unis appartiennent aux classes des tétracyclines, des pénicillines et des sulfonamides (ESVAC, 2017; FDA, 2016). La **Figure 13** montre le cas spécifique de l'UE.

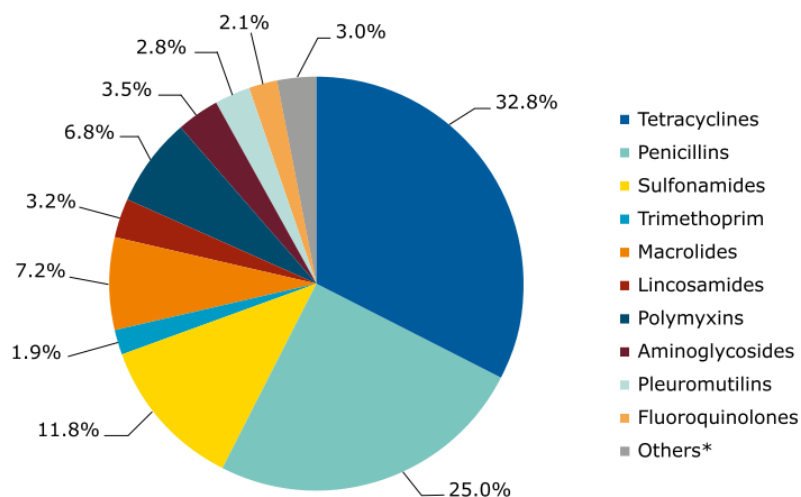


Figure 13. Catégories et commercialisation, en 2015, des agents antimicrobiens vétérinaires en pourcentages des ventes totales d'espèces productrices d'aliments, en mg / UCP dans 30 pays européens. (Source: European Medicines Agency and European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2017).

¹ Une unité de correction de la population (UCP) est utilisée comme indicateur de la taille de la population d'animaux producteurs de denrées alimentaires.

Un antibiotique est considéré comme un promoteur de croissance lorsqu'il est administré aux animaux en concentrations non thérapeutiques pour favoriser la croissance et améliorer l'efficacité de conversion alimentaire (**Page et Gautier, 2012**). Les AGPs sont généralement administrés à des concentrations relativement faibles, allant de 2,5 mg/kg à 125 mg/kg (ppm), en fonction du type d'antibiotique et de l'espèce animale (**OMS, 2004**). Deux hypothèses sont proposées pour expliquer la fonction AGP des antibiotiques. Pour certains auteurs, ils modifient la composition du microbiote intestinal, mais ils sont capables de réduire la compétition pour les nutriments ou prévenir la colonisation des agents pathogènes. D'autres auteurs proposent que les AGP modifient la physiologie des intestins de l'hôte par le contrôle de l'inflammation (**Brown et al., 2017; Bywater, 2005; Dumonceaux et al., 2006**).

III.2. Les antibiotiques utilisés chez la volaille

Les antibiotiques les plus utilisés chez les volailles sont listés dans le **Tableau 6 (Landoni et Albarellos, 2015)**. Certains de ces antibiotiques sont des AGPs non autorisés en alimentation animale en Europe. C'est le cas de l'avilamycine, l'avoparcine, la bacitracine, la flavomycine, la spiramycine, la tylosine et la virginiamycine.

Cette décision ayant pour but de réduire la pression sélective à laquelle les bactéries sont soumises. En effet, depuis plusieurs décennies, les bactéries ont développé de multiples mécanismes de résistance rendant les traitements prophylactiques actuels peu efficaces. L'utilisation abusive de ces molécules en médecine humaine et vétérinaire a provoqué une pression sélective qui a accéléré l'évolution et la propagation des bactéries résistantes aux antibiotiques (**Blair et al., 2015 ; D'Costa et al., 2011**). Le développement des médicaments, ou les classes de médicaments susceptibles d'être disponibles dans un avenir proche, est plus lent que le développement des résistances par les bactéries (**O'Neill, 2014**) ce qui se traduit en une pandémie croissante (**Cars, 2008**). Pour de nombreuses populations dans le monde, en particulier celles des pays en voie de développement, les possibilités thérapeutiques sont revenues à l'ère du pré-antibiotique en raison de la résistance croissante de bactéries. comme par exemple, *E. coli* (**Rossolini, 2015**). En Europe et aux Etats-Unis, chaque année 50 000 morts sont associés à des infections par des bactéries pathogènes (multi)résistantes. Au niveau mondial, le nombre de décès

annuels associés à la résistance aux antibiotiques sont actuellement estimés à 700 000 décès par an (O'Neill, 2014).

Tableau 6. Antibiotiques utilisés dans l'élevage de volaille dans les états membres de l'OIE (OIE, 2013)

Spectinomycine	Lincomycine	Florphenicole	Sulfadiméthoxine
Streptomycine	Erythromycine	Thiamphenicole	Sulfadimidine
Dihydrostreptomycine	Carbomycine	Fosfomycine	Sulfaguanidine
Kanamycine	Josamycine	Tiamuline	Sulfadiméthoxazole
Néomycine	Kitasamycine	Valnemuline	Sulfaméthoxine
Paromomycine	Spiramycine	Enramycine	Sulfamonométhoxine
Apramycine	Tilmicosine	Bacitracine	Sulfanilamide
Fortimycine	Tylosine	Colistine	Sulfaquinoxaline
Gentamicine	Mirosamycine	Flumequine	Sulfaméthoxy-pyridazine
Roxarsone	Terdecamycine	Acide oxolinique	Triméthoprim+Sulfonamide
Nitarosone	Tylvalosine	Ciprofloxacine	Triméthoprime
Bicozamycin	Avilamycin	Danofloxacine	Ormetoprime
Ceftiofur	Benzylpenicilline	Difloxacine	Virginiamycine
Ceftriaxone	Penéthamate	Enrofloxacine	Tétracycline
Lasalocid	Amoxicilline	Marbofloxacine	Nosiheptide
Maduramycin	Ampicilline	Norfloxacine	Sulfachlorpyridazine
Monensin	Amoxicilline + Acide Clavulanique	Ofloxacine	Semduramicine
Narasin	Ampicilline + Sulbactame	Chlortétracycline	Dicloxacilline
Salinomycin	Phénoxy-méthylpenicilline	Doxycycline	Oxytétracycline

Aujourd'hui la majorité des antibiotiques utilisés dans le monde est également utilisée chez les animaux destinés à l'alimentation humaine : Aux Etats-Unis par exemple, on estime que l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux destinés à l'alimentation représente environ 80% de la consommation annuelle d'antibiotiques du pays (Van Boeckel et al., 2015). L'utilisation principale chez les animaux destinés à l'alimentation (lorsqu'ils peuvent être mesurés) reste un usage en tant qu'AGP mais aussi en prophylaxie de masse (Sanders et al., 2017).

III.3. Mécanismes de résistance et transmission

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques incluent la résistance (i) intrinsèque, (ii) acquise par des éléments génétiques mobiles et (iii) adaptative (**Figure 14**). La résistance intrinsèque aux antibiotiques est un phénomène naturel antérieur à l'ère de l'utilisation des antibiotiques par l'Homme. Il s'agit d'un caractère naturellement présent dans le génome d'une espèce bactérienne, indépendamment de l'action de l'antibiotique et qui n'est pas sujet au transfert horizontal de gènes. Les mécanismes de la résistance intrinsèque les plus caractéristiques sont la perméabilité de la membrane externe bactérienne et les pompes d'efflux (**Cox et Wright, 2013**). La résistance acquise, quant à elle, peut être transmise horizontalement ou verticalement. Pour une transmission horizontale, les bactéries acquièrent du matériel génétique externe grâce à différentes stratégies comme la transformation (incorporation d'ADN disponible dans l'environnement), la transduction (médiation par phage) ou la conjugaison (transfert de matériel génétique entre deux bactéries en contact direct) (**Munita et Arias, 2016**). Pour une transmission verticale, des mutations spontanées apparaissent au sein de gènes localisés sur le chromosome et sont ensuite transmis aux descendants lorsque la bactérie se multiplie (**Cox et Wright, 2013**).

Resistance aux antibiotiques

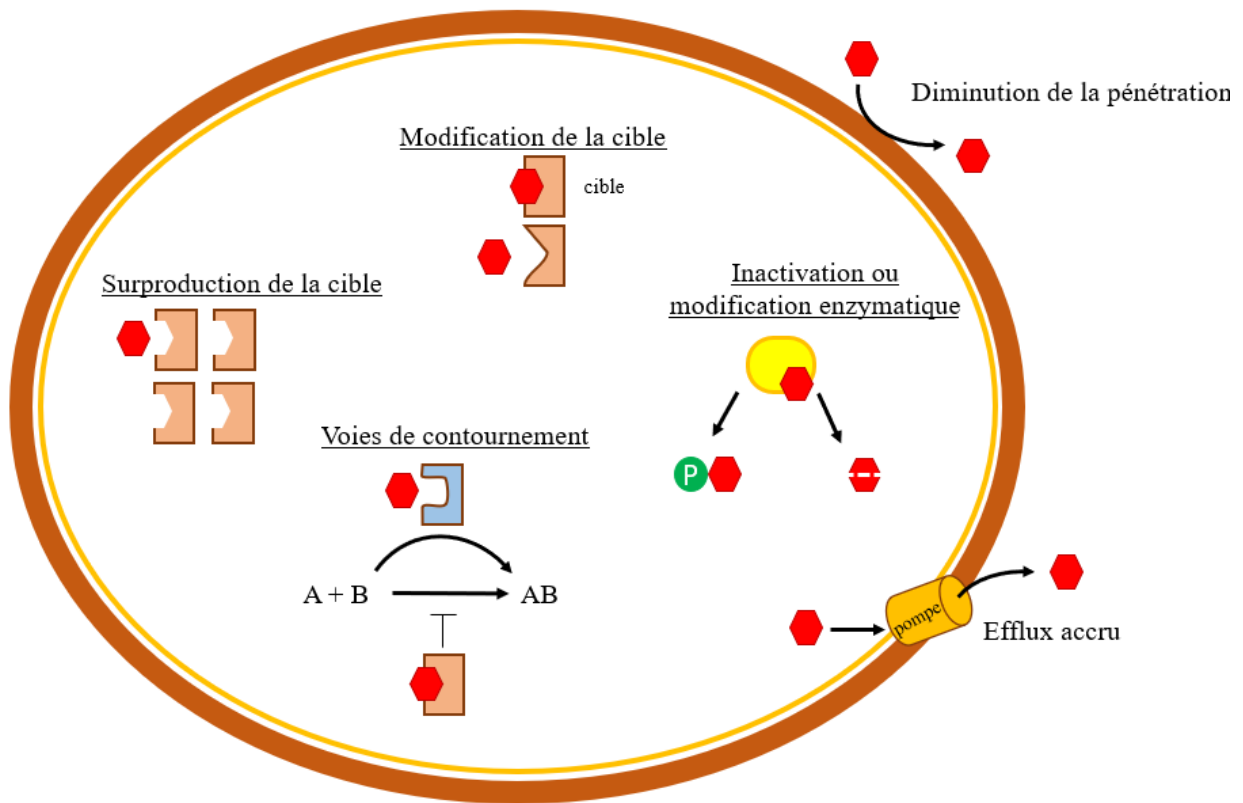


Figure 14. Mécanismes de résistance aux antibiotiques (Adaptée de **Lewis (2013)** et **Wright (2010)**)

Pour Rossolini et al. (2014), les principales espèces résistantes sont :

- Le phénotype SARM est dû à l'expression de protéines de liaison à la pénicilline, codées par les gènes *mec* acquis horizontalement, qui ne sont pas inhibées par les β -lactames classiques.
- *Pseudomonas aeruginosa* résistant à toutes les classes d'agents anti-*Pseudomonas*, à l'exception des polymyxines. Ces souches ont acquis plusieurs déterminants de résistance par mutation, tels que les pompes à efflux Mex ou l'AmpC β -lactamase, ou affectant les régions de topoisomérases déterminant la résistance aux quinolones et / ou par l'acquisition horizontale de gènes de résistance tels que ceux codant les enzymes modifiant les aminoglycosides, bêta-lactamases à large spectre ou les carbapénèmes. Même, l'augmentation de l'utilisation des polymyxines pour traiter ces infections ont fait que *Pseudomonas* développe la résistance aussi aux polymyxines (**Fernández et al., 2013**).

- *Acinetobacter* spp. (principalement *Acinetobacter baumannii*) est devenu l'un des acteurs majeurs de la crise actuelle de résistance aux antibiotiques. Le défi dans ce cas est dû aux souches d'*Acinetobacter* résistantes aux carbapénèmes, qui résistent généralement à tous les agents anti-*Acinetobacter* disponibles, à l'exception des polymyxines.
- Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (principalement *Klebsiella pneumoniae* ou *E. coli*) représentent l'évolution la plus récente et la plus inquiétante de la crise de la résistance aux antibiotiques. Les *Enterobacteriaceae* ont développé au moins deux mécanismes de résistance aux carbapénèmes: la réduction de la perméabilité de la membrane externe par altération de la porine associée à la production d'une β -lactamase à large spectre ou à la production d'une β -lactamase du type AmpC et la production de β -lactamases à activité carbapénémase. L'évolution la plus récente étant l'émergence de la résistance à la polymyxine, en particulier les résistances à la colistine et l'apparition du gène *mcr-1* transférable (Liu et al., 2016). Depuis la découverte de ce gène, la réglementation sur les polymyxines et particulièrement la colistine a légèrement changé, dès lors que cet antibiotique est inscrit sur la liste des antibiotiques critiques. De la même manière la saine de l'Anses sur cet antibiotique déconseille toute association synergique avec d'autres antibiotiques (Avis de l'Anses, 2016)(<https://www.anses.fr/fr/content/avis-de-lanses-relatif-%C3%A0-la-saisine-n-2016-sa-0160-concernant-1%E2%80%99utilisation-de-la-colistine>).
- Les entérocoques résistant à la vancomycine (ERV), principalement *Ent. faecium* et moins fréquemment *Ent. faecalis*, se limitent principalement aux établissements de santé et leur prévalence reste relativement faible dans le monde entier (Brown et al., 2017).

III.4. Mesures d'action contre la résistance aux antibiotiques

Pour faire face à la problématique de multirésistance aux antibiotiques, la communauté scientifique et les autorités publiques encouragent une meilleure gestion des antibiotiques disponibles et le développement de concepts nouveaux visant une réduction significative de leur utilisation tant en santé humaine qu'en santé animale (FAO, 2016b). La FAO en collaboration avec

l'OMS et l'OIE ont élaboré un plan d'action 2016-2020 visant le management de la résistance aux antibiotiques. Pour atteindre un objectif : la diminution de l'incidence des résistances aux antibiotiques. Pour se faire ils proposent de :

- (1) mieux sensibiliser les différents acteurs au problème de la résistance aux antibiotiques et aux menaces connexes ;
- (2) renforcer les capacités de surveillance et de suivi de la résistance aux antimicrobiens et de l'utilisation des antimicrobiens dans le secteur de l'alimentation et de l'agriculture ;
- (3) renforcer la gouvernance relative à l'utilisation d'agents antimicrobiens et à la résistance aux antimicrobiens dans le secteur de l'alimentation et de l'agriculture ;
- 4) promouvoir les bonnes pratiques au sein des secteurs de l'alimentaire et agricole ainsi qu'une utilisation prudente des agents antimicrobiens (**FAO, 2016b**).

Pour éviter la perspective alarmiste d'une inefficacité totale des antibiotiques, les gouvernements ont légiféré, mais aussi communiqué abondamment au travers de campagnes de sensibilisation, dans le but de réduire l'utilisation des antibiotiques, et ainsi préserver l'efficacité de ceux-ci. En 2003, l'UE a interdit l'ajout d'antibiotiques utilisés en médecine humaine aux aliments pour animaux (aliments médicamenteux). Le règlement 1831/2003/CE sur les additifs alimentaires a complété la mesure avec l'interdiction totale des antibiotiques en tant que facteurs de croissance à partir du 1er janvier 2006. Les stratégies adoptées comprennent des objectifs nationaux de réduction de l'utilisation des antibiotiques, l'analyse comparative de leur utilisation, des contrôles sur la prescription et des restrictions sur l'utilisation des molécules présentant une importance critique, ainsi que des améliorations des mesures de prévention et de contrôle des maladies dans les élevages (**Murphy et al., 2017**) Cela a eu pour effet des réductions dans les ventes d'agents antimicrobiens comme le montre la **Figure 15**.

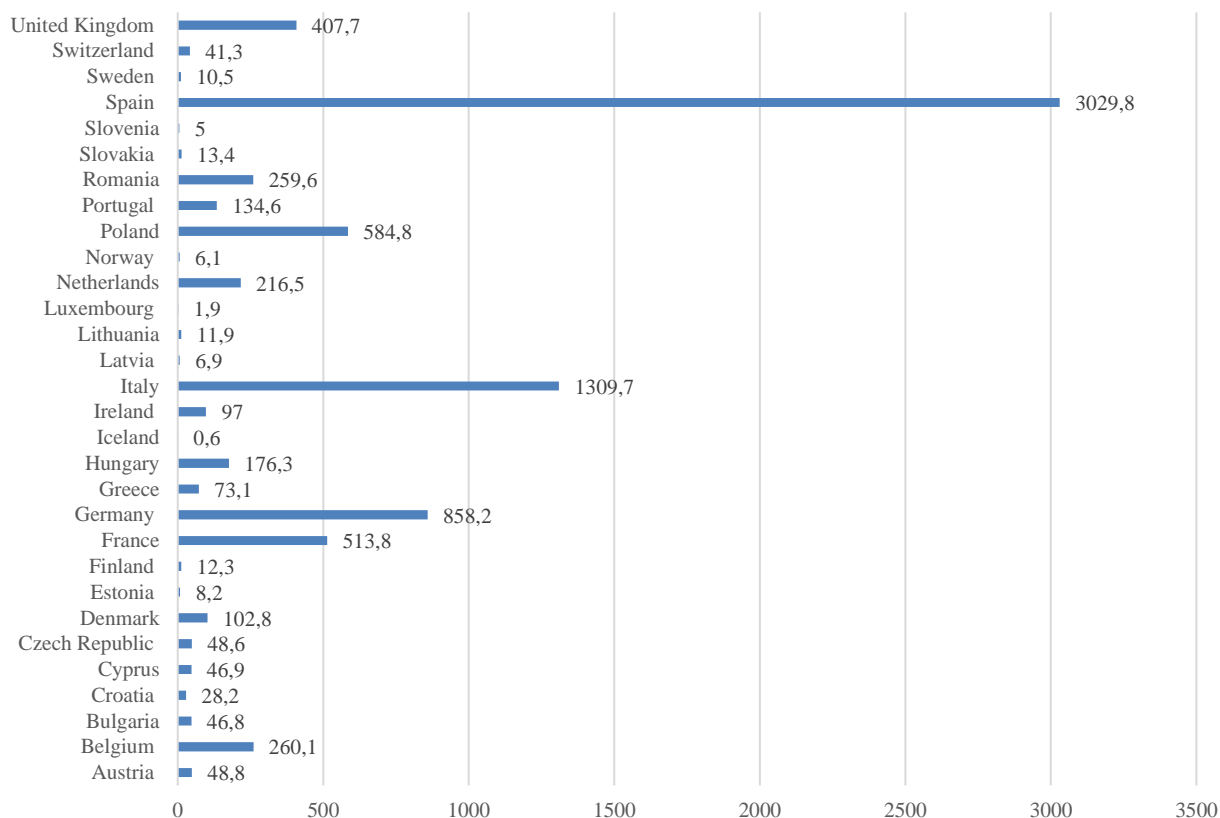


Figure 15. Répartition des ventes totales, en 2015, d'agents antimicrobiens vétérinaires (en tonnes de matière active) par pays. Données obtenues d'European Medicines Agency and European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, (2017).

En France, en 2016 le volume moyen des ventes d'antibiotiques à destination des volailles était de l'ordre de 139 tonnes. L'indicateur français ALEA qui permet d'estimer l'exposition des animaux aux antibiotiques - qui est mesuré depuis 1999 - est en nette diminution en raison du plan ECOANTIBIO mis en place (plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire). Ainsi les valeurs obtenues en 2016 ont montré une baisse de 20,5 % par rapport à la moyenne des années 2014 et 2015. D'après les données d'ALEA (**Tableau 7**) sur ces deux dernières années, les volailles sont traitées majoritairement avec des polypeptides, des tétracyclines, et des pénicillines, puis avec des sulfamides et triméthoprime (**ANSES, 2017**).

Tableau 7. Exposition des volailles aux antibiotiques (Années 2014-2015 versus 2011) (ANSES, 2017).

% réduction	
Amynoglycosides	54,44
Fluoroquinolones	29,73
Lincosamides	94,15
Macrolides	18,65
Penicillines	9,40
Pleuromutilines	74,28
Polypeptides	17,30
Quinolones	32,03
Sulfamides	16,88
Tetracyclines	31,96
Triméthoprime	17,96
Total	22,05

D'autres pays hors UE ont également interdit les antibiotiques comme AGPs. C'est le cas du Mexique, de la Nouvelle-Zélande et la Corée du Sud (Maron et al., 2013). Dans certains pays (États-Unis, Canada, Japon), l'interdiction n'est pas appliquée mais serait remplacée par des lignes directrices et des recommandations visant à réduire l'utilisation des AGPs dans la production animale (Brown et al., 2017; Laxminarayan et al., 2015).

Malgré les efforts faits dans ces pays, l'utilisation d'antibiotiques chez les animaux destinés à l'alimentation devrait augmenter rapidement d'au moins 67% entre 2010 et 2030 en raison l'augmentation constante de la demande de produits carnés dans les pays en développement notamment les pays BRICS (Brésil, Russie, Inde, Chine et Afrique du Sud). Dans ces pays, la quantité d'antibiotiques produite à cette fin devrait atteindre 105 000 tonnes en 2030, contre 63 000 tonnes en 2010 (Van Boeckel et al., 2015).

III.5. Le concept de seule sante ou One-Health

Bien que le terme *One-Health* soit relativement nouveau, le concept est connu de longue date. Depuis les années 1800, les scientifiques ont noté la similitude des processus pathologiques chez les animaux et chez l'Homme. Cependant, les pratiques de la médecine humaine et animale ont été séparées jusqu'au 20^{ème} siècle, où le concept *One-Health* a été davantage reconnu dans les secteurs de la santé publique et de la santé animale (CDC, 2016).

Les bactéries résistantes se propagent de personne à personne, d'animal à animal et de personnes à des animaux et à l'environnement, ou inversement. Ces bactéries se retrouvent également fréquemment dans les aliments produits à partir d'animaux ayant reçu des antibiotiques. Les processus d'abattage et les réseaux de distribution entraînent une contamination croisée de nombreux produits alimentaires avec des bactéries résistantes (Landers et al., 2012). L'utilisation intensive des antimicrobiens dans tous les secteurs (agricoles et santé humain) implique leur dissémination dans l'environnement, en particulier dans l'eau (par le biais des excréments et des déchets) et les sols. Dans ces biotopes, les bactéries résidentes sont donc exposées aux antibiotiques, souvent à de faibles concentrations (FAO, 2016b). L'approche « *One-Health* » du problème de la résistance aux antimicrobiens permettra de percevoir globalement la résistance aux antibiotiques (Figure 16).

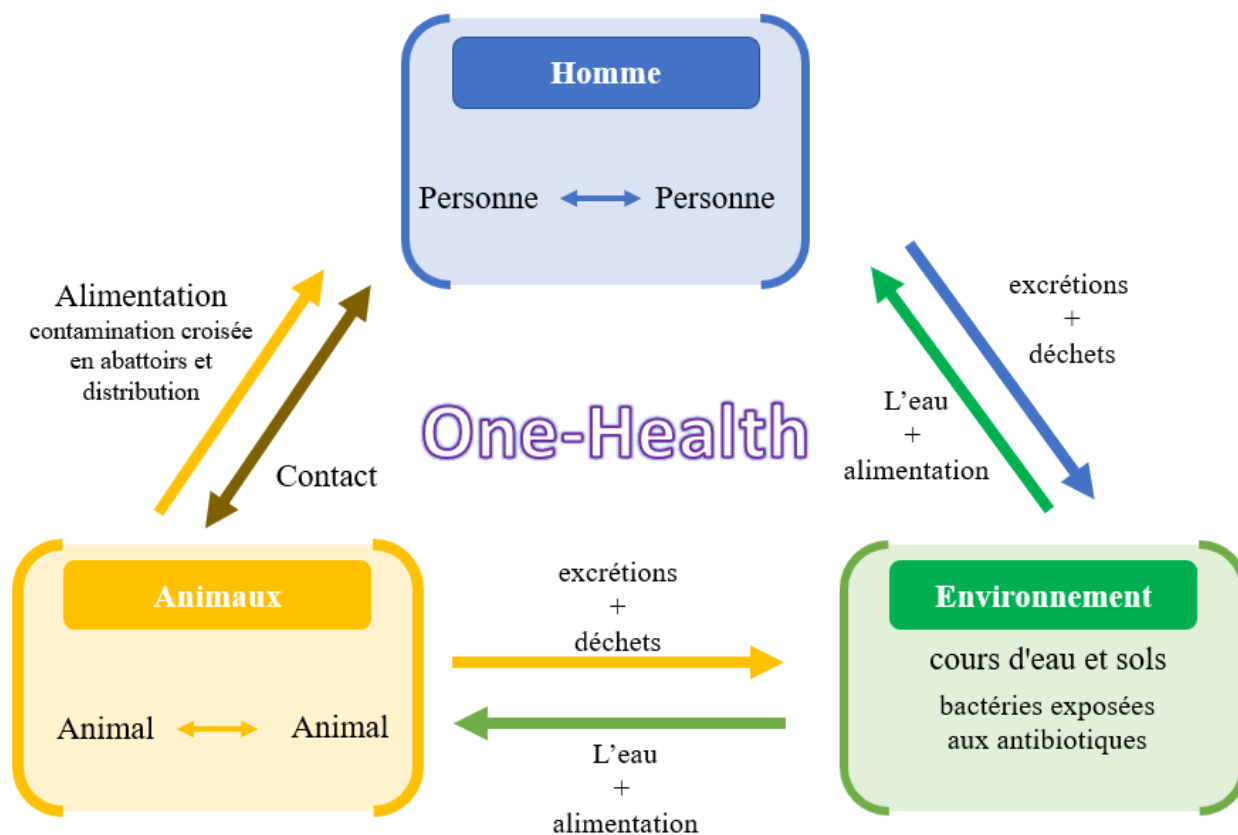


Figure 16. Concept de seule-santé dite *One-Health* sur la transmission de bactéries résistantes aux antibiotiques.

III.6. Les stratégies alternatives aux antibiotiques

Pour surmonter l'augmentation du taux de mortalité et de morbidité liée à l'interdiction des antibiotiques dans l'alimentation animale, de nombreuses recherches sont en cours pour trouver des solutions de remplacement viables permettant d'obtenir des performances similaires à celles obtenues avec les antibiotiques (Millet et Maertens, 2011). Les autorités publiques appellent à une meilleure gestion de l'efficacité des antibiotiques disponibles, et à développer des concepts visant une réduction significative des antibiotiques tant en santé humaine qu'en santé animale. Cette réduction peut s'exercer à travers la combinaison de différentes molécules antibiotiques pour créer des effets synergiques, ou à de nouvelles alternatives comme les vaccins, les bactériophages et leurs lysines ; les peptides antimicrobiens; les probiotiques, les prébiotiques et symbiotiques, les extraits de plantes; les inhibiteurs ciblant la pathogénicité, etc. (Cheng et al., 2014).

La vaccination est considérée comme une des alternatives les plus intéressantes en raison de sa faisabilité et de son efficacité. La vaccination est une méthode préventive, les vaccins sont généralement classés en vaccins vivants atténués ou inactivés/tués (**Dahiya et al., 2006**). Les vaccins inactivés ou tués peuvent être efficaces pour fournir une protection contre les infections systémiques et les maladies, mais la protection fournie par ces vaccins à une capacité limitée à empêcher la colonisation des surfaces muqueuses. Diverses études ont démontré que l'utilisation de divers vaccins bactériens et viraux dans les populations animales peut entraîner une réduction significative de la consommation d'antibiotiques (**Hoelzer et al., 2018b, 2018a**).

Les bactériophages sont des virus qui infectent et se multiplient chez les bactéries. Les phages peuvent être classés selon qu'ils aient des cycles de vie virulents (lytiques) ou tempérés. Ceux à usage thérapeutique sont lytiques, présentant un cycle infectieux virulent auto-répliquant qui entraîne une dégradation rapide de l'ADN de la bactérie hôte, la réplication des phages et la lyse de la bactérie avec libération de phages de la descendance (**Caly et al., 2015; Johnson et al., 2008**). Les bactériophages pourraient être administrés à faibles doses car ils se répliquent lorsque leur bactérie hôte est présente. Leur usage est attrayant en raison de la spécificité phage - souche cible (**Joerger, 2003**).

Les enzymes lytiques (endolysines) ont été identifiées comme traitement potentiel contre les bactéries. Des enzymes comme la glucosidase, l'amidase, l'endopeptidase, la transglycosylase, appartiennent au groupe des endolysines ; elles sont générées au cours du cycle lytique tardif du phage en provoquant une dégradation du peptidoglycane de la bactérie hôte, permettant la libération de nouveaux phages à partir des bactéries infectées (**Cheng et al., 2014**). Ici le but de cette stratégie, pour un usage en industrie agroalimentaire, est de réussir à concevoir et à exprimer des enzymes pour qu'elles soient utilisées dans presque tous les environnements dans lesquels vivent les cellules bactériennes (**Kon et Rai, 2016**).

Les composés phytochimiques sont des métabolites secondaires des plantes jouant un rôle dans les mécanismes de défense contre les micro-organismes. Les substances antimicrobiennes à base de plantes peuvent être divisées en composés phénoliques, terpénoïdes (huiles essentielles), alcaloïdes, lectines et polyacétylènes (**Cowan, 1999**). Les molécules phytochimiques sont certifiées GRAS car ces substances actives sont utilisées depuis des temps immémoriaux comme agents aromatisants et comme ingrédients actifs dans une multitude de produits commerciaux, comme l'origan (carvacrol), le thym (thymol), ou le clou de girofle (eugénol) (**Hofacre et al.,**

2018). Les principaux modes d'action des huiles essentielles sur les cellules bactériennes sont la rupture de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique qui provoquent la fuite du contenu et des ions de la cellule, et dans le cas des composés phénoliques, l'abolition de la force proton motrice, du flux d'électrons et du transport actif (**Kon et Rai, 2016**).

Les inhibiteurs ciblant la pathogénicité comprennent les inhibiteurs du *quorum sensing*, de la formation de biofilms et de la virulence. La pathogénicité bactérienne est en partie régie par le système de régulation QS. En effet, le système QS est un processus de communication bactérienne qui dépend de la densité de la population bactérienne. Il se compose de molécules de signalisation appelés auto-inducteurs, de récepteurs et de protéines régulatrices en aval (**Bhardwaj et al., 2013**). Les inhibiteurs ciblant le QS peuvent bloquer les fonctions du système QS et empêcher ainsi la virulence bactérienne. Il a été rapporté que les bactéries sont plus sensibles aux antibiotiques lorsque ceux-ci sont utilisés en combinaison avec des inhibiteurs de QS (**Cheng et al., 2014**). Les biofilms sont des consortiums de bactéries structurés incorporés dans une matrice polymère autoproduite constituée de polysaccharides, de protéines et d'ADN. Les bactéries formant des biofilms peuvent provoquer des infections chroniques car ces structures confèrent une tolérance accrue aux antibiotiques et aux produits chimiques désinfectants, ainsi qu'une résistance à la phagocytose et à d'autres composants du système de défense de l'organisme (**Czaplewski et al., 2016; Høiby et al., 2010**). La vie du biofilm implique l'adhésion des cellules bactériennes, la régulation du QS, la maturation du biofilm et la propagation des bactéries. En conséquence, un seul médicament peut difficilement éliminer complètement les agents pathogènes dans ces structures (**Cheng et al., 2014**). A ce jour, plusieurs composés anti-biofilm ont été identifiés à partir de diverses sources naturelles, par exemple les furanones bromées, l'ail ou l'acide corosolique (**Rabin et al., 2015**).

Les prébiotiques, qui sont pour la plupart des oligosaccharides non digestibles, sont des additifs stimulant la flore commensale et améliorant la santé à l'hôte. Il existe un ensemble de prébiotiques d'origines et aux propriétés chimiques diverses. Les exemples de prébiotiques les plus connus sont l'inuline, les FOS, les GOS, le MOS, la lactulose et le polydextrose. Il y a également de nouveaux prébiotiques prometteurs comme les isomaltooligosaccharides, les XOS et les arabinooligosaccharides dérivés de la fibre de blé (**Patel et Goyal, 2012**). Certains d'entre eux peuvent favoriser l'absorption des minéraux et réguler le métabolisme (**Cheng et al., 2014**).

Les probiotiques sont des microorganismes qui, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte. Les probiotiques peuvent interagir avec l'hôte pour améliorer l'immunité et la morphologie intestinale ou stimuler le métabolisme. Ils réduisent le risque d'infection par des agents pathogènes opportunistes en produisant des molécules ayant des activités antimicrobiennes, ou en entrant en compétition avec les souches pathogènes de l'hôte pour l'accès aux nutriments ou aux sites d'adhésion (**Caly et al., 2015**). Nous nous intéresserons à ces microorganismes plus en détails dans la section suivante.

Les symbiotiques sont les combinaisons des probiotiques et des prébiotiques et ont donc le double rôle. Les prébiotiques renforcent également les effets bénéfiques des probiotiques quand ils sont administrés sous formes combinées en tant que symbiotiques (**Cheng et al., 2014**).

Les peptides antimicrobiens (PAM) sont classés en deux catégories, selon leur mécanisme de synthèse ribosomique ou non ribosomique. Les PAM non ribosomiques, sont principalement produits par des bactéries. Ils sont synthétisés par des peptides synthétases avec ou sans modifications structurelles. Les PAM synthétisées par voie ribosomique peuvent être classées en fonction de leur origine, telles que les mammifères, les oiseaux, les amphibiens, les insectes, les plantes, les bactéries, les virus, etc. (**Hancock et Scott, 2000**). Les PAM produits par les animaux présentent un large spectre d'activité. Ils sont localisés plutôt dans les zones qui sont les plus susceptibles chez les animaux d'entrer en contact avec les pathogènes provenant de l'environnement. La famille de PAM plus présente dans le règne animal est celle des defensines (**Han et al., 2011; Hancock et Scott, 2000**).

Les bactériocines sont des PAM synthétisés par voie ribosomique. Elles sont décrites comme des molécules capables d'inhiber la croissance d'espèces étroitement apparentées à la souche productrice (bactériocinogènes) grâce à de nombreux mécanismes (**Chikindas et al., 2018**). Les bactériocines synthétisées par les bactéries lactiques ont la capacité de tuer ou d'inhiber les bactéries actives à des concentrations nanomolaires, contrairement aux peptides antimicrobiens produits par les cellules eucaryotes, qui ont d'ailleurs potentiellement des activités inférieures (**Drider et al., 2016**).

IV. Les probiotiques

Ce terme, qui vient de la combinaison du latin « pro » qui veut dire pour, et « bios » du grec « biotique » qui veut dire vie, a été introduit en 1953 par le scientifique allemand Werner Kollath

pour désigner « des substances actives indispensables à un développement sain de la vie » (**Gasbarrini et Bonvicini, 2016**). Actuellement, la définition la plus répandue et reconnue est celle donnée par la FAO et l’OMS. Ces deux institutions ont défini les probiotiques comme «des microorganismes vivants qui, lorsqu’ils sont administrés en quantités suffisantes, confèrent un bénéfice pour la santé de l’hôte » (**FAO/OMS, 2002**).

IV.1. Critères de sélection des probiotiques

Fuller, en **1989**, a énuméré toutes les caractéristiques typiques d’un probiotique :

1. Il s'agit d'une souche capable d'exercer un effet bénéfique sur l'animal hôte.
2. Il doit être non pathogène et non toxique.
3. Il doit être présent sous forme de cellules viables, de préférence en grand nombre.
4. Il doit être capable de survivre et être actif. Dans l'environnement intestinal, par exemple, il doit résister aux faibles valeurs de pHs et aux acides organiques.
5. Il doit être stable et rester viable pendant les périodes de stockage et les conditions du terrain.

IV.2. Historique

L’histoire des probiotiques est intimement liée à l'utilisation d'aliments fermentés. L'utilisation de probiotiques dans les aliments remonte à l'Antiquité. Les premiers fabricants de produits alimentaires ont transformé le lait en produits laitiers fermentés à l'aide de bactéries et de levures, sans avoir conscience de leur existence. Les archéologues ont trouvé des preuves de l’utilisation de microorganismes dans les boissons fermentées dès 7 000 avant JC dans le village néolithique de Jiahu en Chine (**Gasbarrini et Bonvicini, 2016; Ozen et Dinleyici, 2015**).

Les yaourts et autres laits fermentés par des probiotiques doivent être considérés comme les premiers aliments fonctionnels (**Azizpour et al., 2009**). Elie Metchnikoff suggéra une relation causale entre la longévité des populations rurales bulgares et la consommation régulière de produits laitiers fermentés tel le yaourt (**Fuller, 1992**). Les propriétés sanitaires de ces produits laitiers faisaient partie du folklore jusqu'à l'apparition du concept de probiotiques, et leur étude formelle. Plusieurs peuplades ont utilisé des produits fermentés pour se guérir de certaines pathologies, car ces aliments sont très nutritifs, ils contiennent des micro-organismes vivants capables de

combattre certaines infections, et ils sont, en outre, un moyen d'augmenter le goût et la digestibilité des aliments (**Gasbarrini et Bonvicini, 2016; Ozen et Dinleyici, 2015**). Si Louis Pasteur a identifié les microorganismes responsables du processus de fermentation, Metschnikoff (**1907**), un scientifique russe travaillant à l'Institut Pasteur de Paris, tente dès 1907 de découvrir l'effet possible de ces « microbes » sur la santé humaine. Il a suggéré que lactobacilles pouvaient contrer les effets de putréfaction du métabolisme gastro-intestinal en réduisant le pH du côlon (par utilisation du lactose), en inhibant la croissance des bactéries protéolytiques (**Azizpour et al., 2009; Ozen et Dinleyici, 2015**).

Actuellement, à l'ère où les probiotiques commencent à trouver toute leur place en alimentation et en santé humaine et animale, différentes sociétés qui analysent les tendances du marché comme Transparency Market Research, Variant Market Research, INK WoodResearch ou CISION PR Newswire indiquent que le chiffre d'affaires du marché mondial des probiotiques devrait augmenter de 7,4% à 8,3% pour la période 2018 à 2026. Cette augmentation étant due à la sensibilisation des consommateurs à l'utilisation de probiotiques (**Elshagabee et al., 2017**).

IV.3. Marché des probiotiques et domaines d'applications

En raison de leurs capacités les bactéries lactiques sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire comme conservateur biologique des aliments ou dans les élevages industriels pour la prévention des maladies infectieuses et zoonotiques (**Quinto et al., 2014**) (**Figure 17**). Ces bactéries sont aussi utilisées pour améliorer la performance des élevages animaux grâce à la production d'enzymes digestives, d'acides gras volatiles et/ou de vitamines, qui participent à l'augmentation de la digestibilité des nutriments et l'amélioration du taux de conversion des aliments (**Liao et Nyachoti, 2017; Russo et al., 2014; Sharifuzzaman et Austin, 2017**). L'EFSA présente la liste des probiotiques parmi eux les bactéries lactiques qui peuvent être ajoutés intentionnellement aux denrées alimentaires ou aux aliments pour animaux pour son statut QPS (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2017.4664>).

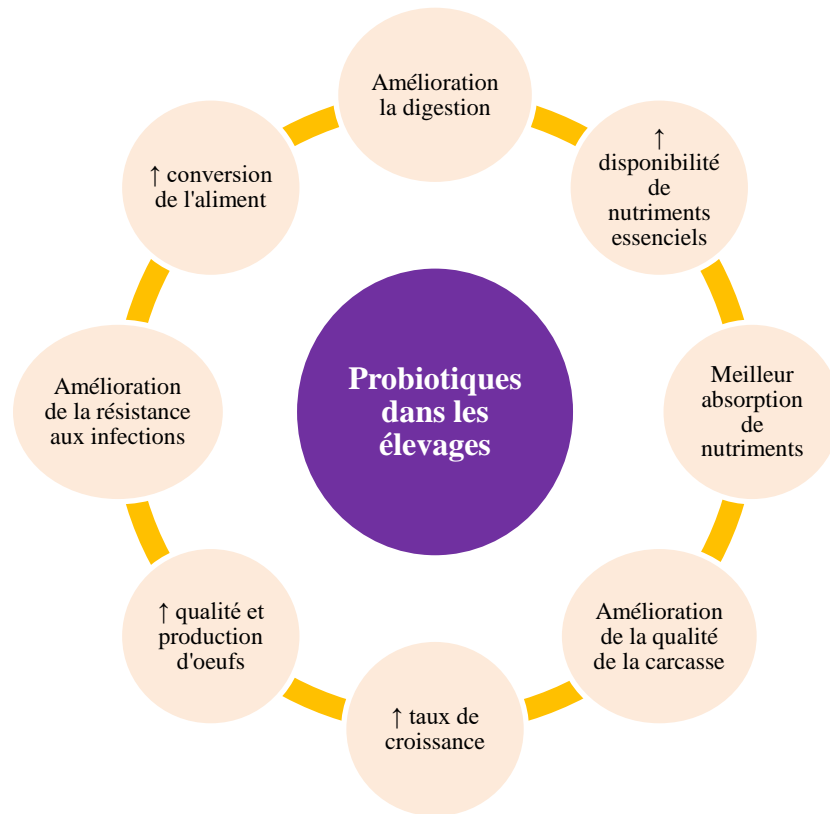


Figure 17. Effets et apports des probiotiques sur la santé et la production des animaux.

Les probiotiques peuvent avoir des effets bénéfiques multiples sur les organismes hôtes selon différents mécanismes qu'ils peuvent mettre en œuvre. Ils jouent un rôle clé dans (i) le système immunitaire en déclenchant des cascades de signalisation activant le système immunitaire (Corthésy et al., 2007; Hardy et al., 2013; Perdigon et al., 1995), (ii) l'absorption de nutriments par ses capacités métaboliques en donnant chez l'Homme des améliorations dans la diabète de type 2 ou les maladies cardiovasculaires (Yoo et Kim, 2016), (iii) l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale (Ohland et Macnaughton, 2010), (iv) le contrôle de la pathogénèse (Collado et al., 2007a), ainsi que dans (v) la santé et les fonctions physiologiques de l'hôte (Wang et al., 2014b).

IV.4. Sureté et innocuité

Selon un rapport de 2002, publié conjointement par l'OMS et FAO (2002), «Les probiotiques peuvent théoriquement être responsables de quatre types d'effets secondaires :

1. Infections systémiques.

2. Activités métaboliques délétères.
3. Une stimulation immunitaire excessive chez les individus sensibles.
4. Transfert de gènes »

Il est donc recommandé de s'assurer de l'innocuité des nouvelles souches probiotiques en déterminant leur profil de résistance aux antibiotiques ; en évaluant leurs activités métaboliques comme la production de D-lactate ou la dé-conjugaison des sels biliaires ; en évaluant leurs effets secondaires en effectuant des études *in vivo* sur animaux, en surveillant les effets indésirables pour les produits déjà commercialisés, et en recherchant la production de toxines et la présence d'activités hémolytiques potentielles (FAO/OMS, 2002).

IV.5. La genèse des probiotiques

La plupart des probiotiques bactériens appartiennent aux bactéries lactiques et à *Bifidobacterium* sp. Au sein des bactéries lactiques, le genre le plus représenté est celui de *Lactobacillus* (Martínez Cruz et al., 2012 ; FAO, 2016). D'autres genres et espèces bactériens, tels que *Bacillus* sp. et *C. butyricum* ont également été utilisés pour leurs propriétés probiotiques (Ljungh et Wadström, 2006). Les levures ont été également testées lors de la recherche de nouveaux probiotiques. De bons candidats ont été retrouvés parmi les genres *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* ou *Pichia* notamment. Le **Tableau 8** montre la liste exhaustive des micro-organismes à potentiel probiotique utilisés dans les élevages industriels.

La dose, le moment et la durée de l'administration des probiotiques peuvent être des facteurs affectant leur efficacité (Gaggia et al., 2010). D'autres facteurs concernant l'hôte, comme l'état de santé de l'animal ou son âge ont également leur importance.

Tableau 8. Probiotiques utilisés en productions animales

Animal	Levure	TYPES DE PROBIOTIQUES (Genre)		Fungi	Microalgue
		Bactérie			
		BL	Non-BL		
Volaille	<i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>Kluyveromyces</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Clostridium</i> <i>Butyricicoccus</i>	<i>Aspergillus</i>	-
Porc	<i>Saccharomyces</i> <i>Kluyveromyces</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Weissella</i>	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> <i>Bifidobacterium</i> ,	-	-
Ruminant	<i>Saccharomyces</i> <i>Trichosporon</i> , <i>Kluyveromyces</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i>	<i>Megasphaera</i> , <i>Bacillus</i> <i>Prevotella</i> , <i>Propionibacterium</i> <i>Bifidobacterium</i> ,	<i>Aspergillus</i>	-
Aquaculture	<i>Saccharomyces</i> <i>Debaryomyces</i>	<i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Carnobacterium</i> , <i>Weissella</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Alteromonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Roseobacter</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Psychrobacter</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Tetraselmis</i> , <i>Phaeodactylum</i>

BL : Bactéries lactiques. (Données obtenues de **Banerjee et Ray, 2017a**; **Carnevali et al., 2017**; **FAO, 2016**; **Hai, 2015**; **Kabir, 2009**; **Liao et Nyachoti, 2017**; **Seo et al., 2010**)

V. Les bactéries lactiques et le potentiel probiotique

V.1. Définition, systématique, taxonomie

Le taxon appelé bactéries lactiques regroupe des coques des bacilles ou coccobacilles à Gram-positif, non sporulées, tolérants à l'acide, anaérobies ou aérobies facultatifs ayant un pourcentage de G+C inférieur à 53%. Ces bactéries sont acidophiles avec un pH optimal de croissance compris

entre 3,5 et 6,5 (Pessione, 2012). La plupart des souches présentent des exigences nutritionnelles et nécessitent des milieux riches pour se développer. Ce groupe inclus 10 genres dont les plus connus sont *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* et *Carnobacterium*. Les bactéries lactiques font partie du phylum des *Firmicutes*, de la classe des *Bacilli* et de l'ordre des *Lactobacillales* (Figure 18).

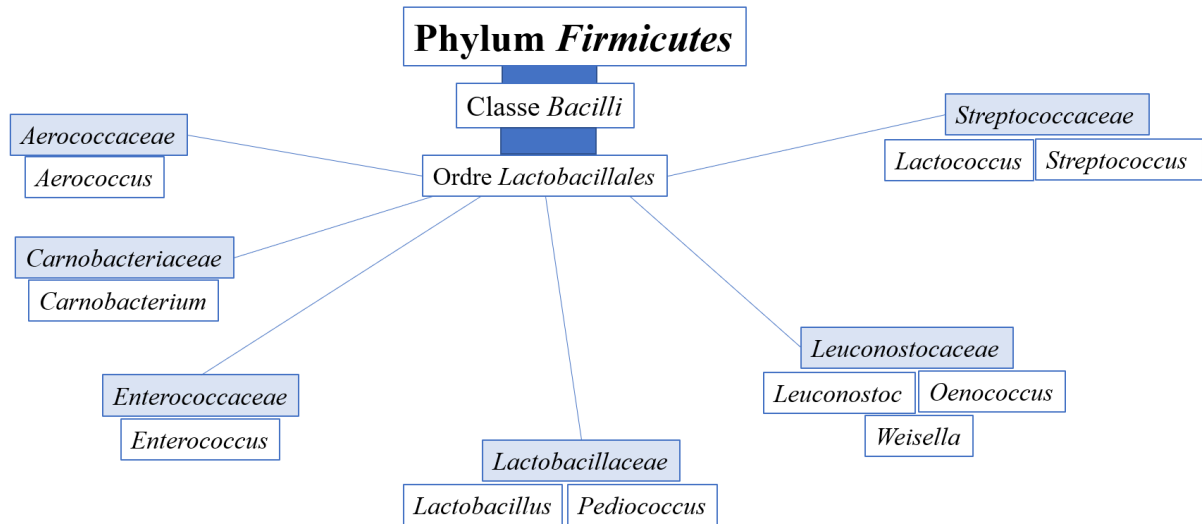


Figure 18. Taxonomie des bactéries lactiques.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=91061&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>).

Les bactéries lactiques occupent une variété d'habitats naturels, comme dans l'environnement. Elles sont importantes dans le processus d'ensilage, à l'obtention d'aliments fermentés et aux systèmes gastro-intestinaux des vertébrés. Certaines bactéries lactiques font aussi partie de la flore buccale et vaginale des animaux (Holzapfel et Wood, 1995; Werner et al., 2008).

V.2. Physiologie

Une des caractéristiques principales de ce groupe de bactéries est la production d'acide lactique par fermentation homo ou hétéro-fermentaire du glucose (Quinto et al., 2014) (Figure 19). Les voies métaboliques par lesquelles les sucres sont convertis en acide lactique ont été bien établies et comprennent la fermentation homolactique par voie classique d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

pour la glycolyse. Les bactéries lactiques produisent soit exclusivement de l'acide lactique sous forme D (+) ou L (+) , soit un mélange racémique des deux isomères (Holzapfel et Wood, 1995). La voie homo-fermentaire est caractérisée par le rôle prépondérant de l'aldolase. Par cette voie anaérobie, deux moles d'ATP sont formées par mole d'hexose. *Lb. acidophilus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gallinarum*, *Lb. salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *E. faecium* ou *Pediococcus* spp. sont caractérisés par ce métabolisme.

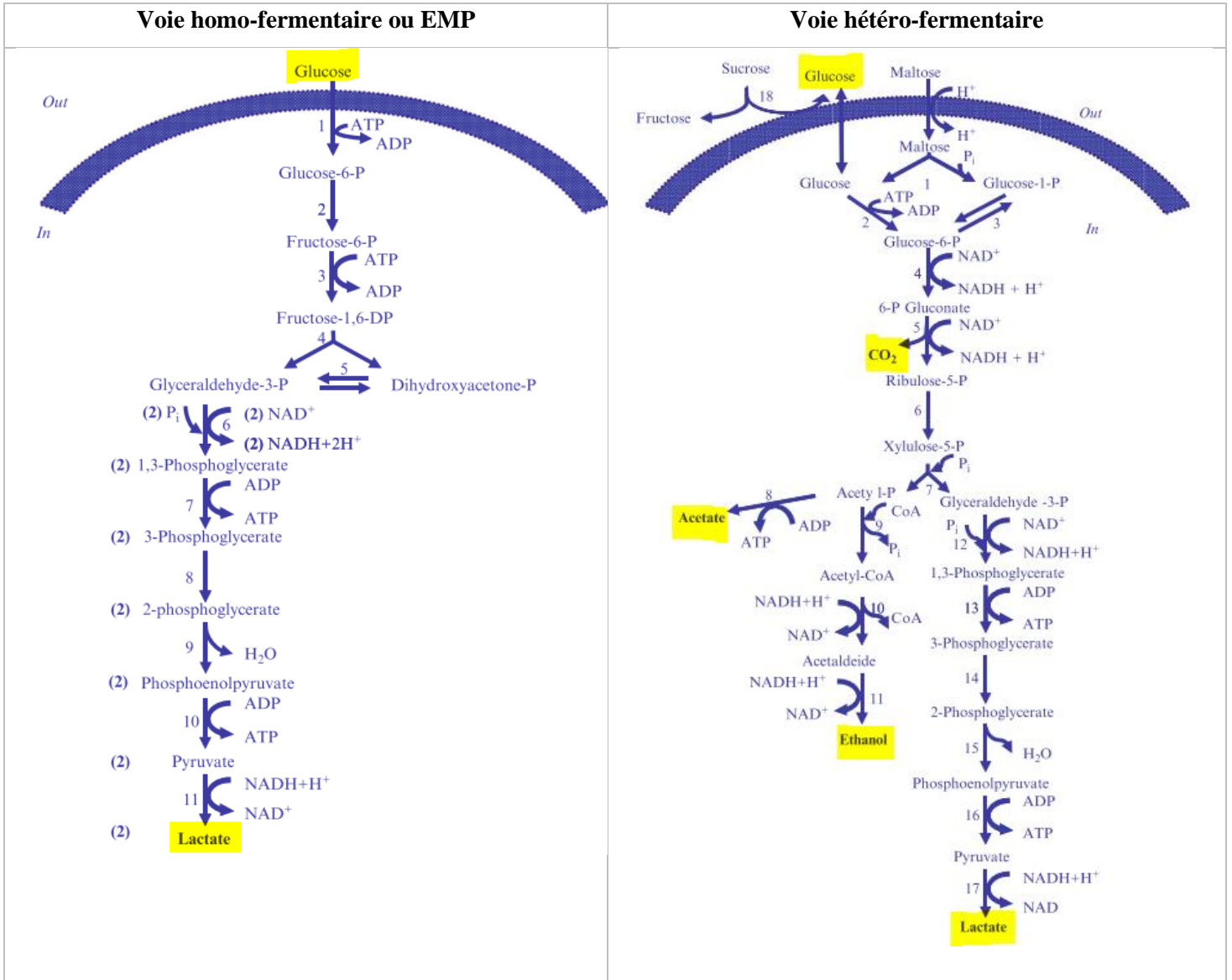


Figure 19. Voies d'utilisation du glucose chez les bactéries lactiques. Le glucose est indiqué comme point de départ, bien que tout hexose métabolisable puisse alimenter ces voies avec les modifications appropriées. (Source : Gänzle et Gobbetti, 2013)

Les organismes hétéro-fermentaires obligatoires fermentent les hexoses et les pentoses par la voie de la 6-phosphogluconate/phosphokétolase (6-PG/PK). Ils synthétisent des quantités équimoléculaires de lactate et d'éthanol ou d'acétate. Le CO₂ étant également produit à partir des hexoses (**Gänzle et Gobbetti, 2013**). La production d'ATP par voie hétéro-fermentaire des hexoses est seulement d'une mole ATP par mole d'hexose. *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *Lb. reuteri* et *Leuconostoc* spp. utilisent cette voie.

Le troisième groupe est constitué d'organismes hétéro-fermentaires facultatifs qui fermentent les hexoses par la voie EMP et les pentoses et le gluconate par la voie 6-PG/PK. Par exemple *Lb. casei*, *Lb. pentosus* sont des organismes hétéro-fermentaires facultatifs (**Holzappel et Wood, 1995**).

Le genre *Lactobacillus* comprend plus de 106 espèces décrites (**Felis et Dellaglio, 2007**). Les bactéries de ce genre sont des bacilles ou des coccobacilles. Elles sont catalase négative et ont un pourcentage de G+C < 54%. Selon Salvetti et al. (**2012**), le genre *Lactobacillus*, comprend 15 groupes phylogénétiques: *Lb. delbrueckii*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. buchneri*, *Lb. alimentarius*, *Lb. brevis*, *Lb. collinoides*, *Lb. fructivorans*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. casei*, *Lb. coryniformis*, *Lb. manihotivorans*, *Lb. perolens* et le groupe *Lb. vaccinostercus*.

V.3. Intérêts industriels des bactéries lactiques

L'utilisation de bactéries lactiques pour la production d'acide lactique au niveau industriel est préférée à la production chimique en raison de la pureté de l'acide lactique obtenu par cette voie. Cet acide lactique est utilisé pour produire un nouveau type d'emballage biodégradable constitué d'acide poly-lactique ou PLA (en l'anglais) qui remplace les produits à base de pétrole (**Ghaffar et al., 2014**). Les bactéries lactiques sont utilisées dans la fermentation de diverses matières premières alimentaires telles que les fruits, les légumes, les céréales, la viande et le lait. Elles contribuent ainsi à la saveur, à la texture et à la durée de conservation des produits fermentés à destination de la consommation humaine et animale (**Bron et Kleerebezem, 2011**). Les bactéries lactiques sont notamment impliquées dans la production de produits fermentés tels les produits laitiers (yaourt, de fromage ou de laits fermentés). Ces bactéries apparaissent aussi sur le marché des aliments fonctionnels, et sont commercialisées sous formes de probiotiques. Elles sont alors utilisées pour exercer des effets bénéfiques sur la santé des consommateurs (**Linares et al., 2017**).

V.4. Résistance aux conditions gastro-intestinales

Une des caractéristiques requises chez les probiotiques est leur capacité à survivre aux conditions extrêmes retrouvées dans le tractus gastro-intestinal. Ceci afin de pouvoir assurer un apport suffisant de probiotiques viables et métaboliquement actives dans le compartiment intestinal. Plusieurs paramètres comme l'action des enzymes digestives, le pH acide, les défensines et les fortes concentrations en sels biliaires dans le tractus gastro-intestinal, affectent la viabilité et le métabolisme des souches bactériennes à visées probiotiques lors de leur transit dans le tractus digestif (**Gonzalez-Rodriguez et al., 2013**). Pour survivre dans les conditions hostiles, les bactéries utilisent plusieurs mécanismes. Pour survivre aux pH acides extrêmes, l'efflux actif de protons vers l'extérieur de la cellule par l'augmentation du nombre de F₀F₁-ATPase est observée; cette pompe est induite à faible pH et la régulation semble se produire au niveau transcriptionnel (**Corcoran et al., 2005**). Les cellules peuvent également séquestrer les protons intracellulaires par des réactions biochimiques qui consomment ces ions par décarboxylation d'acides aminés ou par génération d'ammoniac. Les bactéries peuvent aussi réparer ou prévenir les dommages dans les macromolécules ou modifier la perméabilité de la membrane cellulaire aux protons (**Lund et al., 2014**). Pour lutter contre l'acidité il a été montré que *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus* ou *Lb. plantarum* augmentent la production d'ATPases (**Lebeer et al., 2008**).

En présence de bile, les acides biliaires s'accumulent dans le cytoplasme affectant l'homéostasie de la cellule, entraînant une fuite d'ions. Pour résister à la bile, certaines bactéries changent la composition lipidique et protéinique de leurs membranes par modification de la concentration des enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras (**Gonzalez-Rodriguez et al., 2013**) ou la surexpression de protéines chaperones et de protéases pour contrer le repliement et l'agrégation des protéines. Les bactéries peuvent également mettre en œuvre la synthèse de composés protecteurs tels que des exopolysaccharides (**Ventura et al., 2007**) Le transport par pompes à efflux de la bile pour désintoxiquer ou effectuer la déconjugaison des sels biliaires par l'hydrolase des sels biliaires est également un mécanisme pouvant intervenir dans ce cas de figure (**Gonzalez-Rodriguez et al., 2013**). Enfin, on observe la mise en place de systèmes efficaces de réparation de l'ADN et des protéines (**Lebeer et al., 2008; Lund et al., 2014**). Parmi les bactéries lactiques, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* et *Lb. reuteri* peuvent évacuer la bile vers le milieu extracellulaire par l'entremise de systèmes intervenant également dans la résistance à des molécules thérapeutiques (comme les

systèmes d'efflux multi-médicaments AcrAB et EmrAB)(**Begley et al., 2005; Lebeer et al., 2008**). D'autres espèces comme *Lb. acidophilus*, *Lb. gasseri* ou *Lb. johnsonii* produisent de la BSH.

V.5. Adhésion aux cellules intestinales

Une bonne aptitude d'adhésion aux cellules intestinales est généralement considérée comme une caractéristique souhaitable pour les probiotiques. Ainsi le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin est accru, augmentant les chances d'exercer leurs actions bénéfiques comme l'exclusion compétitive des agents pathogène ou l'interaction avec les cellules hôtes, la protection des cellules épithéliales ou la modulation de la réponse immunitaire (**Collado et al., 2008; Lebeer et al., 2008**). Certains des facteurs agissant sur l'adhésion sont souche dépendants, comme par exemple la composition en protéines, en polysaccharides, les charges ioniques, les acides lipotéichoïques ou les interactions électrostatiques (**Servin et Coconnier, 2003 ; Larsen et al., 2007, Granato et al., 1999**). L'hydrophobicité joue un rôle clé dans le premier contact entre une cellule bactérienne et les cellules muqueuses ou épithéliales (**Polak-Berecka et al., 2014**). La présence de l'adhésine spécifique du mannose est requise pour l'adhésion chez *Lb. plantarum* WCFS1. Certaines souches de lactobacilles synthétisent des pili liant le mucus, ce qui augmenterait leur capacité de colonisation comme pour *Lb. reuteri* (**Lebeer et al., 2008; Madsen, 2012**). Dans le cas de *Lb. acidophilus* la capacité d'adhésion est multifactorielle, elle dépend de la présence de gènes codants la protéine liant la fibronectine (FbpA), la mucine (Mug) et une protéine de couche de surface (SlpA) (**Lebeer et al., 2008**).

V.6. Mécanisme d'action contre les bactéries pathogènes

Certaines bactéries probiotiques vont interférer, voire annihiler la pathogénicité des agents microbiens causant des pathologies. Ceci par différents mécanismes, directs ou indirects, notamment en éliminant ou en inhibant la croissance des bactéries pathogènes dans la lumière intestinale. Les bactéries probiotiques sont parfois capables de produire des substances antibactériennes, d'entrer en compétition avec les pathogènes pour les nutriments, les facteurs de croissance et les sites de fixation à l'épithélium intestinal. Elles peuvent également exercer des fonctions immunobiotiques en modulant la réponse immunitaire de l'hôte lui permettant ainsi de mieux faire face aux infections.

a) Mécanisme direct par production de substances antibactériennes

Les bactéries lactiques probiotiques peuvent produire une large gamme de molécules capables de réduire le nombre de pathogènes en modifiant leurs capacités métaboliques ou leur aptitude à produire des toxines (Liao et Nyachoti, 2017) (Figure 20).

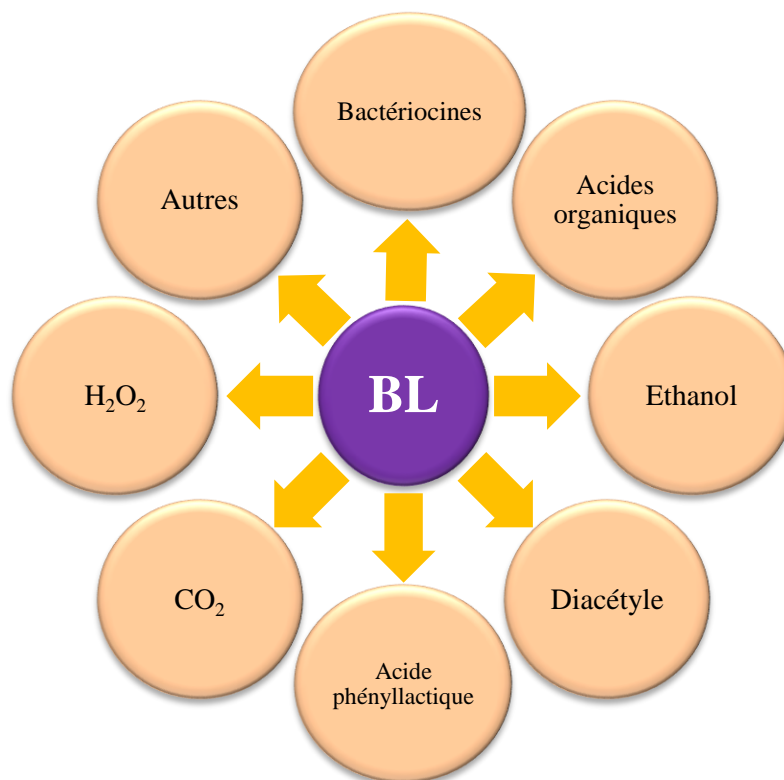


Figure 20. Substances antibactériennes produites par les bactéries lactiques

Comme indiqué, les bactériocines sont des peptides antimicrobiens, produits à la fois par les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif, synthétisés par voie ribosomique (Dridier et Rebuffat, 2011). Elles sont le plus souvent dépourvues de caractéristiques cytotoxiques (Belguesmia et al., 2010). Elles ont généralement un spectre d'activité étroit agissant ainsi sur la souche cible sans affecter le microbiote, contrairement aux antibiotiques. Différentes études ont mis en évidence le pouvoir inhibiteur *in vitro* des bactériocines produites par les bactéries lactiques contre divers agents zoonotiques. Ces molécules sont non toxiques et non immunogènes (Cotter et al., 2012). Nous pouvons citer par exemple, les plantaricines produites par *Lb. plantarum* actives contre *Clostridium*, *Salmonella*, *Staphylococcus* ou *Pseudomona* (Seddik et al., 2017) ; La pédiocine PA-1 produite par *Ped. acidilactici* est active contre un grand nombre de bactéries à Gram-positif ; les

entérocoques agissent contre *Staphylococcus aureus*, *C. perfringens*, *E. coli* et *Salmonella* (Al Atya et al., 2016; Caly et al., 2017; Grande Burgos et al., 2014). Les salivaricines comme celle produite par *Lb. salivarius* B-30514 qui inhibe *Campylobacter jejuni* chez les volailles (Stern et al., 2008).

Parmi les acides organiques produites par les bactéries lactiques, le plus connu est l'acide lactique, mais certains BL hétéro-fermentaires peuvent produire de l'acide acétique dans des conditions anoxiques (Elferink et al., 2001; Schnürer et Magnusson, 2005). Ces acides ont un spectre d'action large (Zhitnitsky et al., 2017) car ils agissent en réduisant le pH intracellulaire et en inhibant le transport actif, ainsi que différentes fonctions métaboliques. Prises dans leur ensemble, ces perturbations affectent la croissance des agents pathogènes (Surendran Nair et al., 2017).

L'acide phenyllactique et son dérivé l'acide 4-hydroxy phenyllactique sont produits par des bactéries lactiques comme *Lb. plantarum*, *Lb. alimentarius*, *Lb. brevis*, *Leu. mesenteroides*, etc. (Valerio et al., 2004). Ils présentent activité contre les champignons tels que affectant à la différenciation hyphal d'*Aspergillus*, *Penicillium* entre autres (Svanström et al., 2013). L'acide phenyllactique est également active contre bactéries comme *Listeria*, *Staphylococcus* ou *Enterococcus* (Valerio et al., 2004).

L'éthanol, produit par les bactéries lactiques hétéro-fermentaires en tant que produit de la voie de la glycolyse, affecte la fluidité de la membrane (Elshaghabee et al., 2016). Le diacétyl généré par l'excès de pyruvate lors du métabolisme du citrate interfère avec l'utilisation de l'arginine en réagissant avec la protéine de liaison à l'arginine des bactéries à Gram négatif (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

Le dioxyde de carbone, crée un environnement anaérobie où les bactéries aérobies ne peuvent pas se développer (Singh, 2018).

Le peroxyde d'hydrogène agit via la réaction en chaîne anionique superoxyde qui augmente l'oxydation toxique (Surendran Nair et al., 2017).

D'autres types de métabolites peuvent avoir des actions antimicrobiennes. La reuterine produite par *Lb. reuteri* est un métabolite secondaire dérivé de la fermentation du glycérol. Elle possède un large spectre d'activité, résiste aux enzymes protéolytiques et lipolytiques et agit en inhibant la synthèse de l'ADN (Singh, 2018). La reutericycline, premier antibiotique de faible poids

moléculaire produit par les bactéries lactiques, quant à elle est active contre bactéries à Gram-positif et Gram-négatif ainsi que plusieurs champignons et levures (**Reis et al., 2012**).

b) Mécanisme indirect par exclusion compétitive

Les bactéries lactiques probiotiques peuvent exclure ou réduire la croissance d'autres micro-organismes dans le tractus gastro-intestinal, par compétition directe ou indirecte pour les nutriments ou la surface d'adhésion (**Oelschlaeger, 2010**). Le tractus gastro-intestinal est réputé pour son abondance en nutriments, ce qui en fait un environnement propice à la colonisation microbienne. Le fait que les agents pathogènes ne puissent pas adhérer à la muqueuse intestinale entrave le développement de l'infection et affecte la population des agents pathogènes par le flux constant de digesta (**Callaway et al., 2008; Liao and Nyachoti, 2017; Yirga, 2015**). Chez les bactéries lactiques, les probiotiques comme *Lb. plantarum* ou *Lb. rhamnosus* GG stimulent la production de mucine dans les cellules intestinales ce qui empêche l'adhésion des souches pathogènes de *Salmonella*, *Clostridium* et *E. coli* (**Oelschlaeger, 2010**). *Lactobacillus spp.* et *Lb. pentosus* HC-2 peuvent par exclusion compétitive empêcher le développement respectivement de *C. difficile* ou *Vibrio parahemolyticus* (**Arruda et al., 2016; Sha et al., 2016a**). Des souches de *Lb. salivarius*, seules ou en combinaison avec *Ent. faecium* PXN-33, ont également été capables de réduire la colonisation de *Salmonella* Enteritidis (**Carter et al., 2017; Casarin Penha Filho et al., 2015**).

V.7. Effets bénéfiques associés aux probiotiques

Il a été établi que les bactéries lactiques étaient capables d'agir positivement sur le système immunitaire, affectant à la fois la réponse immunitaire innée et la réponse adaptative, réduisant ainsi la colonisation par des agents pathogènes (**Ashraf et Shah, 2014; Tellez et al., 2012; Tsai et al., 2012**). Les bactéries lactiques possèdent différentes propriétés immunomodulatrices en raison de leur capacité à induire la production de cytokines intervenant dans les mécanismes de réponses immunitaires innées ou adaptatives (**Kiczorowska et al., 2017**). Les effets immunorégulateurs des probiotiques ont été suggérés comme étant souche, et probablement aussi espèce et hôte, spécifique (**Vlasova et al., 2016**). Les probiotiques peuvent moduler l'activité du système immunitaire par différentes voies comme la stimulation des macrophages, augmentant ainsi la phagocytose (**Brisbin et al., 2015**), et l'expression d' IFN- γ et l'IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-12 (**Quinteiro-Filho et**

al., 2015). Les probiotiques peuvent générer un effet anti-inflammatoire quand ils inhibent la sécrétion de l'IL-6 et de l'IL-8 ou quand ils induisent les cellules T et les cellules dendritiques. Ils peuvent également activer l'immunité cellulaire en stimulant la production d'IL-12 par ces dernières (**Shida et Nanno, 2008**).

V.8. Innocuité des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont reconnues comme GRAS (Etats-Unis), ou QPS (Europe), car elles colonisent de manière naturelle le tractus intestinal animal et humain et qu'elles sont également utilisées en industrie agro-alimentaire. Par ailleurs, les hommes ont été de longue date exposés à ces bactéries sans manifestations d'effets secondaires sauf chez personnes immunodéprimées ou souffrant d'autres maladies graves sous-jacentes (**EFSA, 2007**). Toutefois certaines souches de *Lactobacillus* ont été isolées d'échantillons cliniques d'endocardites et bactériémie. Ces souches cliniques présentent de phénotypes différents de celles qui ont le statut de probiotique (**Gouriet et al., 2012; Salminen et al., 2004**).

V.9. Culture de barrière

La capacité de l'épithélium intestinal à agir comme une barrière entre l'environnement externe et le milieu interne est absolument essentielle pour la santé humaine et animal (**Arrieta et al., 2006**). Les cellules épithéliales intestinales sont supposées être les premières et les plus importantes cellules cibles de l'action des probiotiques (**Lebeer et al., 2008**). Il a été démontré que les souches probiotiques ont des effets bénéfiques liés à la fonction nutritive de l'épithélium intestinale (**Lebeer et al., 2008**). Elles améliorent également la fonction de barrière intestinale en stimulant : la production de mucus et de peptides antimicrobiens, l'augmentation des réponses immunitaires, l'amélioration de l'expression et / ou de la localisation des protéines de jonction serrée, empêchant l'apoptose des cellules épithéliales dû à des facteurs externes et l'induction de molécules cytoprotectrices (**Madsen, 2012**) (**Figure 21**).

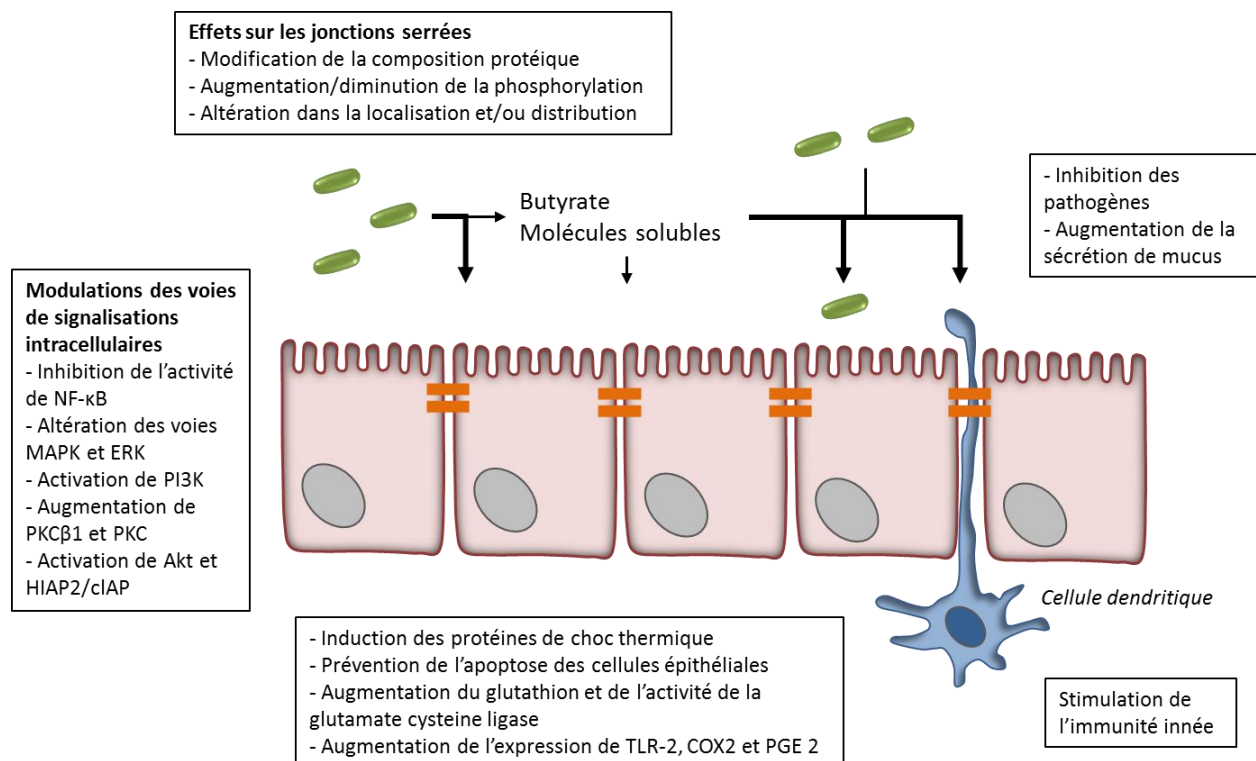


Figure 21. Mécanismes d'action des probiotiques dans le renforcement de la barrière épithéliale (Source: **Madsen, 2012**).

V.9.1. Interactions métaboliques entre les probiotiques et l'hôte

L'exposition à un probiotique peut modifier le microbiote intestinal et altérer le métabolisme lipidique hépatique, associé à une diminution des lipoprotéines plasmatiques, à une augmentation des taux de triglycérides et à une glycolyse stimulée apparente (**Lebeer et al., 2008**). Certains auteurs ont observé des changements dans d'autres voies, notamment le métabolisme des acides aminés, des méthylamines et des acides gras à chaîne courte tels que le butyrate (**Martin et al., 2008**). Le butyrate est une source d'énergie particulièrement importante pour les cellules muqueuses du côlon, et il a été suggéré qu'il est nécessaire pour le maintien de l'épithélium intestinal (**Donohoe et al., 2012**).

V.9.2. Préservation de la barrière épithéliale.

a) Effets sur les jonctions épithéliales serrées

Les jonctions épithéliales serrées se trouvent entre les cellules épithéliales et sont une série de jonctions intercellulaires le long des marges latérales. Ces structures sont complexes, constituées de composants lipidiques et protéiques. Les interactions spécifiques entre les protéines transmembranaires, les protéines adaptatrices intracellulaires et le cytosquelette d'actine sont impliquées dans l'assemblage des jonctions serrées. L'occludine, les claudines, la molécule d'adhésion jonctionnelle et la tricelluline sont les principales protéines transmembranaires impliquées (**Rao et Samak, 2013**). Du côté intracellulaire de la membrane, une des extrémités de ces protéines interagit avec les protéines de jonction serrée *zonula occludens* (ZO) : ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (**Figure 22**) (**Arrieta et al., 2006**).

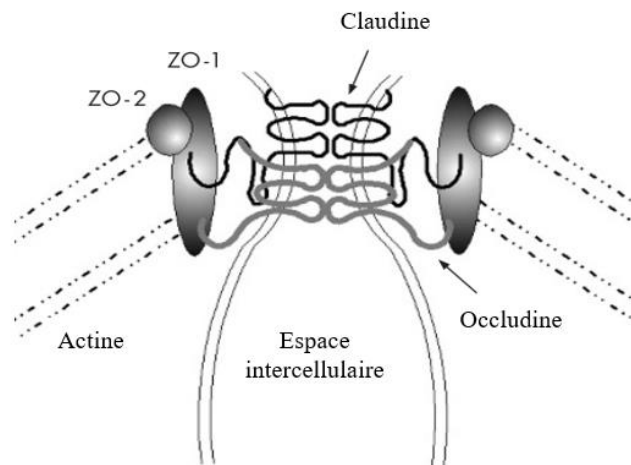


Figure 22. Structure de jonctions serrées des cellules épithéliales. (Source : Arrieta et al. (2006)).

Plusieurs études montrent que les probiotiques augmentent la résistance épithéliale par différentes voies :

1. Phosphorylation accrue de ZO-1 et d'occludine comme pour *Lb. rhamnosus* et *Bifido. lactis* (**Mathias et al., 2010**).
2. L'augmentation de l'expression protéique de ZO-1 et d'occludine, mécanisme décrit lors de l'utilisation du mélange probiotique VSL#3 (*Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Bifidobacterium*) (**Ewaschuk et al., 2008**).
3. L'augmentation des niveaux d'expression de nombreux gènes liés aux jonctions serrées, y compris ceux codant pour les protéines d'ancrage de l'occludine et du cytosquelette par *Lb. plantarum* (**Anderson et al., 2010**).

Les probiotiques sont aussi capables de préserver les jonctions serrées des perturbations induites par les facteurs IFN γ and et TNF α comme par exemple *Lb. rhamnosus* GG ou le mélange VSL #3 (Madsen, 2006).

b) Molécules cytoprotectrices

Les probiotiques peuvent également améliorer la fonction de la barrière épithéliale de l'intestin en augmentant la production de molécules cyto-protectrices telles que les protéines de choc thermique (HSP). Les protéines de choc thermique sont omniprésentes dans tous les organismes où elles jouent un rôle physiologique important dans des conditions normales et des situations impliquant à la fois un stress systémique et cellulaire (Hao et al., 2012; Park et Seo, 2015). Dans les cellules stressées, ces protéines sont produites afin de maintenir l'homéostasie. La plupart des HSP ont des effets cytoprotecteurs importants, elles sont impliquées dans de nombreuses voies de régulation et se comportent comme des chaperonnes moléculaires pour d'autres protéines cellulaires (Kregel, 2002). *Lb. rhamnosus* GG, ou *B. subtilis* induisent également l'expression épithéliale de ces protéines de choc thermique cytoprotectrices (Madsen, 2012).

c) Effets sur l'apoptose

Les probiotiques sont également capables de prévenir les lésions épithéliales induites par les cytokines et les molécules oxydantes en favorisant la survie des cellules (Madsen, 2012). Cette réduction de l'apoptose permettrait de maintenir l'intégrité de la barrière épithéliale et d'accroître la résistance aux agents pathogènes en réduisant les ruptures de la barrière muqueuse. Les protéines solubles dérivées de *Lb. rhamnosus* GG, p40 et p75, empêchent ainsi les lésions épithéliales induites par les cytokines et l'apoptose (Yan et Polk, 2012).

VI. Autres probiotiques

VI.1. Les bactéries probiotiques autres que les bactéries lactiques

Différents genres présentent des propriétés probiotiques et sont commercialisés pour une utilisation à destination des élevages, parmi ceux-ci on retrouve *Bifidobacterium*, *Bacillus* ou *C.*

butyricum (FAO, 2016a). Les bifidobactéries sont des bactéries productrices d'acide lactique, non sporulées, à Gram-positif. Elles se différencient des bactéries lactiques notamment par un pourcentage de G+C de 55–67 % et une synthèse importante d'acides gras à chaîne courte. Ces bactéries ont été amplement étudiées comme probiotiques pour les Humains (Vlasova et al., 2016). Des études ont été faites sur différentes espèces comme *Bifido. animalis*, *Bifido. bifidium*, *Bifido. bifidus*, *Bifido. thermophilus*, *Bifido. longum*, *Bifido. pseudolongum* et *Bifido. lactis* notamment pour leurs applications chez les animaux (FAO, 2016a). Certaines souches sont capables d'induire une augmentation du poids chez les porcelets (Ezema, 2013). *Bifido. lactis* BB-12 est la souche type utilisée pour la prévention de l'entérocologie nécrosante (Quinto et al., 2014). Par ailleurs *Bifido. breve* et *Bifido. pseudocatenulatum* peuvent inhiber l'expression de la shiga-toxine chez *E. coli* (STEC) O157: H7 (Oelschlaeger, 2010). Les bactéries formant des spores, en particulier celles du genre *Bacillus*, sont de plus en plus utilisées comme probiotiques, car elles ont la capacité de résister aux conditions et aux facteurs physiques et environnementaux extrêmes, tels la chaleur, la dessiccation et les rayonnements UV. Les spores de *Bacillus* peuvent survivre aux pHs extrêmes de l'estomac, tolérer les sels biliaires et les autres conditions hostiles du tractus gastro-intestinal (Elshaghabe et al., 2017). Ces propriétés de résistance permettent aux souches de conserver leur viabilité dans les conditions de fabrication des pellets, de manipulation et de stockage (FAO, 2016a). Les espèces les plus exploitées sont *B. coagulans*, *B. subtilis* et *B. licheniformis* (FAO, 2016a). Certaines souches de *Bacillus* présentent des activités anti-oxydantes, immunomodulatrices ou antimicrobiennes chez l'hôte. Plusieurs substances antimicrobiennes sont actives contre les bactéries et les champignons (Baruzzi et al., 2011). Par exemple, des bactériocines de la famille des lantibiotiques (la subtiline, la subtilosin ou la mersacidine) sont produites par *B. subtilis* (Stein, 2005). La coaguline de la famille des « *pediocin-like* » est produites par *B. coagulans* (Marrec et al., 2000). Enfin, des lipopeptides de la famille des surfactines (surfactine, lichenysines et pumilacidines), sont produits par plusieurs souches de *B. subtilis*, *B. licheniformis*, ou *B. pumilus* (Baruzzi et al., 2011). L'influence positive des souches probiotiques de *Bacillus* sur la croissance et la composition d'espèces communes et bénéfiques sur l'intestin pourrait être médiée par la production d'enzymes, de vitamines et de peptides extracellulaires (Elshaghabe et al., 2017).

Une autre bactérie probiotique, en dehors du groupe des bactéries lactiques est *C. butyricum*. Même si elle appartient au groupe de clostridies connues généralement pour leur pathogénicité ;

c'est une bactérie favorise la croissance des lactobacilles et des bifidobactéries et inhibe la diarrhée associé aux antibiotiques, notamment sous l'effet du butyrate sur la prolifération des cellules muqueuses de l'intestin (Yang et al., 2012). Qui plus est *C. butyricum* peut produire des endospores, ce qui lui confère un avantage pour être utilisé comme probiotique. Cette bactérie produit de grandes quantités d'acides gras à chaînes courtes, tels que le butyrate et l'acétate. Les AGC constituent une source d'énergie importante pour les cellules intestinales, permettant la prolifération des entérocytes. Elles ont également des effets immunomodulateurs sur l'inflammation du côlon. Ils constituent dès lors une option thérapeutique pour les maladies inflammatoires de l'intestin en agissant sur la sécrétion de cytokines inflammatoires (Cassir et al., 2016; Kanai et al., 2015). Elles présentent également des effets préventifs et thérapeutiques sur les infections à *E. coli* entérohémorragique O157: H7 et contre certains *Clostridium* par production de butyricine, une bactériocine à spectre d'activité étroit (Takahashi et al., 2004; Kanai et al., 2015). Yang et al. (2012) montrent également que certaines souches peuvent être utilisées comme « facteurs » de croissance chez les poulets.

VI.2. Les levures probiotiques

Parmi les microorganismes eucaryotes utilisés comme probiotiques chez l'homme ou l'animal, les levures constituent le groupe le plus représentatif. Elles agissent sur les réponses immunitaire, anti-inflammatoire, ont des effets cliniques contre les symptômes diarrhéiques ou les agents pathogènes entériques et maintiennent l'intégrité de la barrière épithéliale entre autres (Moslehi-jenabian et al., 2010). *Sch. cerevisiae* et *Sch. cerevisiae var boulardii* sont les seules souches de levures commercialisées pour leurs vertus probiotiques (Nayak, 2011). Les levures autres que *Sch. cerevisiae* ayant des propriétés probiotiques appartiennent aux genres *Pichia*, *Metschnikowia*, *Yarrowia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Isaatchenkia*, *Kluyveromyces* (Vohra et al., 2016). Ces microorganismes présentent un intérêt au niveau probiotique pour leurs activités antibactérienne et antifongique contre des pathogènes comme *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* et *P. aeruginosa*, et pour leurs effets anti-inflammatoires sur les mécanismes immunitaires de l'hôte (Ait Seddik et al., 2016; Ceugniet et al., 2017; Nayak, 2011).

La supplémentation des aliments avec des levures probiotiques améliore non seulement la qualité nutritive des aliments pour animaux mais aussi leur croissance et leurs performances. Ces

levures contiennent des protéines de grande valeur, de la vitamine B et des oligo-éléments. Elles produisent également des enzymes extracellulaires telles que les amylases, la β -galactosidase et les phytases qui augmentent la digestibilité de certains aliments (**Vohra et al., 2016**).

En comparaison avec les probiotiques procaryotes, les levures ne sont pas affectées par les traitements antibiotiques, et il n'y a pas non plus de phénomène de transfert de gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, elles présentent une faible capacité à produire des composés antagonistes et à coloniser l'intestin (**Nayak, 2011**).

Dans cette synthèse bibliographique, nous montrons que suite aux longues années d'utilisation sans discernement des antibiotiques chez les animaux d'élevage et plus concrètement chez la volaille, les agents pathogènes ont développé des mécanismes de résistance multiples. Pour lutter contre ces résistances, et spécialement celle que pourrait acquérir l'agent de l'entérite nécrotique (*C. perfringens*), nous proposons l'utilisation de bactéries lactiques en tant que probiotiques comme une des alternatives possibles. Différentes études ont montré que certaines bactéries lactiques ont la capacité de limiter le développement de maladies, d'augmenter les performances de croissance des animaux sains et malades, et d'améliore la qualité des sous-produits de cette industrie.

Stratégie expérimentale et objectifs de la thèse

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de cette thèse CIFRE, en collaboration entre l'Institut Charles Viollette (Université de Lille) et le groupe Lesaffre (par l'intermédiaire de sa filiale Phileo Lesaffre Animal Care) ont pour objectifs de développer des concepts biologiques basés sur l'utilisation des bactéries lactiques en vue de réduire voire de contrôler le développement de *Clostridium perfringens* une bactérie toxigène responsable de l'entérite nécrotique du poulet de chair. En effet, cette infection bactérienne est à l'origine de pertes économiques colossales estimées à plusieurs milliards de dollars (**Wade et Keyburn, 2015**).

La démarche scientifique préconisée dans le cadre de cette thèse repose sur l'isolement de nouvelles souches de bactéries lactiques à activité anti *C. perfringens* à partir de caeca de poulets car cet organe est connu pour contenir un nombre élevé de *Clostridium*, bactérie anaérobie se développant dans cet environnement dépourvu en oxygène, et de bactéries lactiques. Du fait des interactions bactériennes susceptibles de se produire dans cet écosystème microbien, le caecum offre une possibilité d'isoler des bactéries lactiques antagonistes.

Ainsi, trois caeca de poulets sains ont été prélevés après dissection de l'appareil digestif. Chaque caecum a servi à l'isolement de bactéries lactiques par une approche culture-dépendante dite approche culturomique. Cette approche consiste en un broyage des échantillons, de leur dilution en série dans du tampon PBS et de leur étalement sur des milieux spécifiques des bactéries lactiques, à l'instar des milieux MRS, LAMVAB et Elliker. A l'issue d'une période d'incubation de 24h à 37°C en condition anaérobie, le développement de colonies bactériennes a été recherché dans les boîtes de Pétri. Les colonies ont été observées pour déterminer les différences macroscopiques de forme, de taille et de couleur. Un nombre significatif de colonies répondant aux critères des bactéries lactiques a été étudié pour des critères phénotypiques de base tels que la coloration différentielle de Gram et la présence de la catalase. Les bactéries Gram-positif et dépourvues de catalase ont été considérées comme étant potentiellement des bactéries lactiques, permettant ainsi de constituer une collection de 70 souches.

L'identification de ces bactéries a été confirmée par profilage protéique en utilisant la technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF. A la suite de cette identification, des groupes de bactéries lactiques ont été constitués par une approche moléculaire PCR-RAPD pour établir une possible relation phylogénétique entre les bactéries de la même espèce réduisant ainsi les possibilités de doublons.

A partir de chaque groupe phylogénétique ainsi constitué, un nombre significatif de souches a été étudié pour ses capacités antagonistes, à travers la production de substances inhibitrices extracellulaires, ou encore à travers d'autres mécanismes d'inhibition comme les contacts cellulaires entre la bactérie lactique en question et la bactérie cible, à savoir *C. perfringens* DSM 756. Ce criblage a permis d'isoler 50 bactéries lactiques à activité anti-*C. perfringens* par la méthode de contact cellulaire.

Cette collection de bactéries lactiques dotées d'activité anti-*C. perfringens* a fait l'objet de tests visant à établir leurs capacités à former des biofilms, ou encore à produire de l'acide lactique. Ces deux tests ont été conçus pour affiner les capacités antagonistes de ces nouvelles souches de bactéries lactiques isolées de caeca de poulets. La capacité de former un biofilm est un critère technologique important donnant des possibilités de mieux s'opposer à la prolifération des bactéries pathogènes. Concernant la production d'acide lactique, celui-ci est connu pour ses propriétés inhibitrices d'une large gamme de microorganismes. La combinaison de ces deux critères a permis de sélectionner les bactéries lactiques les plus performantes parmi lesquelles *Lb. reuteri* ICVB412, ICVB413, ICVB414, ICVB415, ICVB416, ICVB417, ICVB418, ICVB419, et ICVB493, et *Lb. salivarius*, ICVB421, ICVB423, ICVB429, et ICVB430. La survie de ces 13 bactéries lactiques a été réalisée dans les conditions mimant le système gastro-intestinal du poulet (pH, enzymes, bile). De la même manière, les capacités d'agrégation (autoagrégation et coagrégation) ont été déterminées. A l'issue de cette double analyse, seules les souches *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430 ont été retenues pour la suite du projet, qui consiste en la caractérisation *in vitro* de leurs propriétés probiotiques (cytotoxicité contre la lignée cellulaire humaine HT-29 et leur adhésion sur la lignée cellulaire humaine Caco-2, résistances aux antibiotiques, activité hémolytique). Avant les tests *in vivo* pour valider cette activité anti-*C. perfringens*, des essais de viabilité cellulaire dans l'eau et après lyophilisation ont été réalisés dans le but de déterminer leur mode d'administration.

Après cette description de notre stratégie expérimentale, il convient de revenir sur les objectifs scientifiques, sociétaux et industriels de cette thèse.

1. Objectifs scientifiques

- i. Développer des formulations bactériennes plus particulièrement des bactéries lactiques susceptibles d'être utilisées en prévention de l'entérite nécrotique dans les élevages de poulets.
- ii. Décrypter la diversité en bactéries lactiques du caecum de poulet.
- iii. Mettre en relief les bactéries lactiques antagonistes et leur potentiel probiotique.

2. Objectifs sociétaux

- i. Contribuer à la réduction de l'utilisation des antibiotiques en santé animale.
- ii. Créer un lien « produit-consommateur » basé sur une qualité biologique

3. Objectifs industriels

- i. Développer un produit à base de bactéries lactiques économiquement rentable.
- ii. Elargir la gamme des produits de l'entreprise partenaire du projet CIFRE
- iii. Renforcement de l'activité et du savoir-faire de l'entreprise dans le domaine de la santé animale.

Matériels et Méthodes

1. Isolement de bactéries lactiques

Afin d'isoler des bactéries lactiques du microbiote intestinal du poulet, trois intestins de poulets de chair sains ont été obtenus auprès de la Ferme Dupire située à Wambrechies dans la région des Hauts-de-France. L'isolement a été réalisé à partir du caeca, une paire de saillies qui se projettent du côlon proximal à sa jonction avec l'intestin grêle (**Clench et Mathias, 1995**)

1.1. Préparation du caecum

Les deux caeca de chaque poulet découpés et pesés (environ 20g pour chaque diverticule) (**Figure 23**). Une dilution au 1:5 de ces caeca est réalisée dans du tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline* 1x, pH 7,4). Chaque caecum est ensuite repris dans 100 mL de ce même tampon 1x. Une homogénéisation de l'échantillon est réalisée au « *stomacker* » pendant 3 minutes, à température ambiante. Afin de déterminer les charges bactériennes des différents échantillons, des dilutions en séries sont réalisées dans du PBS. 100 µL des dilutions allant de 10^{-5} à 10^{-7} sontensemencés sur les milieux gélosés LAMVAB, MRS et Elliker. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées pendant 20h à 37°C en anaérobiose, en utilisant une jarre et des sachets d'anaérobiose (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France).

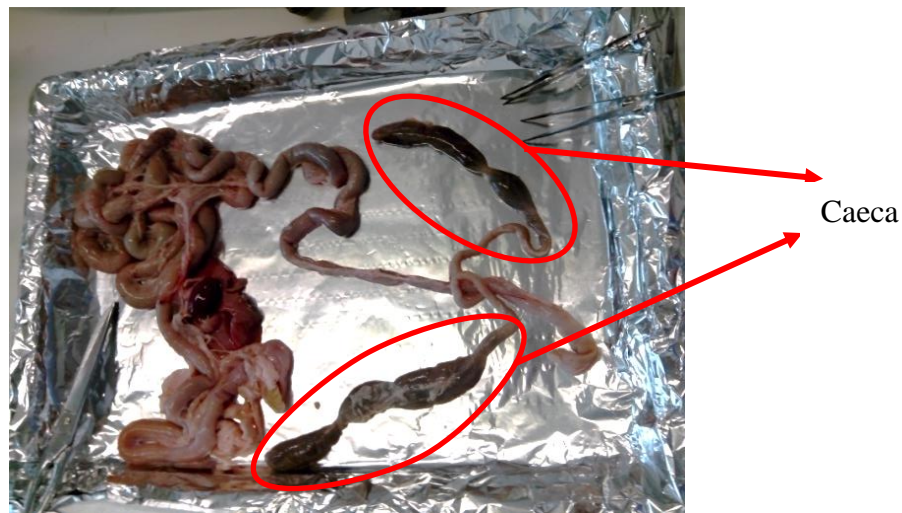


Figure 23. Illustration du tractus gastro-intestinal du poulet. (Photo Institut Charles Viollette)

1.2. Milieux de dénombrement et d'isolement des bactéries lactiques

Plusieurs milieux d'isolement ont été choisis pour isoler les souches de bactéries lactiques.

- Le milieu Elliker (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) pour la culture des streptocoques et des lactobacilles.
- Le milieu MRS (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) c'est un milieu normé pour la culture des bactéries lactiques.
- Le milieu LAMVAB pour la croissance des lactobacilles résistant à la vancomycine. Il s'agit d'un milieu MRS complété avec L-cystéine-HCl (0,25 g/L) (Sigma-Aldrich) et vancomycine (20 mg/L) (Sigma-Aldrich) (**Hartemink et al., 1997**). La vancomycine est un antibiotique inhibant la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif. Cette résistance est intrinsèque chez lactobacilles (**Tynkkynena, et al., 1998**).

1.3. Isolement après enrichissement

Dans ce travail, l'isolement de bactéries lactiques a été également réalisé après enrichissement afin de favoriser leur croissance. Pour cela, 1 g de caecum est mis dans 9 mL de plusieurs bouillons MRS ajustés à différents pHs: MRS pH 6,5 ; MRS pH4 ; MRS additionné de vancomycine (20 mg/L) et MRS pH4 additionné de vancomycine (20 mg/L). Tous les échantillons sont incubés pendant 20h à 37°C. Après cette période d'incubation, les échantillons sont repiqués sur gélose MRS et incubés en anaérobiose, pour obtenir colonies isolées.

2. Identification des souches

2.1. Tests préliminaires d'identification des bactéries lactiques et conservation

Les colonies obtenues sur gélose MRS sont choisies, selon leur morphologie, leur couleur et leur taille. Les colonies circulaires ou crénelées, blanc crème de diamètre 0,5 – 2,5 mm sont ensuite repiquées aléatoirement sur gélose MRS afin de vérifier leur pureté. Des tests de pré-identification, en utilisant la coloration différentielle de Gram et la recherche d'enzymes respiratoires (catalase et oxydase) sont ensuite réalisés. Les souches à Gram-positif, dépourvues de catalase et d'oxydase ont été retenues pour la suite du travail. Les souches isolées ont été purifiées par mise en culture dans 5 mL de bouillon MRS. Après 24h d'incubation à 37°C, les cultures sont centrifugées 10 min

à 10 000 g à 4°C. Le surnageant est ensuite remplacé par le bouillon MRS contenant du glycérol à 20%, puis les suspensions ainsi obtenues sont conservées à -20°C et -80°C

2.2. Identification moléculaire et proximité génétique des bactéries lactiques isolées.

Toutes les souches isolées ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Autoflex speed, Bruker®). Un typage moléculaire par la technique RAPD-PCR (*fingerprinting*) a été réalisé afin d'avoir une reconnaissance spécifique de souches de la même espèce et supprimer les doublons.

2.2.1 Identification par spectrométrie de masse : Maldi-TOF

- **Principe de l'identification par MALDI-TOF**

Le MALDI-TOF est une technique basée sur l'ionisation de l'échantillon co-cristallisé par des impulsions courtes de laser. Les ions sont accélérés et leur temps de vol est mesuré dans un tube de vol à vide. L'énergie du laser vaporise, dans notre cas, le microorganisme avec la matrice conduisant à l'ionisation des protéines. Le temps de vol des protéines ionisées donne un spectre caractéristique de la carte peptido-protéique d'un type cellulaire, chaque temps de vol étant mesuré selon le rapport m/z où m est la masse moléculaire et z la charge de l'ion. Le logiciel compare ensuite automatiquement les spectres collectés avec une banque de données de référence contenant une grande variété de spectres (Wieser et al., 2012).

- **Mode opératoire**

Pour l'identification des isolats au niveau de l'espèce, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été effectuée avec une gamme m/z de 2 000 à 20 000 Da / 200 shots – en mode réflectron.

Pour cette identification, les bactéries sont cultivées sur gélose MRS sans tween. Une colonie est déposée puis est étalée sur la plaque cible du MALDI-TOF de façon à réaliser un frottis fin et homogène (trois dépôts sont effectués pour chaque isolat). Des dépôts de BTS (*Bacterial Test Standard*, Bruker Daltonics, Allemagne) sont réalisés comme témoins, afin de calibrer le spectromètre pour une identification fiable.

Les dépôts sont ensuite rincés à l'Eau milliQ et TFA 2,5% puis une étape d'extraction à l'acide formique (70% [v/v], Sigma-Aldrich) est réalisée. Après le séchage de l'acide formique, les dépôts sont recouverts par la matrice HCCA (*A-Cyano-4-hydroxycinnamic acid*, Sigma-Aldrich) préparée

dans une solution standard (50 % acétonitrile, 2,5 % acide trifluoroacétique (Sigma-Aldrich) et 47,5 % d'eau Mili-Q) ; à une concentration finale de 10mg HCCA/ml. Après séchage, la plaque cible est prête pour l'analyse dans l'Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Allemagne). Les spectres obtenus sont analysés et comparés avec la base de données *Maldi Biotyper* 3.0. Les identifications sont données avec des scores qui correspondent à la fiabilité de l'identification.

2.2.2. RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)-PCR

La RAPD-PCR est une technique qui amplifie des segments de l'ADN génomique au hasard utilisant une seule amorce avec une séquence nucléotidique arbitraire (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>) qui permet une reconnaissance spécifique de souches de la même espèce.

- **Extraction de l'ADN génomique**

L'ADN total est extrait à l'aide du kit de purification Wizard® (Genomic DNA purification Kit, Promega, Madison, USA), à partir de cultures fraîches (24h, 37°C) dans du bouillon MRS. 1 mL de la culture bactérienne est transféré dans un tube eppendorf de 1,5 mL, puis centrifugé à 13 000 g, pendant 2 minutes. Les cellules sont récupérées et remises en suspension dans 480 µL d'EDTA (*Ethylene Diamine TetraAcetate*) à 50 mM. 120 µL de lysozyme, à une concentration de 10 mg/L, sont ajoutés et bien mélangés par pipetage. L'échantillon est ensuite incubé à 37°C pendant 60 minutes, puis centrifugé pendant 2 minutes à 13 000 g. Après élimination du surnageant, 600 µL de la solution de lyse (Nuclei Lysis Solution) sont ajoutés au culot et pipetés doucement jusqu'à ce que les cellules soient remises en suspension. La suspension est incubée à 80°C pendant 5 minutes pour lyser les cellules, puis refroidie à température ambiante. Ensuite 3 µL de la solution de ribonucléase (ARNase) sont ajoutés au lysat cellulaire, et le tube est incubé à 37°C pendant 60 minutes. Un volume de 200 µL de la solution de précipitation des protéines est ajouté au lysat cellulaire et le tube est ensuite incubé dans un bain de glace pendant 5 minutes puis centrifugé à 13 000 g, pendant 3 min. Le surnageant contenant l'ADN est transféré à nouveau dans un tube eppendorf de 1,5 mL contenant 600 µL d'isopropanol, puis mélangé doucement par inversion du tube. Le tube est centrifugé à 13000 g, pendant 2 minutes, puis le surnageant est éliminé. Un volume de 600 µL d'éthanol à 70 % est ajouté pour laver le culot d'ADN en inversant le tube plusieurs fois. Après centrifugation à 13000 g, pendant 2 minutes, l'alcool est aspiré. Le tube est ensuite séché à

l'air pendant 10-15 minutes et 100 µl de la solution de réhydratation de l'ADN sont ajoutés dans le tube afin de réhydrater l'ADN en réalisant une incubation à 65°C pendant 1 h. La concentration et la pureté du ADN est déterminé par Nanodrop™ (Thermo Fisher) en mesurant l'absorbance à 260 et 280nm. L'ADN ainsi récupéré est conservé à -20°C.

- Amplification

L'amorce utilisée ici est la M13 [5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'] (Stenlid et al., 1994). Le mélange réactionnel de la PCR a un volume final de 25 µL et contient : 10 µL *DreamTaq™ PCR Master Mix* (Fermentas, Allemagne), 4 µL de Q-solution, 0,6 µL de l'amorce M13 à une concentration de 20 µM, 3,4 µl d'eau dépourvue de nucléases (*nucleases free*) et 2 µl d'ADN.

Le programme de PCR commence avec une première étape de 5 minutes à 94°C, après 40 cycles de trois étapes successives ; une étape de dénaturation de 1 min à 94°C, une étape d'hybridation de 40 secondes à 55°C et une étape d'extension pendant 2 min à 72°C. Enfin, une autre étape d'extension finale de 10 minutes à 72°C est effectuée. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) à 100V pendant 2 heures coloré au GelRed™ (Biotium) qui est ajouté au gel à raison de 5 µl/100 mL. Le marqueur de taille moléculaire utilisé est *O'Gene Ruler DNA Ladder* (Thermo-Fisher). Le gel est observé sous UV à l'aide de l'appareil Gel Doc™ (Bio-Rad, USA). Les profils obtenus sont comparés avec le logiciel PyElph 1.4 pour construire les dendrogrammes (Pavel et Vasile, 2012).

2.3. Séquençage du génome

L'ADN total des souches bactériennes est extrait en utilisant le kit de purification d'ADN génomique Wizard (Promega Corp., Madison, WI, USA) selon les instructions du fabricant. L'ADN est dosé par spectrométrie UV à 260 nm au moyen du nanodrop (ThermoFischer). Pour une application de séquençage de génome, l'ADN est dosé par fluorescence au moyen du kit Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (ThermoFischer) selon les instructions du fabricant. Les génomes bactériens sont séquencés par MicrobesNG (<http://www.microbesng.uk>) en utilisant les plates-formes technologiques Illumina MiSeq et HiSeq 2500, avec des séquences appariées de 250bp. L'analyse des séquences est réalisée par MicrobesNG en utilisant une procédure standardisée impliquant les logiciels Kraken (Wood et Salzberg, 2014) pour déterminer le génome de référence existant le plus proche, l'algorithme Burrows-Wheeler Aligner (BWA) MEM (<http://bio-bwa.sourceforge.net>)

pour cartographier les séquences et évaluer la qualité des données. Le génome est reconstitué par assemblage *de novo* en utilisant le logiciel SPAdes (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>).

L'annotation prédictive du génome a été réalisée par le serveur RAST (<http://rast.nmpdr.org>). L'analyse de la présence de clusters de gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires a été faite avec antiSMASH (Weber et al., 2015) et BAGEL3 (van Heel et al., 2013).

3. Activités anti-*Clostridium perfringens*

Dans le but de mettre en évidence une activité antagoniste à l'égard de *Clostridium perfringens*, et réaliser une première sélection des souches d'intérêt, deux méthodes sont utilisées, un test en « slabs » ou morceaux (Dec et al., 2014) utilisant les colonies entières, et un test des puits en utilisant le surnageant neutralisé (Bendali et al., 2014). Cette dernière méthode permet de mettre en évidence et de caractériser les molécules impliquées ou bioactives (acides organiques, peroxyde d'hydrogène, bactériocines...).

- **Préparation des souches cibles**

Les souches de bactéries lactiques isolées sont testées contre la souche de référence *Clostridium perfringens* DSM 756 et contre 13 souches de *C. perfringens* isolées de poulets malades (Tableau 9). Des cultures de 20 heures de *C. perfringens* en anaérobiose sont étalées sur milieu BHI gélosé (1% [p/v] agar). L'étalement de *Clostridium* est effectué par écouvillonnage.

- **Préparation des souches lactiques pour les tests d'activités antagonistes**

Les souches isolées ont été mises en culture dans 5 mL de bouillon MRS à 37°C pendant 20h. La culture résultante est alors centrifugée (10.000g, 10 min, 4°C), le surnageant et les culots résultants sont alors séparés.

3.1. Test des *slabs*

Le culot cellulaire est utilisé comme pour le test en *slab* (Dec et al., 2014). La culture est ajustée à DO₆₀₀ = 0,4 avec du PBS 1x et 200 µl sont étalés sur boîtes de Pétri de 4cm de diamètre contenant 15 mL de MRS gélosé. Après une incubation de 20 h à 37°C, une colonne de gélose (*slab*) de 6 mm de diamètre est découpée et posée sur le BHI gélosé déjà inoculé avec *C. perfringens*.

Tableau 9. Souches de *Clostridium* utilisées comme bactéries cibles

Souche	Origine	Institution
<i>C. perfringens</i> DSM756	Bœuf	Leibniz-Institut DSMZ
<i>C. perfringens</i> ICVB079	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB080	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB081	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB082	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB083	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB085	Poulet	ANSES
<i>C. sporogenes</i> ICVB086	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB087	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB088	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB089	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> ICVB090	Poulet	ANSES
<i>C. perfringens</i> Clinique1	Poulet	ANSES

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (<https://www.anses.fr/fr>)

3.2. Test des puits

Le surnageant obtenu est neutralisé à pH 6,30-6,60 par addition de soude (NaOH) 3M, et filtré sur membrane de polyéthersulfone de porosité 0,45µm. Ensuite, 40 µl de surnageant neutralisé sont déposés dans le puits, comme décrit par Bendali et al. (2014).

3.3 Lectures des tests

Les boîtes des deux tests sont laissées à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des molécules puis les boîtes sont incubées en anaérobiose pendant 20 h à 37°C.

La lecture se fait par mesure de la longueur de l'anneau des halos d'inhibition. Lorsqu'il y a apparition d'un halo de petite taille (bord de puits), les souches sont de nouveau cultivées dans 30mL de bouillon et le surnageant concentré 10 fois, neutralisé et filtré est testé par la méthode des puits. La souche d'*Ent. faecalis* DD14 active contre *C. perfringens* a été utilisée comme contrôle positif.

3.4. Recherche moléculaire des composants antibactériens

Les gènes codant pour la reutérine sont recherchés chez les souches *de Lb. reuteri* en utilisant des amorces spécifiques. Les amorces utilisées permettent d'amplifier le gène *gldC* qui code pour l'enzyme déshydratant le glycérol en aldéhyde et impliquée dans la conversion de glycérol en reutérine (**Figure 24**).

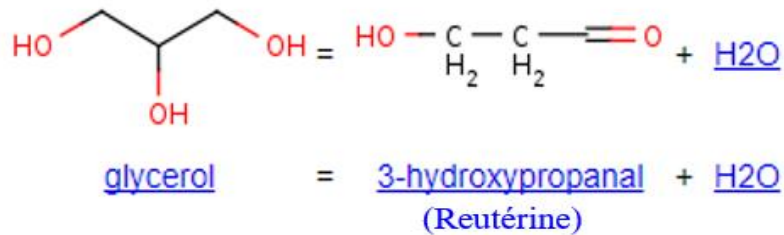


Figure 24. Réaction catalysée par Gld (Glycérol déshydratase) - EC 4.2.1.30.

Les amorces utilisées ont été décrites par Cadieux et al. (2008) (GDCRev-5'-GC[A/G]GC[C/T]TT[G/C]ATATCT[G/T][G/C]AACCAT-3' et GDCFor-5'-GC[A/C]TA[C/T]GC[A/T]GAAACCATTTCAGTTTA-3'). Il s'agit d'amorces dégénérées correspondant à une région très conservée, cela veut dire que ces amorces sont conçues comme un ensemble de toutes les combinaisons possibles de nucléotides pouvant coder pour une séquence d'acides aminés donnée (Kwok et al., 1994). 50 µL du mélange réactionnel contiennent 100 pmol de chaque primer, 1x de PCR buffer, 2mM de MgCl₂, 200µM de dNTPs, 0,5µg de ADN et 2,5 U de Taq polymerase. Le programme PCR comprend une étape initiale de dénaturation (5 minutes à 94°C), 30 cycles (1 minute à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1,5 minutes à 72°C) et une étape finale de 10 minutes à 72°C. La taille attendue du produit est de 728pb. Le produit est cloné en utilisant le kit pGEM®-T Easy (Promega), puis il est séquencé.

4. Etude du potentiel probiotique

4.1. Dosage de l'acide lactique

La quantité d'acide lactique produite par les souches isolées a été déterminée par dosage HPLC.

- **Principe de la chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

La chromatographie HPLC est une technique qui permet la séparation de différents composants d'un échantillon grâce à l'interaction entre les phases. Le solvant (phase mobile) passe généralement à travers la colonne (phase stationnaire), l'échantillon est séparé en différents constituants à l'aide de différences d'affinités relatives (Thammana, 2016). En fonction du substrat utilisé, il y a des HPLC de phase normal ou reverse où la séparation est dû à la polarité; le HPLC de exclusion par taille et HPLC d'échange d'ion (variant le pH ou la force ionique) (Bird, 1989; Snyder, 2000; Thammana, 2016). Pour la détection de molécules, il y a des détecteurs basés sur une propriété de la phase mobile (indice de réfraction, dispersion de la lumière...) ou sur une propriété du soluté (absorbance en UV, IR, fluorescence...).

- **Protocole experimental**

Une culture standard est réalisée pour toutes les souches (1 colonie dans 5 mL de bouillon MRS incubé pendant 24 heures à 37°C). Une lecture de la densité optique à 600nm, et la mesure du pH sont effectuées et suivies d'une centrifugation (10 000 g, 10 min, 4°C), les surnageants sont alors filtrés sur filtres Millipore (0,2 µm). L'acide lactique est quantifié par HPLC Spectra System P1000 XR (Thermo, USA). La colonne utilisée est une Fast Juice Column (50 mm × 7.8 mm, Phenomenex, Torrance, CA) avec une élution isocratique avec du H₃PO₄ (0.05% p/p), un débit de 0,8 mL/min et une température de 55 °C. Le volume d'échantillon injecté est de 25 µL. Une courbe d'étalonnage de l'acide lactique (Sigma-Aldrich) avec des concentrations de 1, 2, 5 et 10 g/L est réalisée pour établir la corrélation entre les données obtenues d'aire du pic chromatographique et la concentration d'acide lactique présente. Le pic correspondant à l'acide lactique est identifié en utilisant le Logiciel Azur qui est élué à la minute 5,27.

4.2. Formation de biofilms par les souches de bactéries lactiques

Des cultures de 18 heures de nos souches à une DO_{600nm} de 5, sont diluées au 1/50^{ème} en utilisant un bouillon MRS frais dans des plaques en polystyrène de 96 puits. Une fois inoculés, les plaques sont incubées à 37°C en anaérobiose pendant 24h. Le protocole décrit par Jones et Versalovic (2009) est alors utilisé pour quantifier les biofilms formés. Ainsi, deux lavages avec de l'eau sont réalisés pour éliminer les bactéries qui n'ont pas adhéré au fond du puits. Le crystal violet 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich) est utilisé pour colorer les bactéries formant les biofilms. Après 15 minutes

d'incubation à 37°C et une centrifugation (200 rpm), des lavages à l'eau sont alors effectués. Enfin, le colorant est dissout par ajout de l'éthanol à 96% et l'absorbance à 600nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque Safas MP96 (Monaco).

4.3. Fermentation des carbohydrates par les bactéries lactiques isolées

La détermination du profil fermentaire des hydrates de carbone a été réalisée en utilisant les galeries API 50CH (Bio Mérieux). Les souches sont cultivées sur gélose MRS pendant 24 h à 37°C dans des conditions d'anaérobiose. Les colonies sont mises en suspension dans le milieu API 50CHL à une densité égale à 2 sur l'échelle de McFarland. Les galeries ont été ensuiteensemencées en suivant les instructions du fournisseur, puis incubées ont été incubées à 37°C. La lecture est alors effectuée après 24 et 48 h d'incubation. Les identifications sont ensuite obtenues à l'aide du logiciel apiweb version 3 (<https://apiweb.biomerieux.com>).

4.4. Etude de la résistance aux conditions gastro-intestinales du poulet

- **Effet du pH et de la bile.**

Les conditions gastro-intestinales ont été testées indépendamment. Le produit Actisaf® STD, produit à base de levures vivantes, commercialisé par Lesaffre pour des applications chez le poulet, a été alors utilisé comme un premier témoin positif pour la détermination des conditions d'essai.

Les différentes conditions du tractus gastro-intestinal du poulet, sont reproduites (simulation) *in vitro*, comme indiqué dans le **Tableau 10**, ci-dessous.

Tableau 10. Conditions de pHs et biles testées.

pH	2,6
	3,5
	4,5
	6,4
Bile	0,35% (p/v)
	0,70% (p/v)

Toutes les solutions ont été préparées dans le milieu Tryptone-Sel permettant de réduire le stress que pourrait rencontrer les bactéries. Pour la simulation de la bile, l'oxgall bile, porcine (Sigma) a été utilisé. Les échantillons sont incubés à 41,3°C pendant 45, 90 et 180 min.

Une fois les conditions du tractus gastro-intestinal à tester définies, les souches sélectionnées y sont exposées de façon consécutive, avec l'apport de quelques modifications. Ainsi pour le jabot un pH à 4,5 est appliqué pendant 45 minutes, ensuite pour le gésier le pH est ajusté à 3,5 pendant 90 min en présence de pepsine à 3 mg/mL (Sigma-Aldrich) et 2 g des billes en verre, de 2mm de diamètre, agitées à 350 rpm pour simuler le broyage. Pour l'intestin, un pH de 6,4 est testé avec l'addition de pancréatine (Sigma-Aldrich), à 1mg/mL et une concentration de 0,35% de bile oxgall (Sigma-Aldrich) pendant 3 heures (Martinez-Haro et al., 2009; Musikasang et al., 2009). Toutes ces étapes sont réalisées à la température physiologique du poulet (41,3°C). Le but final étant de simuler les différentes étapes de la digestion qui ont lieu dans le jabot, le gésier et l'intestin de poulets (Figure 25). *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 est utilisée comme témoin. Les souches testées sont préparées selon le protocole suivant : Des cultures de 20 heures à 37 °C sont centrifugés à 5000g 15 minutes à 4°C. Les culots sont lavés avec du Chlorure de Sodium (NaCl) à 0,9% (p/v) puis résuspendus dans les différentes solutions correspondant aux conditions décrites précédemment.

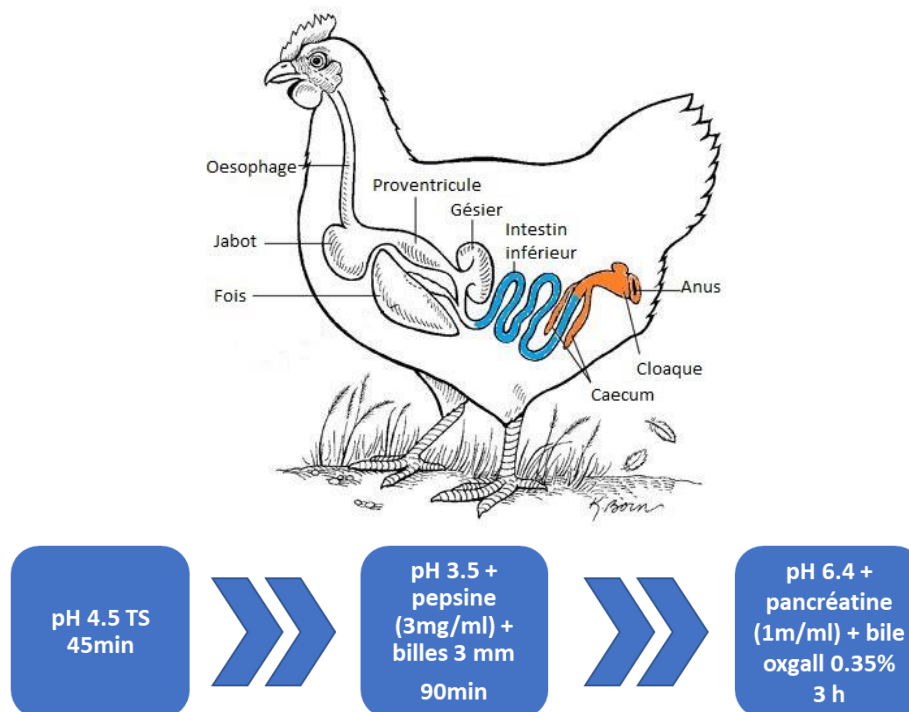


Figure 25. Reconstitution des conditions gastro-intestinales.

Des échantillons sont prélevés à $T = 0$ et après incubation. Pour déterminer le nombre de bactéries et la viabilité des souches, deux approches ont été utilisées. D'abord les dénombrements sur milieu gélosé MRS en utilisant la technique de *drop-plate* (Tomas et al., 2015), puis la technique de cytométrie en flux.

- **Mesure par cytométrie en flux**

La cytométrie en flux est une technique qui permet de distinguer les cellules selon leur caractéristiques physiques, tels que la taille (FSC) et la granulométrie (SSC), mais aussi par la fluorescence qui peuvent être émises à des longueurs d'onde précises en utilisant certains colorants (Bunthof et al., 2001). Ces caractéristiques sont déterminées à l'aide d'un système de couplage électro-optique qui enregistre la façon dont la cellule ou la particule diffuse la lumière laser et émet de la fluorescence. Chaque particule qui passe à travers le cytomètre et est détectée et classifiée comme un événement différent. Les signaux lumineux sont détectés et converties en signaux électroniques qui sont traités par l'ordinateur avec le logiciel Attune NxT. Pour la mesure, un flux laminaire est créé, permettant le passage de cellules isolées à travers le faisceau laser et le comptage des événements. Cette technique est intéressante car permettant l'évaluation rapide de la viabilité cellulaire. Ses avantages sont l'obtention rapide de données et la différenciation parmi les états physiologiques des cellules (Figure 26).

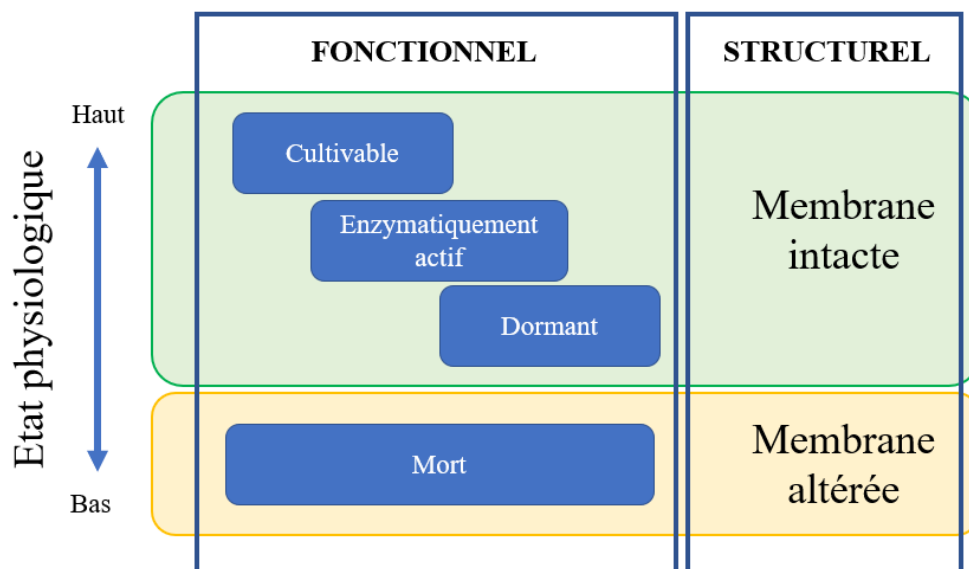


Figure 26. Etats physiologiques des bactéries.

Pour les analyses réalisées, le cytomètre en flux Attune™ NxT (Thermo Fisher) est utilisé. Il est équipé d'un laser bleu (488_{nm}, 50 mW) et le logiciel associé est Attune™ NxT software. La gamme de taille de particule est de 0,5 à 50 µm.

La méthode utilisée est celle décrite par la réglementation ISO19344:2015 pour la quantification de bactéries lactiques dans les produits laitiers par cytométrie en flux. Deux colorants sont utilisés : le syto-24 (Invitrogen), colorant qui pénètre dans les cellules et se lie aux acides nucléiques des bactéries en donnant une fluorescence vert brillant à une concentration finale de 10nM, permettant la détection de bactéries vivantes et mortes. Pour la différenciation entre les bactéries vivantes et mortes, l'iodure de propidium (Molecular Probes) est utilisé pour colorer les cellules mortes. De par sa structure, la membrane lui est imperméable, et donc la coloration aura lieu que quand il y a une rupture de la membrane bactérienne, il se lie alors à l'ADN et donne une coloration rouge aux cellules. Il est utilisé à une concentration finale de 200nM. Pour quantifier les bactéries vivantes dans l'échantillon, une soustraction du nombre de cellules mortes au nombre de cellules totales est réalisée. La différence correspondant aux viables cultivables et non cultivables c'est-à-dire les bactéries qui sont vivantes et actives métaboliquement mais sont incapables de se diviser en formant une colonie sur milieu gélosé.

4.5. Propriétés d'agrégation

La mesure des capacités auto-agrégatives des souches bactériennes est un indicatif du comportement de souches au niveau de l'adhésion aux cellules épithéliales (**Zarate et al., 2002**). L'auto-agrégation et la co-agrégation des souches isolées ont été évaluées selon le protocole de Campana et al. (**2017**) et Collado et al. (**2008**).

4.5.1. Mesure de l'auto-agrégation

10 mL de culture des souches sur milieu MRS de 18 h à 37°C sont centrifugées (10 000 g, 10 min, 4°C). Les culots sont lavés avec du tampon phosphate salin (PBS 1X, pH 7,4) et résuspendus dans la même solution à une DO₆₀₀ égale à 0,25 ± 0,05. Cette suspension bactérienne est vortexée pendant 10 secondes et incubée à 37°C. Après 24h de contact, l'absorbance à 600 nm des échantillons est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (UV mini 1240, Shimadzu) à intervalles réguliers (0, 6 et 24h), en prélevant 1mL du haut de la solution. Le pourcentage d'auto-agrégation est déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ agrégation} = 1 - \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

où A_t est l'absorbance à DO_{600} à différents temps et A_0 est l'absorbance à DO_{600} initiale.

4.5.2. Mesure de la co-agrégation

Les suspensions bactériennes sont préparées de la même façon que pour les essais d'auto-agrégation. Des volumes égaux de solutions bactériennes des différentes souches lactiques et pathogènes sont mélangés, au vortex pendant 10 secondes, puis incubés à 37 °C sans agitation. Les pathogènes testés sont *C. perfringens* DSM 756, *E. coli* ER184 (souche isolée à l'ANSES et portant une résistance à la colistine) et *Salmonella enterica* Enterica serovar Newport (ATCC 6962).

Les absorbances (600nm) des mélanges sont mesurées également à intervalles de temps réguliers (0, 6 et 24 h d'incubation). La co-agrégation est déterminée pour le mélange des bactéries et pour les témoins contenant chaque bactérie seule. Le prélèvement est réalisé comme décrit dans l'analyse d'auto-agrégation. Le pourcentage de co-agrégation est déterminée en utilisant la formule ci-dessous :

$$\% \text{ co - aggregation} = \left[1 - \frac{A_{\text{mélange}}}{\left(\frac{A_{\text{pat}} + A_{\text{b.lactique}}}{2} \right)} \right]$$

où $A_{\text{mélange}}$ est l'absorbance à DO_{600} du mélange de pathogène et la souche probiotique ; A_{pat} est l'absorbance à DO_{600} du pathogène seul, et $A_{\text{b.lactique}}$ est l'absorbance à DO_{600} du probiotique seul.

4.6. Adhésion aux cellules intestinales

Dans le but d'évaluer la capacité d'adhésion de *C. perfringens* et des souches de lactobacilles sélectionnées aux cellules de l'épithélium intestinal, la lignée cellulaire Caco-2 a été utilisée comme model.

- **Lignée cellulaire Caco-2**

La lignée cellulaire Caco-2 est issue d'un adénocarcinome du côlon. Cependant, l'une de ses propriétés les plus avantageuses est sa capacité à se différencier spontanément en une monocouche de cellules adhérentes. Les cellules différenciées présentent une morphologie polarisée cylindrique, avec des microvillosités du côté apical, des jonctions serrées entre les cellules adjacentes et

expriment de petites activités enzymatiques d'hydrolases intestinales sur la membrane apicale. Ces caractéristiques sont très similaires à celles des entérocytes intestinaux trouvés dans l'intestin grêle (Sambuy et al., 2005; Verhoeckx et al., 2015). Pour cette expérience, les cellules Caco-2 sont cultivées dans des plaques de 24 puits. Elles sontensemencées à une charge de 4×10^4 cellules par puits et incubées pendant 7 jours à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Lonza) supplémenté avec 25 mM glucose, 5 mM L-glutamine, 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) et 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine.

4.6.1. Test d'adhésion bactérienne

Ce test a été réalisé selon le protocole décrit par Bendali et al. (2014). Pour cela, des cultures de 24 heures de nos souches sont préparées en bouillon MRS pour les bactéries lactiques, et sur milieu BHI pour *C. perfringens*. Les cellules sont centrifugées (8000 g / 10 min / 4°C) lavées deux fois avec du tampon PBS 1X, et enfin re-suspendues dans du milieu DMEM non complémenté. 500 µL de ces suspensions sont ensuite ajoutés à chaque puits contenant les cellules Caco-2 avec un ratio de 1 :10 (cellule Caco-2 : cellules bactériennes). Après incubation à 37°C pendant 2 h, les monocouches de cellules Caco-2 sont lavées deux fois avec du PBS à 37°C puis traitées avec 200 µL de Trypsine/EDTA (Gibco) et incubées pendant 10 min à 37°C pour détacher les cellules Caco-2. Pour déterminer le pourcentage d'adhésion, deux méthodes sont utilisées. La méthode classique où le contenu de chaque puits est dilué puisensemencé sur gélose MRS pour déterminer le nombre de bactéries adhérentes, ou par la méthode décrite par Candela et al. (2008) en utilisant la PCR en temps réel. Le pourcentage d'adhésion a ensuite été calculé par rapport au nombre de bactéries inoculées.

4.6.2. Détermination de l'adhésion par PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel permet de détecter et mesurer d'une manière fiable les produits générés au cours de chaque cycle PCR (Polymerase Chain Reaction), et sont directement proportionnels à la quantité de matrice présente avant l'amplification. Les produits de PCR (amplicons) sont quantifiés durant la phase exponentielle de la réaction car c'est seulement à cette étape qu'il est possible d'extrapoler la quantité de départ de la séquence matrice. Pour les mesurer, il est possible d'utiliser des fluorochromes qui s'intercalent de façon non-spécifique (par exemple

: SYBR Green) ou des sondes moléculaires contenant un « quencheur ». L'intensité de fluorescence augmente chaque cycle ce qui se traduit à une augmentation de la quantité d'amplicons produits d'une façon proportionnelle. Le « *threshold cycle* » (Ct) est défini comme le nombre de cycles de PCR auquel la fluorescence du rapporteur est supérieure à la fluorescence de fond. Cette valeur Ct est toujours atteinte pendant la phase exponentielle de l'amplification de la cible. Le Ct est inversement proportionnel au niveau d'expression relatif d'origine du gène d'intérêt. C'est un élément essentiel pour l'obtention de données précises et reproductibles (Arya et al., 2005).

Le SYBR Green 1 est très utilisé. Il est fluorescent uniquement lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double brin (db). L'intensité du signal de fluorescence dépend donc de la quantité d'ADN db présent dans la réaction. La quantification par PCR quantitative en temps réel est réalisée avec les amorces pour la détection de *Lactobacillus* (LactoG1F [5'- TGGAAACAGRTGCTAATACCG -3'] et LactoG1R [5'- GTCCATTGTGGAAGATTCCC -3']), et pour *Clostridium perfringens* (CPerf165F [5'- CGCATAACGTTGAAAGATGG -3'] et CPerf269R [5'- CCTTGGTAGGCCGTTACCC -3']) (Wu et al., 2011).

Selon Candela et al. (2008), les suspensions cellulaires obtenues à partir des tests d'adhésion sont décongelées à température ambiante puis homogénéisées. Un aliquote de 20 µL est transféré dans un tube de 0,2 mL et incubé pendant 10 min à température ambiante avec 3,8 µL de solution d'inhibiteur de trypsine (Sigma-Aldrich).

La PCR quantitative en temps réel (QuantStudio®3, Applied Biosystems) est réalisée avec le fluorophore SYBR Green I (Molecular Probes Inc.) pour quantifier le signal fluorescent. L'amplification est réalisée dans un volume final de 20 µL contenant 2 µL de la suspension cellulaire, 0,4 µM de chaque amorce et complété avec du SYBR® Select Master Mix (Applied biosystems). Le programme suivi est le suivant: pré-incubation à 94°C/10min, 40 cycles d'amplification (95°C /15 sec, 60°C/10 sec, 72°C/ 30sec) et finalement 72°C/10min. Pour avoir une quantification absolue, les dilutions de chaque bactérie testée dans du PBS avec de concentrations de 10⁶ à 10³ UFC/mL sont utilisées comme standards.

4.7. Innocuité des souches sélectionnées

Afin d'évaluer l'innocuité des souches, ces dernières ont été testées pour leur activité hémolytique, leur profil de résistance aux antibiotiques et leur effet cytotoxique.

4.7.1. Activité hémolytique

Pour le test d'hémolyse, une pré-culture des souches est réalisée dans du bouillon MRS à 37°C pendant 24h. Après un isolement sur MRS gélosé, trois colonies de la même souche sont repiquées sur milieu *Columbia agar + sang de cheval* (Oxoid). L'incubation est réalisée en anaérobiose à 37°C avec une lecture à 24 h, et une deuxième à 48 h. Les boîtes sont examinées pour la présence d'une zone transparente (β -hémolyse) pour une hémolyse complète, verdâtre (α -hémolyse) quand l'hémolyse est incomplète ou l'absence de toute zone (γ -hémolyse) autour de colonies de *Lactobacillus* (Pisano et al., 2014). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (β -hémolytique) est utilisée comme souche témoin-positif.

4.7.2. Résistance aux antibiotiques

Les cultures bactériennes ont été étalées par écouvillonnage de façon uniforme sur la surface du milieu MRS gélosé. Après séchage, des disques d'antibiotiques sont déposées et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h. Après cette période d'incubation, les souches sont classées comme sensibles ou résistantes selon les diamètres de la zone d'inhibition et les recommandations du manuel d'EUCAST à Janvier 2017 (http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/).

4.7.3. Cytotoxicité sur cellules eucaryotes de la lignée HT-29

La lignée cellulaire HT29 provient d'un adénocarcinome colorectal humain. Ces cellules sont capables d'exprimer les caractéristiques des cellules intestinales matures, telles que les entérocytes ou les cellules productrices de mucus. Pour cela, elles constituent un modèle *in vitro* pour simuler l'épithélium intestinal. Cette lignée possède plusieurs avantages tels que la polarisation des cellules, lorsqu'elles sont matures, une organisation en monocouche, la présence de microvillosités et la production de mucine (Verhoeckx et al., 2015).

Les cellules de la lignée cellulaire HT29 sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Lonza) supplémenté avec 25 mM glucose, 5 mM L-glutamine, 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF), 100 U/mL de pénicilline et de streptomycine soit dans des flacons type Falcon de 75 cm³ soit en plaques de 96 puits. Des passages sont effectués chaque semaine dans un nouveau flacon avec du milieu frais. Pour les tests de cytotoxicité, un

inoculum de 8×10^3 cellules par puits est préparé une semaine avant de commencer l'expérience. Durant ce laps de temps (7 jours), trois changements de milieu sont réalisés pour maintenir les conditions optimales pour la croissance des cellules HT-29.

Les souches de lactobacilles sélectionnées sont cultivées pendant 36 heures à 37°C dans du bouillon MRS. Les cultures sont centrifugées 10 min à 10 000g à 4°C puis re-suspendues dans le DMEM sans antibiotique ni SVF. Le contact est ensuite réalisé pendant 24 heures à 37°C et 5% CO₂. Deux concentrations de bactéries sont testées : Une concentration élevée (10^7 UFC/puits) et une concentration plus faible (10^5 UFC/puits). Un contact avec les bactéries mortes est également testé pour contrôler qu'il n'y ait pas de composants de la surface la bactérie qui pourraient être cytotoxiques. Les tests sont réalisés en triplicata.

Pour mesurer l'effet cytotoxique, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS pour éliminer les bactéries, puis le milieu DMEM complété en gentamicine (50 µg/mL) et 5% du réactif CCK-8 « *Cell Counting Kit-8* » (Dojindo Molecular Technology) est ajouté. Le kit « *Cell Counting Kit-8* » permet de quantifier la viabilité de cellules HT-29 après le contact avec les bactéries. Les cellules HT29 vivantes sont capables de réduire le sel de tétrazolium par l'activité des déshydrogénases qu'elles possèdent. Après 2 heures d'incubation à l'obscurité, le produit formé, de couleur orangé, est quantifié par mesure de l'absorbance à 450_{nm} avec un lecteur de microplaques (Xenius, Safas). L'intensité de la coloration orangée obtenue et la quantité de cellules vivantes sont directement proportionnelles. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de survie des cellules HT-29 par rapport au témoin (cellules HT-29 sans contact avec les bactéries).

5. Survie des bactéries lactiques isolées dans les conditions de stockage, et lors de l'administration aux animaux.

Les souches sélectionnées doivent être résistantes aux conditions d'administration aux animaux. Par conséquent, il est nécessaire de connaître leur viabilité dans les conditions de stockage utilisées et aussi d'évaluer la survie des bactéries dans l'eau de boisson des animaux.

5.1. Survie des bactéries au procédé de lyophilisation et leur conservation sous forme déshydratée

1L de milieu MRS estensemencé pendant 19 h avec une DO₆₀₀ initiale est de 0,1 en utilisant une pré-culture de 18 heures à 37°C. L'agitation est fixée à 110 rpm et la température à 37 °C. Les

cellules bactériennes sont ensuite récoltées par centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes à 10°C dans une centrifugeuse Avanti JXN-26 (Beckman® Coulter). Les surnageants sont retirés et les culots cellulaires sont pesés et mélangés avec des agents cryoprotecteurs comme le lait écrémé (20% [p/v]) ou le saccharose (20% [p/v]) avec un ratio (1 :2) (1g bactéries : 2g cryoprotecteur) (**Ming et al., 2009**).

Des échantillons sont rapidement congelés en isopropano-2-ol à -55°C. La lyophilisation est réalisée pendant 24 heures dans un lyophilisateur Heto PowerDry PL9000 (Thermo Fisher) pour obtenir une forme déshydratée des culots cellulaires. Ce processus nécessite un premier séchage à -20°C et 20 Pa, puis un deuxième séchage à 25°C et une pression minimale (**Fonseca et al., 2015**). Le nombre de cellules vivantes après la lyophilisation a été mesuré par dénombrement sur boîte de MRS gélosé au temps 24 h en suspendant le lyophilisat dans de l'eau stérile. Puis un essai de durabilité a été fait en mesurant le nombre UFC /g dans un période de 176 jours.

5.2. Survie des souches de lactobacilles en suspension aqueuse.

Pour vérifier la résistance des souches sélectionnées à ces conditions, des cultures fraîches sont centrifugées (8000g /10 min/ 4°C), et lavées deux fois avec du PBS 1X puis remises en suspension dans l'eau du réseau pour simuler les conditions réelles utilisées dans les fermes. Un témoin en PBS est également réalisé (conditions isotoniques). Des échantillons sont pris à différents intervalles de temps (de 0 à 24 heures), dilués et ensemencés sur MRS gélosé pour dénombrer les bactéries viables.

5.3. Inhibition croisée des souches de bactéries lactiques

Le test de spots est effectué pour vérifier que ces souches ne sont pas antagonistes entre elles. Les souches à tester sont cultivées pendant 18h en bouillon MRS. 5 µL sont déposés à la surface d'une gélose MRS. Après séchage des spots, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 h en anaérobiose. Les boîtes sont ensuite recouvertes par 10 mL d'une gélose MRS molle (8 g d'agar/L), contenant la souche cible à une charge de 10⁶ UFC/mL, puis sont incubées de nouveau dans les mêmes conditions. Après incubation, l'activité antibactérienne est révélée par la présence ou l'absence de zones claires autour des dépôts.

6. Évaluation *in vivo* des trois souches sélectionnées comme candidats probiotiques.

Un essai a été réalisé afin de déterminer *in vivo* l'efficacité des souches comme agent préventif de l'entérite nécrotique sur du poulet de chair provenant d'un croisement des lignées Cobb 500 (femelle) et Hubbard M99 (mâle). Cette étude a été réalisée sur *Lb. reuteri* ICV416, *Lb. salivarius* ICV421 et *Lb. salivarius* ICV430 qui présentaient les meilleures propriétés probiotiques *in vitro*. Les expériences *in vivo* se sont déroulées pendant 17 jours sur 240 poulets (30 par condition expérimentale). L'essai a débuté le jour de l'éclosion. Il s'agit d'un schéma factoriel quasi complet. Durant les essais, les lactobacilles ont été administrés seuls (*Lb. reuteri* ICV416, *Lb. salivarius* ICV421 ou *Lb. salivarius* ICV430), en association par paire (*Lb. reuteri* ICV416 et *Lb. salivarius* ICV421; *Lb. reuteri* ICV416 et *Lb. salivarius* ICV430), et tous les trois ensembles par gavage une fois par jour, aux jours 1 et 2, puis du jour 10 au jour 13. Il y a un seul groupe qui manque, c'est celui du mélange de *Lb. salivarius* ICV421 et *Lb. salivarius* ICV430.

6.1. Environnement des poulets et régime alimentaire

Les poulets ont été élevés dans des cages donnant une surface moyenne de 432 cm² par poulet. Les cages ont été placées à plusieurs niveaux dans une salle climatisée maintenue à une température ambiante tout au long de l'étude, et habilitée pour des essais avec un risque biologique de niveau 2. Les conditions ont été choisies selon la guide pour le soin et l'utilisation des animaux agricoles dans la recherche et l'enseignement (https://www.aaalac.org/about/ag_guide_3rd_ed.pdf). Après l'avis favorable du « *Institutional Animal Care and Use Committee* » le test a été donc réalisé. L'éclairage a été fourni 24/24 heures pendant toute la durée de l'étude. Les oiseaux ont reçu de l'eau et de la nourriture *ad-libitum*. c'est-à-dire qu'ils ont été nourris à satiété.

L'alimentation des 9 premiers jours est à base de maïs et de soja. Après le jour 10, le régime de croissance inclut du blé (**Tableaux 11 et 12**). Les deux régimes sont administrés sous forme de purée.

6.2. Vaccination

A l'exception du groupe non-challengé, les poulets ont été vaccinés au jour 1 avec « Advent@9X ». Ce vaccin contient des oocystes vivants d'*Eimeria acervulina*, *E. maxima* et *E.*

tenell, la gentamicine et l'amphotéricine B comme conservateurs. L'objectif est d'aider à prévenir la coccidiose aviaire générée par ces pathogènes. Au 9^{ème} jour, les poulets ont été vaccinés d'une manière intra-oculaire contre la bursite infectieuse aviaire par l'Intervet, Bursal Vac-G603 qui est vaccin contenant des virus vivants atténués.

Tableau 11. Composition des régimes par ingrédients (g/100g)

	Régime de démarrage (0-9 jours)	Régime de croissance (10-17 jours)
Maïs	60,83	34,87
Farine de soja (48%)	33,91	28,14
Blé	-	20,00
Grains séchés de distillation	-	10,00
Mélange de graisses végétales	1,17	3,06
Pierre calcaire	1,47	1,45
Phosphate monocalcique	1,54	1,44
NaCl	0,44	0,28
L-Lysine HCl	0,15	0,26
DL-Metionine	0,21	0,21
L-Thréonine	0,06	0,08
Vitamine premix	0,18	0,18
Minéral premix	0,05	0,05

Tableau 12. Composition approximative des régimes (g/100g)

	Régime de démarrage (0-9 jours)	Régime de croissance (10-17 jours)
Matière sèche	87,98	88,93
Protéines	22,00	22,00
Matière grasse	3,63	5,87
Fibre	2,17	2,89
Cendre	5,45	5,54
Lysine	1,3	1,3
Calcium	0,88	0,88
Phosphore	0,70	0,71
Apparent metabolizable energy value (Kcal/kg)	3 000,00	3 000,00

6.3. Traitements des différents lots

Huit traitements différents ont été testés (**Tableau 13**). Chaque traitement a été répété six fois et chaque réplica contient 5 poulets.

Tableau 13. Expérimentation animale (essai *in vivo*)

Nom	Traitement	Rôle
NCp	Pas de vaccination. Pas de supplémentation en bactéries lactiques, pas d'infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Témoin de croissance
Cp	Vaccination. Pas de supplémentation en bactéries lactiques, infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Témoin d'infection
<i>Lb. reuteri</i> ICVB 416	Vaccination. Supplémentation par une souche de bactéries lactiques. Infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Essai
<i>Lb. salivarius</i> ICVB 421	Vaccination. Supplémentation par une souche de bactéries lactiques. Infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Essai
<i>Lb. salivarius</i> ICVB 430	Vaccination. Supplémentation par une souche de bactéries lactiques. Infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Essai
ICVB 416+ ICVB 421	Vaccination. Supplémentation par deux souches de bactéries lactiques. Infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Essai
ICVB 416+ ICVB 430	Vaccination. Supplémentation par deux souches de bactéries lactiques. Infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Essai
ICVB 416+ ICVB 421+ ICVB 430	Vaccination. Supplémentation par trois souches de bactéries lactiques. Infection par <i>Clostridium perfringens</i>	Essai

6.4. Administration de *C. perfringens*

La souche de *C. perfringens* sauvage a été cultivée dans du bouillon thioglycollate pendant une nuit à 37°C. *C. perfringens* a ensuite été administré à une concentration de 10⁷ CFU/mL en dose de gavage oral de 3 mL administrée dans du thioglycollate stérile, à l'aide d'une seringue de 20 mL et d'une aiguille de dosage 20 jauge, aux 14^{ème}-16^{ème} jours d'âge. Après l'administration, les oiseaux ont été immobilisés à la main pendant 5 à 10s pour confirmer la délivrance de la dose appropriée et l'absence de stress.

6.5. Administration des bactéries lactiques

Les souches de bactéries lactiques ont été cultivées dans bouillon MRS à 37°C pendant une nuit. Aux 1^{er} et 2^{ème} jours d'âge, 250 à 500 µL de suspension de *Lactobacillus* à 10⁷ UFC/mL ont été administrés par voie orale aux oiseaux. Pour les 10^{ème} à 13^{ème} jours d'âge, la posologie est

augmentée à 1 mL, tout en maintenant la concentration à 10^7 UFC/mL. Les groupes témoins (NCp et Cp) ont reçu le même volume de solution de PBS stérile. Les oiseaux témoins négatifs ont été traités en premier afin de réduire le risque de contamination croisée.

6.6. Mesures effectuées sur les oiseaux

L'étude s'est terminée le 17^{ème} jour. Les performances des oiseaux ont été mesurées aux 0, 10^{ème}, 14^{ème} et 17^{ème} jours de la période expérimentale en enregistrant le poids des oiseaux (en g) et la consommation d'aliments pour chaque cage. Ce qui nous a également permis de calculer le « Feed Conversion Ratio » défini comme les besoins en aliments en kg par kg de poids corporel de l'animal. C'est une mesure importante pour juger de la performance économique de l'élevage (Wenk et al., 1980). Au 10^{ème} jour un poulet de chaque lot a été autopsié, et l'échantillonnage a été fait. À la fin de l'essai, tous les oiseaux ont été euthanasiés par asphyxie au CO₂, le contenu du caeca et l'intestin retirés et stockés pour des analyses métagénomiques prévues ultérieurement. Les lésions d'entérite nécrotique ont été recherchées dans les intestins et analysés à la suite des recommandations faits par Prescott et al. (1978).

7. Analyses statistiques

L'activité biologique anti-*C. perfringens*, la quantification de l'acide lactique produit, l'étude de la formation des biofilms, l'étude de la résistance aux conditions gastro-intestinales du poulet, les études des propriétés d'agrégation, l'étude de l'adhésion aux cellules intestinales, la cytotoxicité sur cellules HT-29, la survie à la lyophilisation et la survie des souches de lactobacilles en suspension aqueuse ont été réalisées en triplicat. L'essai *in vivo* présentait 5 répétitions pour chaque traitement. Les comparaisons statistiques entre les différents résultats obtenus sont effectuées par analyse de la variance ANOVA à l'aide du logiciel Statgraphics® Centurion XVI.

Résultats et discussion

1. Dénombrements et identification des bactéries isolées

Les bactéries isolées de caeca des 3 poulets sains issus du même élevage ont été dénombrées après croissance en aérobiose, à 37°C, comme décrit dans les conditions énoncées dans le chapitre matériels et méthodes, sur les milieux Elliker et LAMVAB qui est un milieu MRS complétement par de la vancomycine (20 mg/L). L'objectif est d'isoler des bactéries lactiques potentiellement probiotiques et plus spécifiquement des lactobacilles. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 14** ci-dessous :

Tableau 14. Dénombrements des bactéries lactiques (UFC/g) dans le caecum des 3 poulets.

Milieu	Poulet 1	Poulet 2		Poulet 3		Moyenne
	Caeca	Caecum droit	Caecum Gauche	Caecum Droit	Caecum Gauche	
Elliker	$3.37 \cdot 10^8$	$3.21 \cdot 10^8$	$3.40 \cdot 10^8$	$3.72 \cdot 10^8$	$2.45 \cdot 10^8$	$3.23 \pm 0.5 \cdot 10^8$
LAMVAB	$1.17 \cdot 10^8$	$9.15 \cdot 10^7$	$8.65 \cdot 10^7$	$1.40 \cdot 10^8$	$1.23 \cdot 10^8$	$1.12 \pm 0.3 \cdot 10^8$

Les milieux Elliker et LAMVAB ont été incubés à 37°C, en anaérobiose, pendant 48h. Les résultats de dénombrements sont donnés en UFC/g

Pour les 3 échantillons analysés, il n'y a pas de différence quantitative dans la colonisation des caeca droit et gauche de chaque animal. Ce résultat est en adéquation avec ceux obtenus par Stanley et al. (2015). La population moyenne de bactéries lactiques des caeca des trois poulets sains est estimée à $3,23 \pm 0.5 \cdot 10^8$ UFC/g sur milieu Elliker et à $1.12 \pm 0.3 \cdot 10^8$ UFC/g sur milieu LAMVAB, soit près d'un tiers plus faible. Elliker est un milieu peu spécifique, qui permet la croissance des lactobacilles et des streptocoques (Elliker et al., 1956), alors que le milieu MRS, qui est la base du LAMVAB, est plus favorable à la croissance de *Lactobacillus* (De Man et al., 1960). Les populations plus faibles dénombrées sur LAMVAB peuvent également s'expliquer par le fait que le milieu est complétement en vancomycine qui est un antibiotique inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram-positif non résistantes, comme les entérocoques, les streptocoques ou les bifidobactéries (Reynolds, 1989 ; Hartemink et al., 1997), alors que la plupart des espèces de *Lactobacillus* présentent une résistance intrinsèque aux antibiotiques glycopeptidiques (Hamilton-Miller et Shah, 1998; Handwerger et al., 1994; Klare et al., 2007).

Selon Bjerrum et al. (2006) et Pourabedin et al.(2015), la population microbienne anaérobie dans le contenu intestinal est de l'ordre de 10^{10} UFC/g. D'après plusieurs auteurs, les bactéries du genre *Lactobacillus* représentent 1,5 à 24% de la population microbienne totale dans le caecum du poulet. Zhu et al. (2002b) ont établi un pourcentage de 1,5% de la communauté microbienne totale. D'autres auteurs comme Gong et al. (2002), Bjerrum et al. (2006), Lu et al. (2003), et Lan et al. (2002) ont établi les pourcentages suivants 4%, 5 à 8%, 8%, et 24%, soit environ 10^8 *Lactobacillus*. Toutefois, si on considère le milieu LAMVAB comme sélectif permettant l'isolement de Lactobacilles, alors les pourcentages obtenus sont conformes à la bibliographie. La culture en milieu spécifique est incomplète, il est estimé qu' autour d'un 60% de bactéries qui proviennent de différents environnement ne peuvent pas se développer dans les conditions de culture artificielles de laboratoire (Apajalahti et al., 2004; Rinttilä et Apajalahti, 2013).

70 colonies ont été choisies au hasard sur les milieux LAMVAB et Elliker ; les bactéries ont été ensuite caractérisées suivant deux paramètres comme étant à Gram-positif et dépourvues de catalase et oxydase. Ces bactéries présentent plusieurs phénotypes coloniaux (morphologie, taille de la colonie...) et présentent des capacités d'acidification différentes après 20 h d'incubation en bouillon (37°C).

1.1. Identification moléculaire des bactéries lactiques et étude de leur proximité génétique

Les 70 souches isolées ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS. Cette méthode permet de comparer les masses moléculaires des protéines de chaque souche isolée avec celles de bactéries de la base de données (*MALDI Biotyper Systems*) en donnant un score d'identification selon la similitude des profils obtenus. Les espèces identifiées sont listées dans le **Figure 27**.

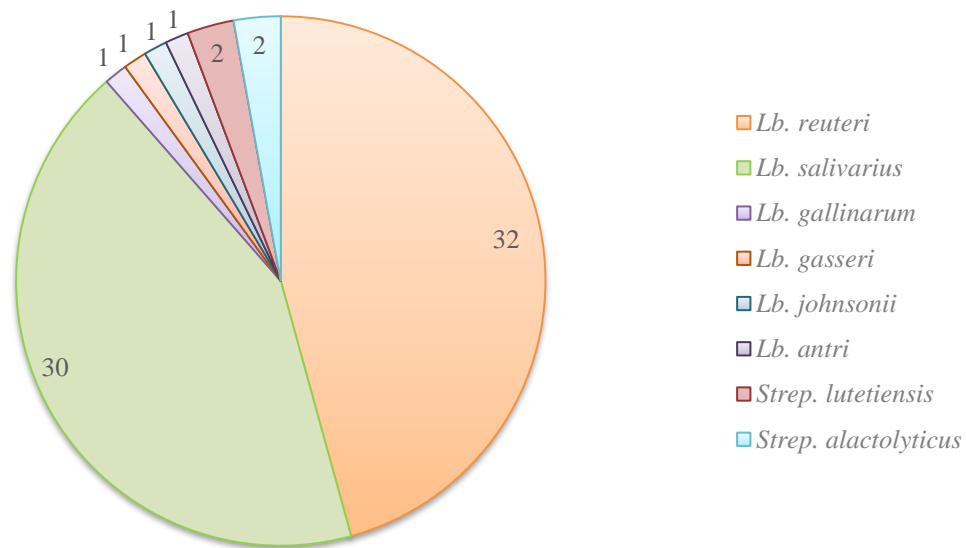


Figure 27. Répartition des espèces de *Lactobacillus* isolées dans des échantillons de caeca.

Sur la base de cette identification, les bactéries isolées des caeca appartiennent majoritairement aux espèces suivantes: *Lb. reuteri* et *Lb. salivarius* représentant 45 et 43%, respectivement de la population identifiée.

Les différences observées parmi les souches prédominantes sont dues en partie à la méthode d'obtention de données. Stanley et al. (2015), Bjerrum et al. (2006) et Wang et al. (2014) ont pour leur part analysé l'ADN extrait d'échantillons. Stanley et al. (2015) ont utilisé le « Barcoding moléculaire » qui montre que les OTUs plus abondants sont *Bacteroides fragilis*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. salivarius* et *Lb. reuteri*. Bjerrum et al. (2006) après une analyse par séquençage de l'ADNr 16S, ont trouvé que *Lb. salivarius* était prédominant parmi les *Lactobacillus* dans le caecum, suivi de *Lb. johnsonii*. Wang et al. (2014), quant à eux, ont suggéré que les espèces décrites dans le **Tableau 15** sont les plus prédominantes mais les mêmes auteurs font aussi référence à d'autres populations secondaires comme *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. brevis* et *Lb. gasseri*.

1.2. Détermination de la proximité génétique des lactobacilles par *Random Amplified Polymorphic DNA*

Après identification par spectrométrie de masse, les isolats ont été analysés par la méthode RAPD-PCR afin d'éliminer les doublons potentiellement présents dans les collections de *Lb. reuteri* (32 isolats) et *Lb. salivarius* (30 isolats). L'amorce M13 [5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'] a été utilisée pour établir cette proximité génétique. Comme indiqué dans la **Figure 28**, différents profils et empreintes de bandes sont redondants dans le gel comme par exemple les isolats S5.3, et S5.7. Dans cette configuration, les souches sont groupées par similitude des bandes d'ADN, permettant de générer un arbre phylogénétique représenté dans la **Figure 29**. Les souches sont ainsi classées selon leur distance génétique, permettant de mettre en évidence 14 souches *Lb. reuteri* présentant des profils d'amplification différents.

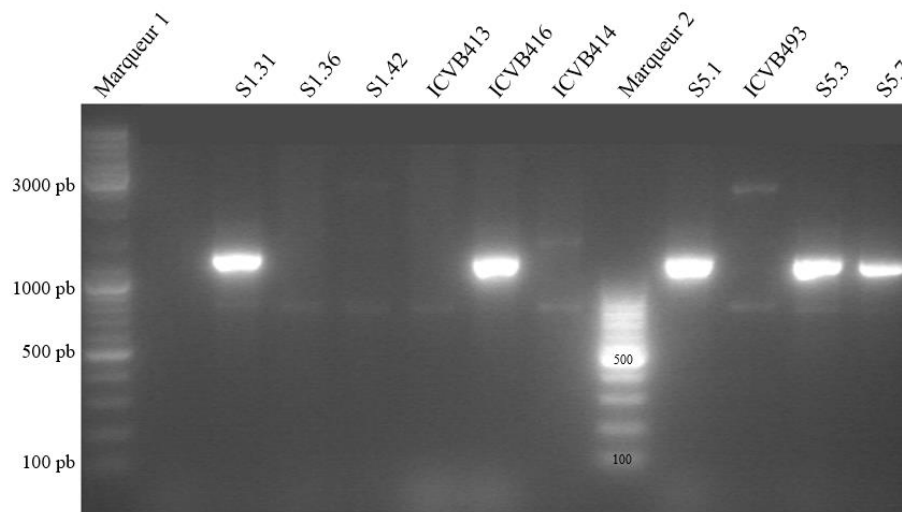


Figure 28. Electrophorèse sur gel d'agarose montrant les profils d'amplification PCR-RAPD pour 10 souches de *Lactobacillus reuteri*. L'ADN des souches a été extrait par le kit Wizard® (Genomic DNA purification Kit, Promega, Madison, USA) et amplifié par l'amorce 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'. Les marqueurs utilisés sont le O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix qui montre bandes entre 100 et 10000 pb (marqueur d'ADN 1) et le O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix qui montre bandes entre 100 et 1000 pb (marqueur d'ADN 2).

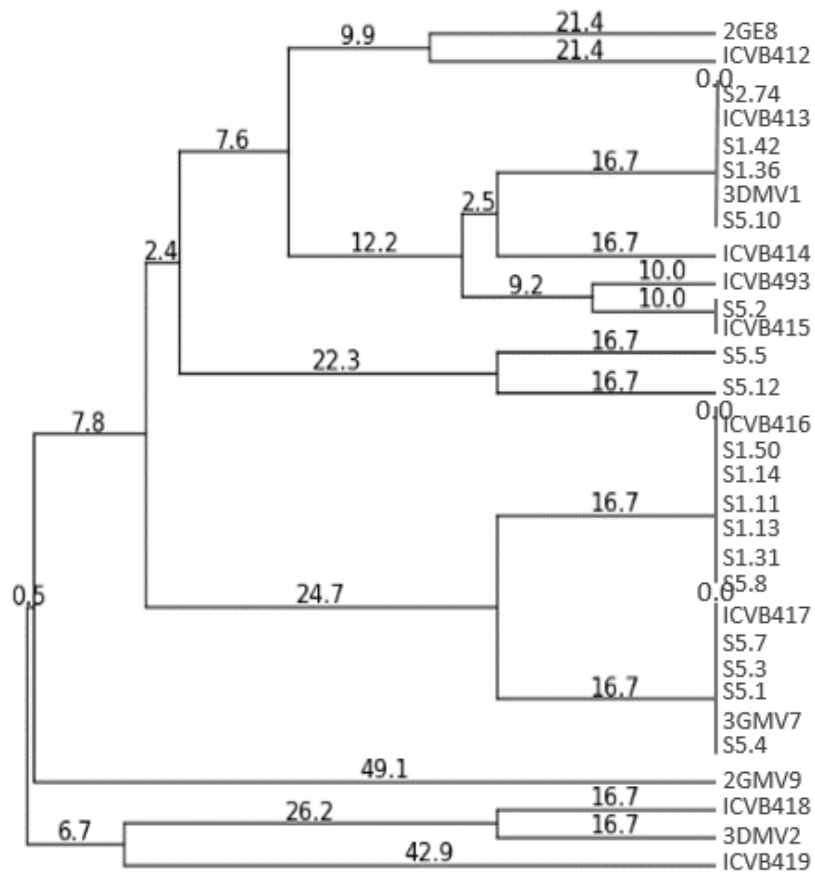


Figure 29. Arbre phylogénétique généré à partir de l'analyse des amplicons de la PCR-RAPD obtenus à partir des souches *Lactobacillus reuteri* en utilisant le logiciel PyElph 1.4. Les distances génétiques sont affichées sur les branches.

Comme indiqué dans les **Figures 30** et **31**, le schéma des bandes chez *Lb. salivarius* présente plus de variabilité que *Lb. reuteri* aboutissant ainsi à une collection de 28 souches différentes.

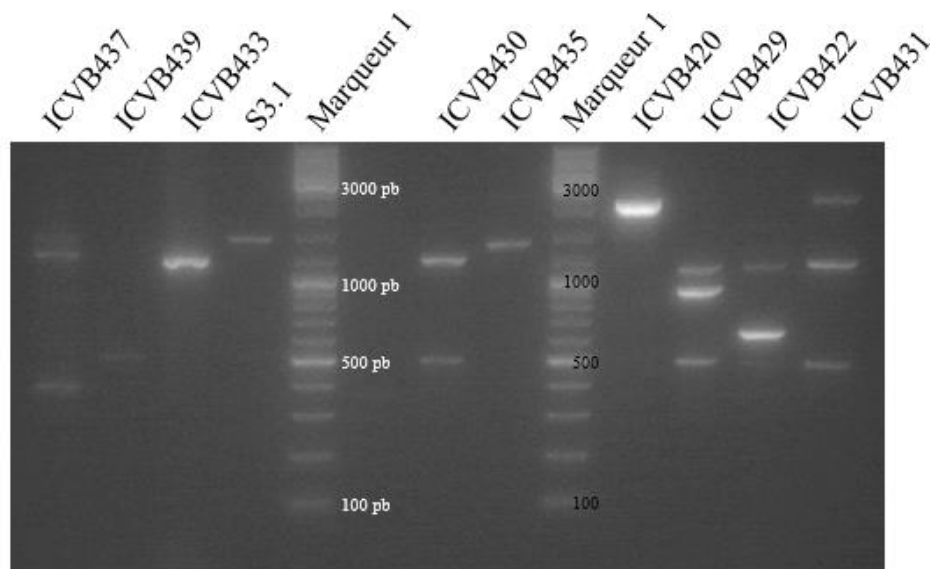


Figure 30. Electrophorèse sur gel d'agarose montrant les profils d'amplification PCR-RAPD pour 10 souches de *Lactobacillus salivarius*. La méthodologie est la même que celle décrite pour *Lb. reuteri*. Les marqueurs utilisés sont le O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix qui montre les bandes entre 100 et 10000 pb (marqueur 1)

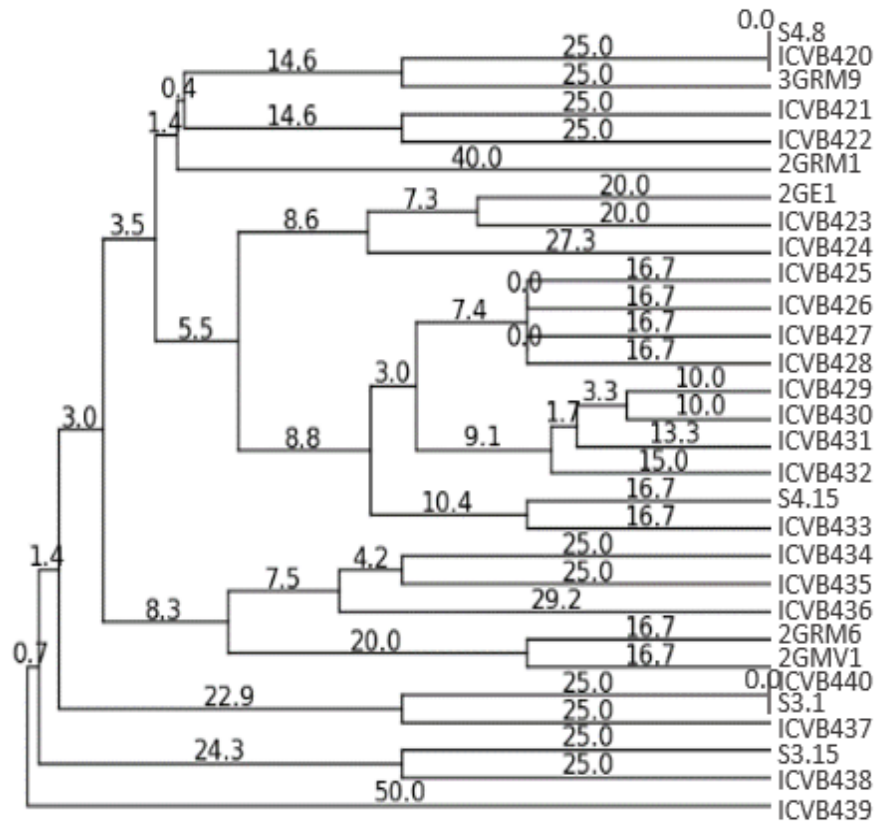


Figure 31. Arbre phylogénétique généré à partir de l’analyse des amplicons de RAPD-PCR obtenus à partir des souches *Lactobacillus salivarius* en utilisant le logiciel PyElph 1.4. Les valeurs sur les branches représentent les distances entre les groupes.

Après analyse phylogénétique, il a été constaté que dans notre échantillon de souches, il y a finalement 14 souches différentes de *Lb. reuteri* et 28 souches de *Lb. salivarius*. Les résultats obtenus sont en concordance avec ceux obtenus par Messaoudi et al. (2011); Stanley et al., (2015) et Wang et al. (2014c) (Tableau 15).

Tableau 15. Etudes montrant les bactéries lactiques prédominant dans les caeca de poulets.

		Résultats obtenus	Messaoudi et al. (2011)	Wang et al. (2014)	Stanley et al. (2015)
PREDOMINANCE	+	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sakei</i>	<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. crispatus</i>
	↓	<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. johnsonii</i>
		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	<i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Lb. salivarius</i>
		<i>Streptococcus alactolyticus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. aviarius</i>	<i>Lb. reuteri</i>
		<i>Lb. gallinarum</i>	<i>Weissella spp.</i>	<i>Lb. crispatus</i>	
		<i>Lb. gasseri</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. acidophilus</i>	
		<i>Lb. johnsonii</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>Lb. kefiranofaciens</i>	
	-	<i>Lb. antri</i>		<i>Lb. delbrueckii</i>	

Les souches récurrentes dans les différentes études citées ci-dessus sont *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii* et *Streptococcus spp.* Avec une prévalence différente d'une étude à une autre. Ces différences peuvent être expliquées par les méthodes de traitement des échantillons et les méthodes de leur identification. En effet, les techniques de microbiologie classique ne permettent pas d'identifier la majorité des microorganismes (**Rappé et Giovannoni, 2003**). Les données bibliographiques indiquent que les méthodes cultures-dépendantes permettent de mettre en évidence uniquement entre 10 et 60% des bactéries du caecum (**Zhu et al., 2002a**). Donc, l'utilisation de nouvelles techniques comme la NGS pour des analyses métagénomiques pourront donner plus d'informations sur les populations trouvées dans les caeca de poulets.

2. Activité anti-*Clostridium perfringens*

Durant nos travaux, nous nous sommes concentrés plus particulièrement sur la sélection des BL ayant une activité anti-*C. perfringens*, un pathogène récurrent chez les poulets. Pour cela, une pré-sélection des souches a été réalisée à la lumière des résultats obtenus durant les tests d'activités antibactériennes. Les souches cibles choisies pour ce test sont une souche de référence, *C. perfringens* DSM 756 et une souche isolée de poulet malade provenant de l'ANSES, *C. perfringens* Clin 1.

Deux techniques ont été mises en œuvre incluant la culture brute des souches en milieu solide (slab) ou liquide (test des puits en gélose molle) car les métabolites synthétisés dans ces 2 conditions peuvent être différents. Dans un deuxième temps, les surnageants de culture ont été neutralisés pour éliminer l'effet de l'acide (facteur pH) par addition de d'hydroxyde de sodium (NaOH, 3M). Cette étude a été complétée par une analyse moléculaire. En effet, l'absence d'activité visible ne signifie pas pour autant l'absence de gènes codant des substances antibactériennes.

2.1. Activité antimicrobienne en *slabs*

L'activité anti-*C. perfringens* a été recherchée en utilisant les tests en *slabs* après culture des souches antagonistes pendant 20 h sur milieu MRS gélosé à 37°C. Les résultats (largeur du halo d'inhibition) sont présentés dans le **Tableau 16** pour *C. perfringens* DSM756, et dans le **Tableau 17** pour *C. perfringens* ANSES Clin 1.

87% des isolats testés présentent une activité antimicrobienne moyenne (++ = halo d'inhibition entre 2.1-4 mm) contre la souche de référence *C. perfringens* DSM756.

Lb. salivarius ICVB423 est la souche présentant la valeur d'activité la plus haute obtenue durant ce test.

C. perfringens ANSES Clin 1 a été choisi comme cible notamment pour son origine clinique. Cette bactérie a été isolée d'un poulet atteint d'entérite nécrotique. Les zones d'inhibition observées avec *C. perfringens* ANSES Clin 1 sont généralement plus petites (+ = 1-2 mm) et le nombre de souches actives est plus faible si on compare aux résultats observés avec la souche de *Clostridium* de collection. *Lb. reuteri* ICVB412 est une des souches qui présente l'activité la plus forte avec une zone d'inhibition comprise entre 4.1 et 7 mm. Ces données montrent que globalement la souche

de *C. perfringens* Clin 1 est moins sensible à l'inhibition induite par les souches de BL que nous avons isolé.

Tableau 16. Activités anti-*Clostridium perfringens* DSM756 des bactéries lactiques.

Niveau d'activité	Espèce	Nombre	Souches
-	<i>Lb. reuteri</i>	2	ICVB413, 3DMV2
	<i>Lb. salivarius</i>	0	-
	Autres	0	-
+	<i>Lb. reuteri</i>	1	ICVB493
	<i>Lb. salivarius</i>	0	-
	Autres	1	<i>Lb. gasseri</i> SE.3
++	<i>Lb. reuteri</i>	11	2GE8, ICVB412, ICVB414, S5.5, ICVB415, S5.12, ICVB416, ICVB417, ICVB418, ICVB419, 2GMV9
	<i>Lb. salivarius</i>	27	ICVB420, 3GRM9, ICVB421, ICVB422, 2GRM1, 2GE1, ICVB424, ICVB425, ICVB426, ICVB427, ICVB428, ICVB429, ICVB430, ICVB431, ICVB432, S4.15, ICVB433, ICVB434, ICVB435, ICVB436, 2GRM6, 2GMV1, ICVB437, S3.15, ICVB438, ICVB439, ICVB440
	Autres	6	<i>Lb. gallinarum</i> SE.2, <i>St. alactolyticus</i> SE.1 <i>St. alactolyticus</i> 3DE6, <i>St. lutetiensis</i> S4.18, <i>Lb. johnsonii</i> SE.4 et <i>Lb. antri</i> ICVB441.
+++	<i>Lb. reuteri</i>	0	-
	<i>Lb. salivarius</i>	1	ICVB423
	Autres	0	-

Légende. - : absence de halo, + : halo de taille entre 1-2mm ; ++ entre 2.1-4 mm ; et +++ entre 4.1-7 mm)

Tableau 17. Activités anti-*Clostridium perfringens* ANSES Clin1.

Niveau d'activité	Espèce	Nombre	Souches
-	<i>Lb. reuteri</i>	1	3DMV2
	<i>Lb. salivarius</i>	0	-
	Autres	0	-
+	<i>Lb. reuteri</i>	6	2GE8, ICVB413, ICVB414, ICVB418, ICVB419, 3GMV7
	<i>Lb. salivarius</i>	8	ICVB422, 2GRM1, ICVB425, ICVB426, ICVB427, ICVB429, ICVB436, 2GMV1
	Autres	7	<i>Lb. gasseri</i> SE.3, <i>Lb. gallinarum</i> SE.2, <i>St. alactolyticus</i> SE.1 <i>St. alactolyticus</i> 3DE6, <i>St. lutetiensis</i> S4.18, <i>Lb. johnsonii</i> SE.4 et <i>Lb. antri</i> ICVB441
++	<i>Lb. reuteri</i>	6	S5.5, ICVB415, S5.12, ICVB416, ICVB417, ICVB493
	<i>Lb. salivarius</i>	20	ICVB420, 3GRM9, ICVB421, 2GE1, ICVB423, ICVB424, ICVB428, ICVB430, ICVB431, ICVB432, S4.15, ICVB433, ICVB434, ICVB435, 2GRM6, ICVB437, S3.15, ICVB438, ICVB439, ICVB440
	Autres	0	-
+++	<i>Lb. reuteri</i>	1	ICVB412
	<i>Lb. salivarius</i>	0	-
	Autres	0	-

Légende. - : absence de halo, + : halo de taille entre 1-2 mm ; ++ entre 2.1-4 mm ; et +++ entre 4.1-7 mm)

Si le milieu solide peut induire une synthèse de composés non exprimée en milieu liquide, le test en slabs ne permet de visualiser qu'une activité antimicrobienne globale couplant l'effet des acides organiques et celui des autres molécules potentiellement produites. La diminution du pH lié à la production d'acide lactique est largement décrite (Murry et al., 2004). Certaines espèces produisent des peptides antimicrobiens, plus particulièrement des bactériocines comme la nisine (Garde et al., 2014), des entérocinés (Caly et al., 2017) ou des pédiocines. D'autres molécules

comme la reutérine (**Garde et al., 2014**), ou le peroxyde d'hydrogène (**Kizerwetter-Świda et Binek, 2016**) sont également produites et sont actives contre *C. perfringens*.

Afin d'étudier séparément les mécanismes d'inhibition dus à la synthèse d'acide(s) organique(s) et à la synthèse de composés comme les bactériocines, nous avons recherché l'activité anti *Clostridium* à partir de surnageants de culture par la technique en puits en gélose aussi appelé *Agar Diffusion Test*.

2.2. Activité antimicrobienne des surnageants neutralisés et filtrés

Parmi les 70 isolats cultivés, seul le surnageant neutralisé de la souche témoin *Ent. faecalis* DD14 a montré une activité sur les souches cibles de *C. perfringens* DSM 756 et ANSES Clin1.

La neutralisation peut avoir introduit un biais de manipulation car certaines bactériocines ne sont actives qu'en milieu acide, comme par exemple la nisine qui a son pH optimal à pH 2 (**Tan et al., 2015**) et perd son activité à un pH supérieur à 7 (**Juncioni de Arauz et al., 2009**). D'autre part, la filtration stérilisante qui suit la neutralisation peut avoir réduit la quantité de bactériocine en deçà de la concentration minimale inhibitrice. En effet, certaines bactériocines présentent des régions hydrophobes qui peuvent provoquer une adsorption de la molécule sur la membrane de filtration (**Drider et al., 2006 ; Elayaraja et al., 2014; Joosten et Nuñez, 1995**).

Afin d'exclure une absence d'activité en raison d'une concentration trop faible de molécules actives, nous avons réalisé une culture sur milieu Elliker puis concentré le surnageant 10 fois sous vide par l'utilisation d'une centrifugeuse (miVac Quattro, Genevac™ SP Scientific, Ipswich, UK), à une température de 40°C. Le surnageant concentré neutralisé ne présente pas non plus d'activité anti-*C. perfringens*. Le milieu de culture a une grande influence sur la production de bactériocines (**Todorov et al., 2000**), et le milieu Elliker est peut-être trop riche pour favoriser la synthèse des bactériocines. Cependant, le milieu MRS ne peut être concentré dix fois, du fait de la présence de tween 80, inhibiteur de la croissance de *C. perfringens* lorsqu'il est concentré en dehors de toute production d'antibactérien par la souche antagoniste. La synthèse étant liée aux conditions environnementales, nous avons donc recherché la présence de gènes de structure codant pour des bactériocines.

2.3. Détection moléculaire des métabolites antibactériens

Dans les expériences précédentes, la production de bactériocines a été recherchée après culture des souches en bouillon MRS ou Elliker pendant 24h à 37°C. Cependant, même si les activités biologiques n’ont pas été retrouvées, on ne peut pas exclure une synthèse de ces molécules *in vivo* si les gènes sont présents.

La recherche de gènes de bactériocines a été réalisée sur les souches de *Lb. salivarius* et de *Lb. reuteri*. Pour rechercher les gènes de synthèse de ces molécules, des amorces permettant l’amplification des déterminants génétiques ont été utilisées. Les séquences sont décrites dans le **Tableau 18**.

Tableau 18. Amorces utilisées la recherche des gènes codant les bactériocines.

	Forward primer (5’-3’)	Reverse primer (5’-3’)	Reference
Salivaricine	AATGGTGGTAAAAATGGTTATGG	TTAACGGCAACTTGTA AAAAC CA	Macwana et Muriana (2012)
Reutérine	GC[A/G]GC[C/T]TT[G/C]ATATCT[G/T] [G/C]AACCAT	GC[A/C]TA[C/T]GC[A/T]GAA A CCATTTTCAGTTTA	Cadieux et al. (2008)

Pour les ADN des souches de *Lb. salivarius*, la taille attendue des amplicons était de 150pb. Aucune souche ne présentait le gène de la salivaricine. Certaines souches de *Lb. salivarius* peuvent produire des salivaricines du type ABP-118 (Abp118 α et Abp118 β), CLR 1328 (Sala et Sal β), P (Sln1 et Sln2) et T (SalT α et SalT β) (Collins et al., 2017). Toutes ces molécules sont de type II sous-classe b (bactériocines à deux composantes), cependant, aucune des salivaricines synthétisées par des souches de *Lactobacillus* n’a présenté d’activité anti-*Clostridium*. Par contre, les salivaricines produites par *Lb. salivarius* sont actives contre *Listeria*, *Campylobacter*, *Pseudomonas* ou *Staphylococcus* (Barrett et al., 2007; Stern et al., 2006; Therdtatha et al., 2016). Il existe toutefois des salivaricines, produites par *Streptococcus salivarius* (salivaricine D), qui présentent des activités contre différentes espèces de *Clostridium* (Birri et al., 2012).

Les bactériocines peuvent être synthétisées de façon constitutive ou être produites d’une façon conditionnelle contrôlée, par exemple, par le QS (Blanchard et al., 2016). Le QS est une méthode de communication utilisée par les bactéries pour coordonner une réponse au sein d’une population. Chez *Lb. pantarum* C11, *Lb. sakei* LTH673 ou *Lb. pentosus* 31-1, la production de bactériocines

est régulée par QS (**Risøen et al., 2000; Zhang et al., 2012**). Un autre facteur qui améliore la production de bactériocines est la compétition, leur production va d'un côté permettre l'invasion d'une souche dans une communauté microbienne établie, ou d'un autre côté, jouer un rôle défensif et interdire l'invasion d'autres souches ou espèces dans une niche occupée (**Riley, 2009**). Les bactériocines sont destinées à nuire aux cellules qui sont étroitement liées au producteur et à le concurrencer pour les mêmes ressources. Cependant, dans le biofilm, lorsque les producteurs interagissent, la bactériocine de l'un peut non seulement nuire à l'autre, mais aussi servir à déclencher sa production de bactériocine, armant ainsi le concurrent pour une contre-attaque (**Majeed et al., 2013**).

En ce qui concerne les souches de *Lb. reuteri*, les gènes codant la reutéline ont été mis en évidence par l'utilisation d'amorces dégénérées décrites par Cadieux et al. (**2008**) et données dans le tableau 18. Les résultats obtenus figurent dans la **Figure 32**. Les 14 souches de *Lb. reuteri* ont été testées par amplification PCR pour la recherche du gène permettant la production de reutéline. Seuls *Lb. reuteri*, ICVB412 et ICVB414 présentaient le fragment ayant la taille attendue de 728 pb. L'amplification et le séquençage de cette région, après une recherche par alignement sur BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), a permis de confirmer que l'amplicon fait partie de la sous-unité majeure de l'enzyme Gld qui déshydrate le glycérol en aldéhyde durant le processus de production de la reutéline.

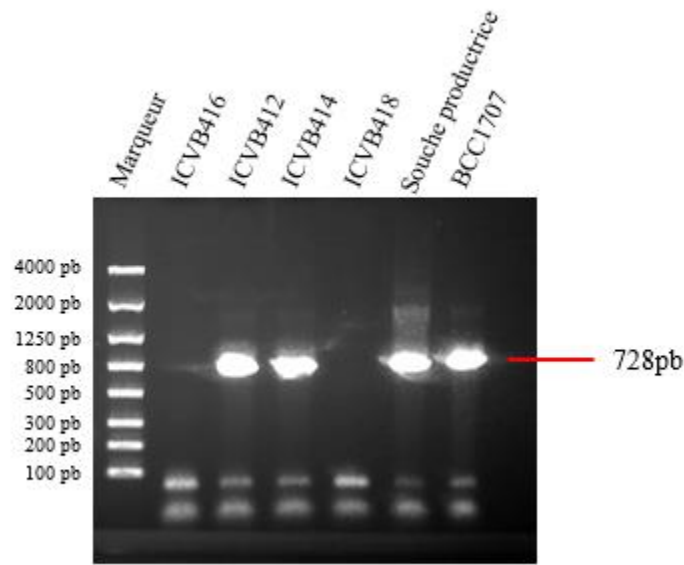


Figure 32. Détection du fragment du gène *gldC* par PCR. Les produits PCR utilisant les souches indiquées dans chacune des pistes ont été analysés dans un gel d'agarose à 1 %. FlashGel® DNA marker 100 – 4 000pb est utilisé pour la détermination de la taille du fragment. Les témoins utilisés sont souches de *Lb. reuteri* productrices de reutélerine (souche de collection privée de l'Université Laval- Canada, et *Lb. reuteri* BCC1707 de la collection de Lesaffre).

La reutélerine est un puissant agent antimicrobien actif contre les bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif, ainsi que contre les levures, les moisissures et les protozoaires (Axelsson et al., 1989). Elle est notamment active contre les pathogènes *E. coli*, *C. perfringens*, *Salmonella*, *C. difficile*, *Listeria* entre autres (Cleusix et al., 2007; Garde et al., 2014; Mu et al., 2018). La reutélerine est un sous-produit de la fermentation du glycérol et consiste en des formes hydratées, non hydratées et dimériques du 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA)(Axelsson et al., 1989). Elle est soluble dans l'eau, active à divers pH et résistante aux protéases et aux lipases (Garde et al., 2014). Deux mécanismes d'action de la reutélerine ont été décrits. Schaefer et al. (2010) suggèrent le rôle du stress oxydatif dans le mécanisme d'action de la reutélerine. Ce stress oxydatif est induit chez les microorganismes par interaction de groupes thiols dans les protéines. La deuxième hypothèse est le blocage de l'enzyme ribonucléide réductase en agissant comme un inhibiteur compétitif, impliquant l'impossibilité de la synthèse de l'ADN (Cleusix et al., 2007; Rasch, 2002).

L'intérêt de souches productrices de reutélerine réside dans l'absence de résistance développée contre la reutélerine sauf chez les lactobacilles (Mu et al., 2018). Le fait de détecter le gène impliqué dans la voie de synthèse de la reutélerine sans pour autant obtenir de résultats durant les tests

d'activité *in vitro* suggère que les conditions de croissance appliquées ne sont pas adéquates pour la production de ce métabolite.

3. Etude du potentiel probiotique

3.1. Dosage de l'acide lactique produit

Après l'analyse de l'activité anti-*Clostridium* par les méthodes des slabs et celle des puits, nous avons supposé que l'activité était due à la capacité de la souche à produire des acides organiques, notamment l'acide lactique qui est le principal acide organique produit par les lactobacilles selon Tachedjian et al. (2017). Pour vérifier cette hypothèse, l'acide lactique produit par les souches a été quantifié par HPLC après 24 h de culture dans du milieu MRS à 37°C. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 19**. Les dosages ont été réalisés 3 fois et suivis d'une analyse statistique, réalisée par ANOVA à un seul facteur.

La production d'acide lactique par les bactéries lactiques testées est comprise entre 4,65 et 15,4 g/L, et elle est plus importante chez les souches de *Lb. salivarius*. En ce qui concerne *Lb. salivarius*, on distingue 5 groupes significativement différents selon leur niveau de production, *Lb. salivarius* ICVB439, ICVB430, ICVB429, ICVB436 et ICVB423 sont les plus grands producteurs avec 13,00 ; 13,01 ; 13,40 ; 13,90 et 15,42 g/L d'acide lactique produit respectivement (**Tableau 19**). Les moins productrices sont ICVB433, ICVB428 et ICVB426 avec des productions moyennes de 7,41 ; 7,71 et 8,26g/L respectivement.

Pour ce qui est de *Lb. reuteri*, 4 groupes significativement différents selon le niveau de production d'acide lactique ont été déterminés. Parmi eux, les souches les plus productrices sont ICVB418 et ICVB419, avec des valeurs de 12,48 et 13,71g/L, respectivement. Cependant les moins productrices sont S5.12 et ICVB414 avec une production de 5,39 et 5,32 g/L.

La production d'acide lactique est souche-dépendante. Ainsi dans la littérature, il existe des exemples de souches produisant des niveaux variables d'acide lactique parmi les souches probiotiques, allant de 2,97 g/L (Hor et Liang, 2014) ou 6,16 (Vodnar et al., 2010) chez *Lb. casei* ou de 6,08 g/L (Vodnar et al., 2010) à 13,14 g/L (Ait Seddik et al., 2017) pour *Lb. plantarum*. Concernant ces niveaux de production, les souches isolées de *Lb. salivarius* présentent une haute capacité de production d'acide lactique en comparaison avec d'autres *Lactobacillus*.

Dans la bibliographie des souches de lactobacilles hyper-productrices d'acide lactique, qui présentent un intérêt pour l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire, ont été décrites avec des niveaux de production allant de 27,90 à 84,9 g/L (**Bai et al., 2003; Nancib et al., 2015; Orozco et Zuluaga, 2014**).

Motevaseli et al. (**2013**) ont démontré que la synthèse d'acide lactique est importante pour l'effet inhibiteur des lactobacilles plus que le pH seul. L'effet de l'acidité dû à la concentration d'acide lactique génère des inhibitions plus fortes dans la croissance de pathogènes que la même diminution du pH du milieu du à l'HCl (**Wang et al., 2014a**). Ceci est dû au fait que l'acide lactique endommage la membrane cellulaire au niveau des protéines, générant un pH acide à l'intérieur de la cellule ce qui provoque une inhibition des activités enzymatiques et une altération de la structure de l'ADN, remettant ainsi en cause la viabilité cellulaire (**Stanojević-Nikolić et al., 2016; Wang et al., 2015**). En outre, il a été démontré que des pathogènes comme *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* et *L. monocytogenes* pouvaient être complètement inactivées après une exposition de 2h à 0,5% d'acide lactique (**Wang et al., 2015**). Guo et al. (**2017**) ont également montré la capacité de certaines souches de *Lb. fermentum* ou *Lb. acidophilus* à inhiber l' α -toxine de *C. perfringens* par la diminution du pH, qui déstabilise la structure de la toxine. Les souches isolées durant nos travaux, pourraient donc être de bons candidats probiotiques capables de fragiliser l'intégrité membranaire des microorganismes pathogènes et pouvant agir de façon synergique avec d'autres substances antibactériennes (**Alakomi et al., 2005**).

La production d'acide lactique est en parfaite adéquation avec les résultats de l'activité anti-*C. perfringens* ; les souches produisant plus d'acide lactique telles *Lb. salivarius* ICVB423, ICVB429 ou *Lb. reuteri* ICVB412 sont, par ailleurs, les souches présentant la plus forte activité antagoniste. Cependant, les souches produisant moins d'acide lactique telles *Lb. reuteri* ICVB413, *Lb. reuteri* ICVB414 ou *Lb. gasseri* SE.3 se distinguent par une moindre activité antagoniste. Cette corrélation a été déjà rapportée dans la littérature pour d'autres bactéries lactiques actives contre *C. perfringens* (**Golic et al., 2017**) ou *C. difficile* (**Lee et al., 2013; Ratsep et al., 2014**).

Tableau 19. Production d'acide lactique (g/L) par les souches isolées des caeca après incubation pendant 20 h dans le milieu MRS à 37°C. Quantification par HPLC en utilisant la méthode isocratique (Eluant: 0.05% H₃PO₄).

<i>Lb. reuteri</i>		<i>Lb. salivarius</i>				Autres	
ICVB419	13,71 ± 0,98	ICVB423	15,42 ± 1,43	2GRM6	11,17 ± 1,65	<i>Lb. antri</i> ICVB441	6,99 ± 0,70
ICVB418	12,48 ± 2,10	ICVB436	13,90 ± 0,86	S4.15	10,18 ± 0,85	<i>Lb. johnsonii</i> SE 4	9,67 ± 1,38
ICVB415	10,00 ± 0,38	ICVB429	13,39 ± 0,42	ICVB437	10,11 ± 1,44	<i>Lb. gallinarum</i> SE.2	7,58 ± 0,86
2GMV9	9,79 ± 0,51	ICVB430	13,02 ± 2,76	ICVB425	10,10 ± 0,91	<i>Lb. gasseri</i> SE.3	6,91 ± 1,24
ICVB493	9,47 ± 0,31	ICVB439	13,00 ± 0,85	ICVB435	9,85 ± 2,24	<i>Strep. alactolyticus</i> 3DE6	8,16 ± 2,01
ICVB417	8,16 ± 0,41	ICVB431	12,88 ± 1,31	ICVB422	9,82 ± 0,75	<i>Strep. alactolyticus</i> SE 1	8,35 ± 1,07
ICVB412	7,63 ± 1,03	ICVB440	12,87 ± 0,36	ICVB432	9,62 ± 0,10	<i>Strep. lutetiensis</i> S4 18	4,65 ± 0,70
3DMV2	7,62 ± 0,49	2GE1	12,86 ± 2,11	ICVB420	9,20 ± 2,10		
2GE8	7,26 ± 0,72	2GMV1	12,23 ± 1,07	ICVB438	8,91 ± 1,70		
ICVB416	6,91 ± 0,61	ICVB434	11,85 ± 2,97	S3.15	8,74 ± 0,86		
S5.5	6,68 ± 0,62	ICVB424	11,55 ± 0,33	ICVB427	8,64 ± 2,16		
ICVB413	5,49 ± 0,31	ICVB421	11,30 ± 2,02	ICVB426	8,26 ± 0,87		
S5.12	5,39 ± 0,30	2GRM1	11,25 ± 3,32	ICVB428	7,71 ± 0,57		
ICVB414	5,32 ± 0,26	3GRM9	11,20 ± 2,13	ICVB433	7,41 ± 0,38		

3.2. Formation de biofilms par les bactéries lactiques isolées

Le terme biofilm est utilisé pour décrire une communauté structurée de cellules bactériennes enfermées dans une matrice polymérique autoproduite adhérente à une surface inerte ou vivante (Costerton, 1999). La formation de biofilm a été étudiée car les souches probiotiques qui sont capables de former un biofilm offrent un moyen prometteur de contrecarrer l'établissement de biofilms pathogènes (Salas-Jara et al., 2016).

Les souches incubées en plaques pendant 24 h à 37°C en anaérobiose ont été traitées pour déterminer indirectement la formation de biofilm par la mesure de la DO à 600 nm. Après une analyse statistique ANOVA, les résultats obtenus montrent qu'au sein de *Lb. reuteri*, les souches sont regroupées en 8 groupes significativement différents, et en 9 groupes chez *Lb. salivarius* (Tableau 20).

Les souches ne présentent pas toutes le même degré d'adhésion au polystyrène. Les souches les plus performantes dans la formation de biofilms sont *Lb. salivarius* ICVB430, ICVB423 et ICVB421, avec des absorbances mesurées à 600nm de 4,00 ; 3,38 et 2,17, respectivement. Pour ce qui est de *Lb. reuteri*, les souches ICVB412, ICVB417 et ICVB416 sont les plus performantes dans la formation de biofilms avec des absorbances respectives de 2,19 ; 1,673 et 1,64. En comparant les moyennes entre espèces, *Lb. reuteri* présente des valeurs plus basses que *Lb. salivarius*, ce qui correspond aux données publiées par Raftis et al. (2011) et Tannock et al. (2005) qui ont noté que *Lb. salivarius* UCC118 a formé des biofilms plus importants que ceux formés par *Lb. reuteri* 100-23.

Les valeurs obtenues chez *Lb. reuteri* sont comparables à celles retrouvés par Jones et Versalovic (2009), avec des DO_{560nm} mesurées allant de 1 à 4. Dans une autre étude, *Lb. reuteri* CRL 1324, connu pour sa capacité de former de biofilm présente une DO_{570nm} de 1,5 quand elle est cultivé sur MRS tween (Leccese Terraf et al., 2012).

Concernant la capacité des souches de bactéries lactiques à former des biofilms, il y a une grande variabilité entre les souches. Comme Jones et Versalovic (2009) le suggèrent, la formation de biofilms est souche-dépendante. En outre Gómez et al. (2016); Pérez Ibarreche et al. (2014) ont démontré que les souches de lactobacilles ayant la capacité de former des biofilms sont capables de diminuer la colonisation de pathogènes comme *Listeria* ou *Salmonella* en conditions *in vitro*. Par ailleurs, les bactéries lactiques probiotiques dans les communautés de type biofilm peuvent être essentielles (i) pour favoriser la persistance de ces souches bénéfiques, permettant ainsi l'expression

de leurs propriétés probiotiques, (ii) pour un remodelage de la composition et de la fonction du microbiome intestinal par la compétition pour les nutriments pour les récepteurs et les sites de fixation ; la production de substrats de croissance ou d'inhibiteurs comme les bactériocines; et la modulation de l'immunité intestinale. Son effet probiotique est renforcé dans les situations de dysbiose, renversant cette situation et rétablissant une flore normale (**Jones et Versalovic, 2009; O'Toole et Cooney, 2008**).

Tableau 20. Formation de biofilms par les bactéries lactiques. Mesure par spectrométrie à une absorbance de 600nm (DO_{600nm}).

<i>Lb. reuteri</i>		<i>Lb. salivarius</i>				Autres	
ICVB412	2,19 ± 0,11 ^a	ICVB430	4,00 ± 0,01 ^A	2GMV1	0,66 ± 0,09	<i>Lb. antri</i> ICVB441	1,11 ± 0,38
ICVB417	1,67 ± 0,08 ^b	ICVB423	3,38 ± 0,39 ^B	S4.15	0,66 ± 0,07	<i>Lb. johnsonii</i> SE 4	0,31 ± 0,02
ICVB416	1,64 ± 0,18 ^b	ICVB421	2,17 ± 0,20 ^C	ICVB434	0,65 ± 0,15	<i>Lb. gallinarum</i> SE.2	0,61 ± 0,14
S5.12	1,14 ± 0,09 ^c	ICVB433	1,12 ± 0,07 ^D	ICVB420	0,64 ± 0,04	<i>Lb. gasseri</i> SE.3	0,37 ± 0,09
ICVB413	0,99 ± 0,07 ^d	ICVB429	0,96 ± 0,20	S3.15	0,62 ± 0,16	<i>Strep. alactolyticus</i> 3DE6	0,93 ± 0,20
ICVB414	0,95 ± 0,06 ^d	ICVB437	0,90 ± 0,14	ICVB427	0,61 ± 0,12	<i>Strep. alactolyticus</i> SE 1	0,38 ± 0,03
ICVB493	0,83 ± 0,06 ^e	ICVB422	0,83 ± 0,06	ICVB432	0,56 ± 0,03	<i>Strep. lutetiensis</i> S4 18	0,42 ± 0,01
3DMV2	0,80 ± 0,07 ^e	ICVB424	0,77 ± 0,07	ICVB440	0,44 ± 0,04		
2GE8	0,68 ± 0,07 ^f	2GRM1	0,77 ± 0,21	ICVB438	0,44 ± 0,04		
2GMV9	0,37 ± 0,03 ^g	ICVB435	0,77 ± 0,35	ICVB439	0,41 ± 0,02		
ICVB418	0,37 ± 0,10 ^g	3GRM9	0,73 ± 0,07	ICVB426	0,36 ± 0,07		
S5.5	0,31 ± 0,04 ^h	ICVB431	0,71 ± 0,07	ICVB436	0,35 ± 0,05		
ICVB415	0,31 ± 0,03 ^h	ICVB428	0,66 ± 0,04	2GE1	0,27 ± 0,03		
ICVB419	0,27 ± 0,03 ^h	2GRM6	0,66 ± 0,10	ICVB425	0,20 ± 0,01		

Récapitulatif de la première sélection de souches

Pour faire une première sélection des souches, la production d'acide lactique (liée à la taille des halos dans le test de *slabs*) et la capacité de formation des biofilms ont été prises en compte. Les 13 souches sélectionnées sont données dans la **Figure 33**.

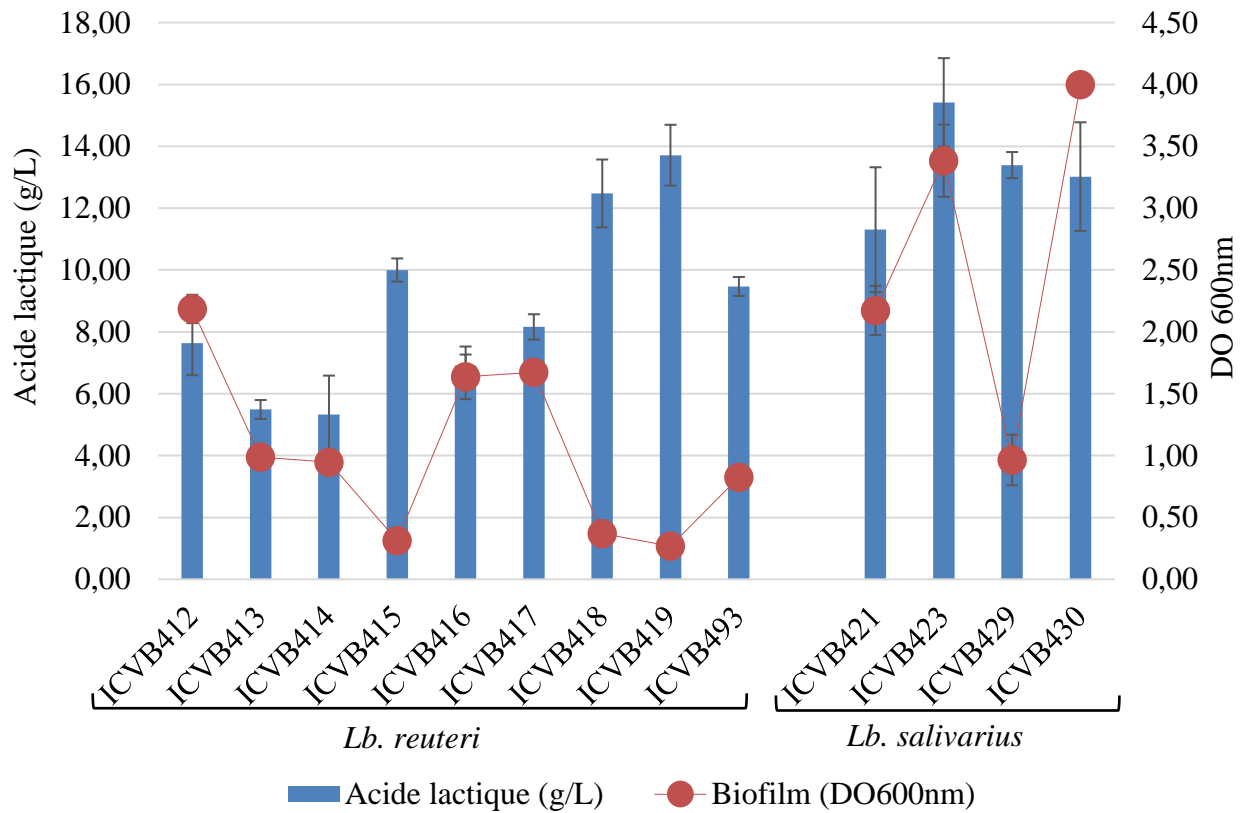


Figure 33. Arbre décisionnel résumant la première sélection des souches isolées.

3.3. Résistance des souches aux conditions gastro-intestinales du poulet

a. Evaluation des conditions expérimentales sur une levure probiotique

Le principal site d'action des probiotiques est l'intestin. Cependant, dans un premier temps, les bactéries probiotiques doivent d'abord survivre au passage par le jabot et le gésier dans des conditions défavorables. Ensuite, les bactéries sont soumises, dans le tractus gastro-intestinal, à l'action des acides et de la bile produits pour digérer les aliments et protéger le corps contre l'invasion d'agents pathogènes potentiels (**Hofmann et Eckmann, 2006**). Un probiotique doit donc être capable de survivre à ces conditions et atteindre en nombre suffisant l'intestin pour qu'il puisse exercer ses effets bénéfiques (**Mainville et al., 2005**).

- **Effet du pH et de la bile sur le taux de survie.**

Le tube digestif aviaire est complexe, dynamique et très différent de celui des mammifères (**Martinez-Haro et al., 2009**). Peu d'articles décrivent les conditions standards pour la simulation du tractus gastro-intestinal du poulet, nous avons utilisé le produit probiotique Actisaf® STD, à base de levures vivantes, commercialisé et actif dans le tractus gastro-intestinal des poulets, comme base de sélection des conditions à tester ultérieurement sur les isolats bactériens. Chaque condition a été testée indépendamment avec un nombre de levures de l'ordre de $2,44 \pm 0,72 \cdot 10^8$ UFC/mL, et chaque expérience a été répétée 3 fois.

Les conditions de pH et le temps d'incubation ont été choisis de façon à simuler les conditions réelles rencontrées au cours du passage à travers tout le tractus gastro-intestinal du poulet. Le pH du jabot, compris entre 4,5 et 6,5, est déterminé principalement par le type d'aliment que l'animal ingère et par le temps de rétention de la nourriture dans cette cavité, car un temps de rétention long impliquerait une fermentation. Lors de nos expériences, le pH a été fixé à 4,5 pendant un temps de 45 min.

Au niveau du gésier, le pH est très variable et peut osciller entre 2 et 4,5 selon la quantité d'aliments, la composition chimique et le temps de rétention de ceux-ci (**Svihus, 2014**). Le temps de rétention dépend de la quantité d'aliment et il est compris entre 1 et 3 h (**Musikasang et al., 2009**). Plusieurs études ont décrit les conditions testées simulant le tractus gastro-intestinal de poulet (**Chang et Chen, 2000; Martinez-Haro et al., 2009; Musikasang et al., 2009**). Nous avons choisi de tester l'influence de ce compartiment pendant 90 min et dans deux conditions de pH, pH 2,6 et pH 3,5, afin de simuler des conditions plus ou moins défavorables.

Le pH dans l'intestin est plus élevé que celui des compartiments précédents avec des valeurs de l'ordre de 6 en raison de la présence de la bile (Svihus, 2014) et de sécrétions de solutions alcalines riches en ions hydrogénocarbonates libérés par le pancréas. Dans nos expériences, ce compartiment a été simulé avec un pH 6,4 pendant 3 h. Au regard des résultats obtenus, les conditions testées pour simuler le gésier montrent qu'un pH de 3,5 pendant 90 min est moins délétère avec un taux de survie (98,1%) que celui obtenu avec un pH 2,6 (96,9%) (**Tableau 21**). Les pourcentages de survie augmentent à mesure que le pH testé augmente.

Tableau 21. Survie des levures (Actisaf) aux différents pHs. Le pourcentage de survie est calculé en base logarithmique.

Compartiment simulé	pH	Temps (min)	UFC/mL	% survie
Solution initial	-	0	$2,44 \pm 0,72 \cdot 10^8$	
Gésier 1	2,6	90	$1,34 \pm 0,41 \cdot 10^8$	96,9
Gésier 2	3,5	90	$1,70 \pm 0,15 \cdot 10^8$	98,1
Jabot	4,5	45	$1,93 \pm 0,36 \cdot 10^8$	98,8
Intestin	6,4	180	$2,23 \pm 0,12 \cdot 10^8$	99,5

Pour simuler le passage dans le gésier, nous avons choisi d'utiliser le pH 3,5 car en présence d'aliments, ce compartiment présente un pH autour de 3. De plus, Bunthof et al. (2001) ont montré que l'exposition à un pH 2,0 affecte la membrane des bactéries lactiques, alors qu'à pH 3,0, la membrane reste intacte.

La bile a été utilisée pour tester les conditions intestinales, car cette sécrétion digestive est déversée dans l'intestin à la fin de l'ilium. La bile joue un rôle majeur dans l'émulsification et la solubilisation des lipides du duodénum. Elle affecte les phospholipides et les protéines des membranes cellulaires en induisant une déstructuration de la membrane et en perturbant l'homéostasie cellulaire bactérienne (Begley et al., 2005; Hofmann et Eckmann, 2006; Svihus, 2014). Comme montre le **Tableau 22**, la survie des levures est affectée dès 0,35% de bile et une perte significative est observée pour 0,70%.

Tableau 22. Survie des levures (Actisaf) à différents pourcentages (%) de bile

Bile	Temps (min)	UFC/mL	% survie
Contrôle	0	$3,95 \pm 0,76 \cdot 10^8$	
0,35%	180	$1,78 \pm 0,38 \cdot 10^8$	96,0
0,70%	180	$9,00 \pm 0,35 \cdot 10^7$	92,5

Les résultats permettent de montrer un effet modéré de la bile sur la survie des levures Actisaf à la concentration supérieure testée.

b. Taux de survie des bactéries dans les conditions gastro-intestinales du poulet

Le taux de survie des bactéries aux conditions gastro-intestinales nous donne des indications précieuses pour la sélection des probiotiques car ces derniers doivent résister :

- aux pH acides, car ils modifient l'équilibre de la cellule en raison d'une augmentation de la concentration des protons intracellulaires (**Hofmann et Eckmann, 2006**) ;
- aux sels biliaires, car il s'agit d'un préalable à la colonisation et au maintien de l'activité métabolique des bactéries probiotiques dans l'intestin grêle de l'hôte (**Strompfová et Lauková, 2007**)

Suite aux résultats obtenus sur la levure Actisaf, les conditions de pH et de pourcentage de bile ont été déterminés comme suit : jabot : pH 4,5 (45 min) ; gésier : pH 3,5 (90 min) ; et l'intestin à pH 6,4 (3h). Afin de se rapprocher des conditions réelles du tractus gastro-intestinal des enzymes ont été également introduites dans le test. L'effet combiné d'une solution de pepsine-pH et de billes en verre (3g) vise à simuler le gésier. La combinaison du pH, de bile et de pancréatine vise quant à elle à simuler les conditions intestinales (**Tableau 23**).

Toutes les souches ont été cultivées pendant 20 h à 37 °C sur MRS. *Ent. faecalis* DD 14, isolée du méconium et productrice d'une bactériocine de classe IIb (**Caly et al., 2017**), et *Lb. rhamnosus* ATCC 7469, ont été utilisées comme témoin de survie. Deux techniques d'estimation de la biomasse ont été utilisées, le dénombrement sur milieu MRS et la cytométrie en flux. Pour ce dernier dénombrement les bactéries marquées par les colorants syto-24 et l'iodure de propidium ont été dénombrées (**Tableau 24**). Les taux de survie ont été calculés selon la formule : (*Log*

population finale/Log population initiale) * 100. Les expériences ont été répétées 3 fois de façon indépendante.

Tableau 23. Conditions expérimentales finales simulant le tractus gastro-intestinal du poulet.

Compartiment simulé	pH	Temps (min)	Enzymes	Bile	Autres
Jabot	4,5	45	-	-	-
Gésier	3,5	90	Pepsine (3mg/mL)	-	Billes 3 mm diam. agitation de 150 rpm
Intestin	6,4	180	Pancréatine (1mg/mL)	0,35%	-

Tableau 24. Survie des bactéries lactiques aux conditions gastro-intestinales du poulet.

		MRS	Cytométrie en flux
<i>Lb. rhamnosus</i>	ATCC 7469	32,29 ± 3,03	80,68 ± 3,23
<i>Ent. Faecalis</i>	DD14	34,35 ± 2,64	77,62 ± 6,77
<i>Lb. salivarius</i>	ICVB421	32,56 ± 3,32	91,67 ± 1,45
	ICVB423	24,01 ± 3,03	86,12 ± 0,41
	ICVB429	57,32 ± 0,71	79,58 ± 1,32
	ICVB430	30,43 ± 4,03	95,05 ± 3,73
<i>Lb. reuteri</i>	ICVB412	51,98 ± 4,13	90,27 ± 0,38
	ICVB413	59,53 ± 0,26	83,88 ± 1,00
	ICVB414	71,60 ± 1,65	78,06 ± 3,00
	ICVB415	46,43 ± 3,40	90,23 ± 0,39
	ICVB416	73,47 ± 0,92	93,34 ± 1,41
	ICVB417	25,83 ± 1,69	84,95 ± 2,16
	ICVB418	46,07 ± 2,21	84,06 ± 1,37
	ICVB419	65,68 ± 1,37	81,92 ± 1,80
	ICVB493	27,05 ± 1,63	85,25 ± 1,49

Valeurs obtenues après dénombrement sur milieu MRS gélosé. La cytométrie a été faite après marquage des cellules par syto-24 et l'iodure de propidium.

Les résultats obtenus par dénombrement sur milieu MRS ont permis de montrer que les conditions drastiques combinant acidité-bile à 0,35 % et les différentes enzymes, induisaient une certaine mortalité des souches testées, même si celles-ci ont été isolées du tractus gastro-intestinal.

Parmi les souches bactériens, la survie dans les conditions gastro-intestinales est une propriété souche dépendante. Cependant, la survie des souches de *Lb. salivarius* dans les conditions testées est de 24,01 à 57,32% sur MRS alors que celle des *Lb. reuteri* varie de 25,83 à 73,47%, ce qui donne des différences significatives ($p=0,0087$) après ANOVA. Ainsi *Lb. reuteri* apparaît comme l'espèce la plus résistante aux conditions testées. Au niveau statistique, *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 a été incluse dans le groupe des *Lb. salivarius* au regard des valeurs similaires de survie.

Les études réalisées testant des conditions d'acide et bile sur *Lb. rhamnosus* Lr32 ou GG ont montré une diminution de la viabilité de 50 à 60% (**Ding et Shah, 2007; Koskenniemi et al., 2011**). Ces résultats correspondent à ce qui a été obtenu lors du dénombrement sur milieu MRS. Selon Musikasang et al. (**2009**), les bactéries lactiques testées pour leur tolérance aux conditions gastro-intestinales du poulet présentent des survies entre 27 et 43%, quand elles sont soumises à du jus gastrique simulé, à pH3 contenant de la pepsine (3mg/mL), et à un environnement intestinal simulé, avec 7% de bile fraîche de poulet à pH 8 et contenant 1mg/mL de pancréatine. Les valeurs obtenues après notre simulation sont supérieures et atteignent des valeurs maximales de 73,41%.

La méthode d'estimation de la survie par dénombrement en milieu gélosé est fastidieuse et ne permet pas de mettre en évidence les cellules viables mais non cultivables (VBNC) qui sont métaboliquement actives mais ont perdu la capacité de se diviser (**Khan et al., 2010**). Pour prendre en compte ces bactéries, la survie a été également déterminée par la méthode de cytométrie en flux qui prend en compte les bactéries viables et les VBNC. Comme attendu, les pourcentages de survie obtenus par cette technique sont nettement supérieurs à ceux trouvés par dénombrement sur MRS pour toutes les souches à l'exception de l'isolat ICVB414. La souche *Lb. reuteri* ICVB414 présente des taux de survie comparables dans les deux méthodes (**71,60** \pm 1,65 et **78,06** \pm 3,00 respectivement sur MRS et en cytométrie). La souche de *Lb. reuteri* ICVB416 et les 2 souches de *Lb. salivarius* ICVB421 et ICVB430 présentent les meilleurs pourcentages de survie (respectivement **93,34** \pm 1,41 ; **91,67** \pm 1,45 et **95,05** \pm 3,73), et ce taux est significativement différent de celui des autres isolats avec une valeur de p de 0,0001.

Ceci peut être dû à la capacité des souches de *Lb. reuteri* à précipiter les sels biliaires par l'action de la BSH (*Bile Salt Hydrolase*) (De Boever et al., 2000). Elle est produite par différentes bactéries du microbiote intestinal. C'est une enzyme qui catalyse la réaction essentielle du métabolisme des acides biliaires dans l'intestin grêle et qui joue un rôle important dans le métabolisme de l'hôte et la récupération d'énergie (Begley et al., 2005; Joyce et al., 2014; Martoni et al., 2015). En effet, la production de la BSH dans l'intestin influence le métabolisme lipidique la malabsorption des lipides, la baisse du taux de cholestérol, etc. chez l'hôte (Begley et al., 2006). Ces effets permettent dans les élevages d'obtenir des animaux avec un contenu bas en LDL-cholestérol (Jin et al., 1998 ; Martoni et al., 2015). Chez les souches de *Lactobacillus*, d'autres mécanismes de résistance à la bile ont été décrits comme un système de pompe, à deux composantes, de transporteurs multi-drugs, ou des changements dans l'architecture ou la composition de la membrane qui se traduisent par un changement de la perméabilité, de la fluidité ou de la charge de la membrane (Begley et al., 2005; Koskenniemi et al., 2011; Ruiz et al., 2013).

3.4. Test d'activité contre différentes souches de *Clostridium*

Le test d'activité par *slabs* a été refait sur 13 différentes souches de *Clostridium*. Le but était de vérifier l'activité anti-*Clostridium* sur un grand nombre de souche cliniques. Le **Tableau 25** montre les moyennes d'activité des lactobacilles contre ces souches de *Clostridium*.

Tableau 25. Halos d'activité produits par Lactobacilles contre *Clostridium*.

Niveau d'activité	Espèce	Nombre	Souches
-	-	0	-
+	<i>Lb. reuteri</i>	0	-
	<i>Lb. salivarius</i>	0	-
++	<i>Lb. reuteri</i>	9	ICVB413, ICVB493, ICVB412, ICVB416 , ICVB415, ICVB417, ICVB414, ICVB418, ICVB419
	<i>Lb. salivarius</i>	1	ICVB429
	Autres	2	<i>Ent. faecalis</i> DD14, <i>Lb. rhamnosus</i> ATCC7469
+++	<i>Lb. reuteri</i>	0	-
	<i>Lb. salivarius</i>	3	ICVB421, ICVB430, ICVB423

Légende. - : absence de halo, + : halo de taille entre 1-2mm ; ++ entre 2.1-4 mm ; et +++ entre 4.1-7 mm)

Les souches plus productrices de halos sont les *Lb. salivarius*, en étant les souches plus antagonistes *Lb. salivarius* ICVB421, ICVB430 et ICVB423.

3.5. Etude des propriétés d'agrégation des souches

La capacité des bactéries à former des agrégats cellulaires est considérée comme une caractéristique positive pour les candidats probiotiques car cette propriété d'agrégation est importante dans la formation de biofilms et la protection de l'hôte contre la colonisation par des agents pathogènes (**Gómez et al., 2016; Vlková et al., 2008**). Les 13 souches sélectionnées ont été testées pour leurs propriétés d'agrégation en termes :

- d'autoagrégation : agrégation entre elles (cellules bactériennes de la même souche)
- de coagrégation : agrégation des candidats probiotiques avec des agents pathogènes intestinaux

a) Mesure de l'autoagrégation des souches

Les pourcentages d'auto agrégation ont été déterminés après 3 h, 6 h et 24 heures d'incubation à 37°C selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes (4.5.2). Les souches *Lb. rhamnosus*

ATCC 7469 et *Ent. faecalis* DD14 ont été choisis comme témoin probiotiques. *Clostridium perfringens* DSM 756, *E. coli* ER184 et *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Newport (ATCC 6962) ont été choisis pour leur statut de pathogènes les plus couramment retrouvés chez le poulet. Les résultats expérimentaux sont donnés ci-dessous dans la **Figure 34**.

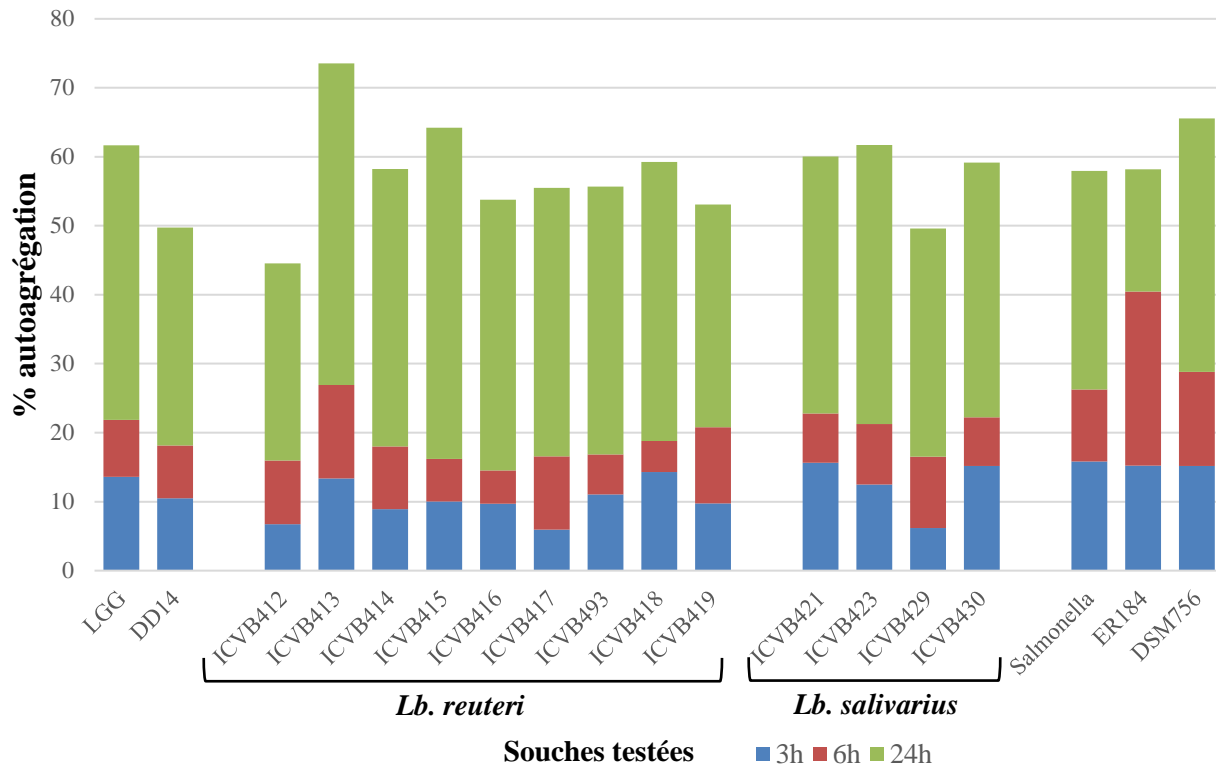


Figure 34. Autoagrégation (%) des souches de bactéries lactiques isolées

Les pourcentages d’autoagrégation des pathogènes se trouvent dans la moyenne des valeurs d’agrégation obtenues, il n’y a pas de différence significative entre l’autoagrégation des souches pathogènes et celle des souches de *Lactobacillus* à 24h, ce qui est comparable aux résultats obtenus par Collado et al. (2007b), et en contradiction avec Tareb et al. (2013) qui trouvent des valeurs d’agrégation des pathogènes à 24 h plus basses que celles des souches de *Lactobacillus*.

Toutes les souches de lactobacilles testées s’autoagrègent dès 3h et présentent des valeurs proches de celles des souches de référence utilisées comme témoin. Les pourcentages d’autoagrégation varient entre 6 et 15%.

Le test ANOVA montre que l'autoagrégation augmente significativement au cours de la période d'incubation ($p < 0.05$) pour atteindre à 24h des valeurs de 50 à 73%. Ces résultats sont comparables avec ceux trouvés par Botha et al. (2012), De Gregorio et al. (2014), Tareb et al. (2013) ou Ait Seddik et al. (2017) et sont plus élevées que celles retrouvées par Abushelaibi et al. (2017) avec *Lb. plantarum* et *Lc. lactis*.

Après une analyse statistique effectuée par ANOVA à un facteur, nous avons constaté qu'il existe des différences significatives parmi les souches. A 24h, l'autoagrégation des souches de *Lb. reuteri* ICVB413 et ICVB418 et les souches de *Lb. salivarius* ICVB423, ICVB430 et ICVB421 atteint des valeurs importantes comprises entre 55,71 et 73,55% statistiquement supérieure à celle des autres souches. Ces valeurs d'autoagrégation suggèrent que ces *Lactobacillus* forment de puissants agrégats, qui peuvent augmenter l'adhésion aux cellules épithéliales. Il a été suggéré que les souches avec une capacité agrégative importante ont plus d'aptitude à adhérer aux cellules intestinales et aux surfaces muqueuses (Collado et al., 2008 ; Taheri et al., 2009) et de former un biofilm (Botha et al., 2012). Ceci permet la colonisation d'environnements où les temps de séjour sont courts comme c'est le cas dans le tractus gastro-intestinal (Gomaa, 2013).

b) Mesure de la coagrégation des souches

Ce test permet de mettre en évidence les souches ayant une capacité d'agrégation avec des pathogènes typiques du tractus gastro-intestinal de la volaille, tels que *Salmonella enterica* serovar. Enterica, *E. coli* ou *C. perfringens*. Des volumes égaux de suspensions de candidat probiotique et de pathogènes, dans du tampon PBS 1x, ont été mélangés ensemble. Les propriétés de coagrégation ont été calculées en fonction de la formule décrite dans la section 4.5.2 de matériel et méthodes. Les résultats obtenus après 3h, 6h et 24h sont reportés dans le **Tableau 26**.

Tableau 26. Coagrégation des souches de *Lactobacillus* avec des agents pathogènes

	<i>Clostridium perfringens</i>			<i>Salmonella</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h
DD14	10,8 ± 0,6	18,5 ± 3,8	51,7 ± 15,2	13,9 ± 1,9	24,3 ± 5,0	47,6 ± 6,2	5,9 ± 3,2	13,4 ± 4,7	62,4 ± 2,0
ATCC 7469	11,5 ± 0,6	18,8 ± 2,9	56,9 ± 5,1	14,7 ± 2,3	22,7 ± 3,0	60,5 ± 4,0	5,9 ± 2,0	12,8 ± 3,5	59,4 ± 2,3
ICVB412	15,3 ± 2,3	26,7 ± 2,2	68,7 ± 11,5	15,7 ± 4,1	23,7 ± 6,9	58,0 ± 8,0	3,2 ± 1,3	8,8 ± 1,9	64,2 ± 7,8
ICVB413	16,4 ± 1,2	27,4 ± 2,0	68,2 ± 0,5	14,5 ± 0,4	19,7 ± 4,2	55,4 ± 6,4	4,9 ± 0,5	14,0 ± 1,3	65,7 ± 3,6
ICVB414	12,5 ± 1,2	23,7 ± 4,8	63,0 ± 4,0	13,8 ± 3,4	20,5 ± 4,2	49,7 ± 3,5	5,4 ± 2,0	10,2 ± 4,0	64,7 ± 4,1
ICVB415	14,6 ± 1,4	23,7 ± 4,0	55,8 ± 3,9	14,1 ± 3,6	20,9 ± 5,2	53,7 ± 0,9	4,7 ± 3,6	11,7 ± 2,4	69,8 ± 0,9
ICVB416	14,7 ± 1,3	23,8 ± 4,6	62,5 ± 5,0	14,1 ± 0,8	21,3 ± 6,4	47,3 ± 7,7	5,5 ± 3,3	16,3 ± 4,8	61,3 ± 3,9
ICVB417	9,7 ± 1,9	19,6 ± 7,2	61,9 ± 10,6	13,7 ± 2,0	21,0 ± 4,0	51,0 ± 4,1	8,2 ± 2,6	10,6 ± 2,9	66,6 ± 0,8
ICVB493	14,9 ± 0,8	23,7 ± 6,0	65,7 ± 2,2	14,9 ± 2,4	23,0 ± 6,3	59,1 ± 8,7	4,0 ± 2,8	9,0 ± 3,2	65,6 ± 9,1
ICVB418	11,7 ± 1,1	18,9 ± 3,7	60,3 ± 4,5	13,4 ± 2,6	20,4 ± 5,4	49,6 ± 4,8	5,5 ± 1,3	12,2 ± 2,7	58,4 ± 4,8
ICVB419	15 ± 1,9	23,8 ± 6,9	56,0 ± 7,0	12,8 ± 2,3	18,9 ± 3,2	43,4 ± 1,8	3,3 ± 0,8	8,0 ± 1,9	54,1 ± 7,5
ICVB421	14,9 ± 1,6	27,9 ± 5,9	66,4 ± 1,5	16,1 ± 2,5	24,9 ± 3,9	67,3 ± 9,3	6,7 ± 0,8	17,6 ± 3,3	67,3 ± 4,0
ICVB423	15,3 ± 1,7	30,9 ± 6,0	65,1 ± 6,4	15,4 ± 3,5	23,6 ± 5,7	56,3 ± 3,2	5,3 ± 0,9	11,5 ± 1,2	57,8 ± 5,7
ICVB429	10,6 ± 1,3	21,9 ± 2,9	59,9 ± 1,3	13,2 ± 3,1	20,6 ± 4,8	51,1 ± 2,8	5,0 ± 3,8	8,1 ± 1,6	55,6 ± 1,3
ICVB430	15,1 ± 1,6	24,0 ± 4,4	61,9 ± 2,0	15,6 ± 3,9	24,2 ± 4,4	60,4 ± 3,7	3,4 ± 2,8	18,5 ± 4,7	70,4 ± 3,0

Tous les candidats probiotiques testés ont montré des capacités d'agrégation avec les pathogènes choisis. Le pourcentage de coagrégation a été démontré comme étant spécifique et dépendant du temps. Selon le test ANOVA, la coagrégation des souches de *Lactobacillus* avec la souche de *Salmonella enterica* ne présente pas de différences significatives ni après 3h ($p=0,9593$) ni après 6 heures ($p=0,9511$). Les résultats obtenus à 24h montrent que les souches qui présentent le pourcentage de coagrégation le plus important avec *Salmonella* sont les souches de *Lb. salivarius* ICVB421, ICVB430 et ICVB423, une souche de *Lb. reuteri* (ICVB493) et la souche témoin *Lb. rhamnosus*.

Il n'y a pas de différences significatives entre les souches de lactobacilles lorsque celles-ci sont co agrégés avec *E. coli* pendant 3h. Les différences commencent à devenir évidentes à partir de 6h pour les souches *Lb. reuteri* ICVB415, *Lb. salivarius* ICVB421 et ICVB430.

La coagrégation avec *C. perfringens* montre des différences entre les souches de lactobacilles dès 3h de contact. Les lactobacilles se répartissent dans 3 groupes significativement différents selon leur comportement. *Lb. reuteri* ICVB412, ICVB413, ICVB415, ICVB416 ICVB419 et ICVB493 et *Lb. salivarius* ICVB421, ICVB421 et ICVB430 appartiennent au groupe qui présente les valeurs les plus élevées avec des pourcentages variant de 14-16%. A 24h, les valeurs minimales de coagrégation avec *C. perfringens* sont celles des souches de référence *Ent. faecalis* DD14 et *Lb. rhamnosus* ATCC7469 et *Lb. reuteri* ICVB419. Les souches de *Lb. reuteri* ICVB413, ICVB412 et ICVB493 et *Lb salivarius* ICVB421 présentent les pourcentages les plus importants avec 68,7 ; 68,2; 65,7; et 66,4% respectivement. Au regard des pathogènes testés, les pourcentages de coagrégation sont les plus importants quand la coagrégation se fait avec *C. perfringens* comme l'on également montré Kizerwetter-Świda et Binek (2016).

Si les capacités agrégatives et coagrégatives sont analysées ensemble, seule la souche *Lb. salivarius* ICVB421 présente de hautes valeurs avec les trois souches pathogènes. Néanmoins, Taheri et al. (2009) ont suggéré qu'il n'y avait pas de corrélation entre les résultats d'auto et de coagrégation : une souche qui présente une haute autoagrégation n'a pas obligatoirement la capacité à coagrégé de façon importante. Cet effet peut être dû à un effet spécifique à chaque souche.

Les valeurs hautes d'agrégation se traduisent par une plus grande capacité à créer une barrière protectrice contre les agents pathogènes en se liant au mucus, aux cellules épithéliales, en coagrégant avec la flore commensale de l'intestin ou avec les pathogènes empêchant ceux-ci de

coloniser la surface intestinale (Collado et al., 2007a; Goh et Klaenhammer, 2010; Shen et al., 2005).

Par conséquent, la coagrégation peut s'apparenter à un mécanisme de défense contre les infections dans le tractus gastro-intestinal (Gomaa, 2013). Quand ces interactions sont présentes, il n'est pas possible de déplacer de façon compétitive les organismes déjà présents dans l'agrégat en ajoutant d'autres organismes, ce qui suggère des interactions étroites et/ou des interactions multiples (O'Toole et al., 2000).

Le phénomène d'agrégation chez les lactobacilles est le résultat d'interactions complexes entre les composants à la surface des cellules, tels que les protéines, les glycoprotéines, les acides téichoïques ou lipoiques, les carbohydrates de la paroi cellulaire bactérienne, et également les facteurs sécrétés (Goh et Klaenhammer, 2010; Tareb et al., 2013). Deux types de protéines peuvent être impliquées dans ce phénomène, les protéines solubles et les protéines de la surface cellulaire (Miljkovic et al., 2015). Certains lactobacilles comme *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus* ou *Lb. crispatus* présentent une couche S, dont les protéines sont impliquées dans le processus d'agrégation (Hynönen et Palva, 2013). Ces protéines sont également impliquées dans les premières étapes de l'adhésion comme Kos et al. (2003) l'ont démontré sur *Lb. acidophilus* M92.

Parmi les facteurs sécrétés qui favorisent le processus d'agrégation, on peut citer les facteurs promoteurs de l'agrégation (APF), et de la coagrégation (CPF) qui sont des protéines secrétées pour les bactéries et sont trouvés par exemple chez *Lb. acidophilus* (Goh et Klaenhammer, 2010). Les protéines qui promeuvent l'autoagrégation comme AggE chez *Ent. faecium* ou AggLb chez *Lb. paracasei* ont été décrites; cette dernière a été identifiée comme étant la plus grande protéine ancrée dans la paroi cellulaire des lactobacilles (Miljkovic et al., 2015; Veljović et al., 2017). Ces facteurs sont également impliqués dans le processus d'adhésion et aussi dans la maintenance de la forme cellulaire de la bactérie. Cependant ces facteurs n'ont pas été décrit chez *Lb. salivarius* (Kang et al., 2017). Chez *Lb. reuteri*, le processus d'agrégation et d'adhésion dépend des protéines membranaires et des glucides pour la production d'exopolysaccharides et d'oligosaccharides (Walter et al., 2008).

Synthèse des résultats portant sur la sélection de souches

Dans un premier temps, nous avons sélectionné 13 souches d'intérêt parmi 70. Une deuxième sélection a été ensuite réalisée en prenant en compte les propriétés de coagrégation des *Lactobacillus* avec *C. perfringens* et surtout le pourcentage de survie mis en évidence par la cytométrie en flux. Cette deuxième sélection a pour but de sélectionner des souches qui auraient la plus grande probabilité d'atteindre l'intestin en gardant leur viabilité et seraient donc capables d'exercer leur potentiel probiotique. Nous avons retenu au final 3 isolats, *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430, dont les propriétés sont énumérées ci-dessous (**Tableau 27**); notamment la survie aux conditions gastro-intestinales par l'approche en cytomètre en flux et leurs capacités de coagrégation avec *C. perfringens* à 6 et 24 h d'incubation.

Tableau 27. Survie des bactéries pathogènes et coagrégation avec les souches de lactobacilles

		<i>Lb. reuteri</i> ICVB416	<i>Lb. salivarius</i> ICVB421	<i>Lb. salivarius</i> ICVB430
Survie aux conditions GIT (%)	CF	93,34 ± 1,41	91,67 ± 1,45	95,05 ± 3,73
	MRS	73,47 ± 0,92	32,56 ± 3,32	30,43 ± 4,03
Coagrégation avec <i>C. perfringens</i> (%)	6h	23,8 ± 4,6	27,9 ± 5,9	24,0 ± 4,4
	24h	62,5 ± 5,0	66,4 ± 1,5	61,9 ± 2,0
Coagrégation avec <i>Salmonella enterica</i> (%)	6h	21,3 ± 6,4	24,9 ± 3,9	24,2 ± 4,4
	24h	47,3 ± 7,7	67,3 ± 9,3	60,4 ± 3,7
Coagrégation avec <i>E. coli</i> (%)	6h	16,3 ± 4,8	17,6 ± 3,3	18,5 ± 4,7
	24h	61,3 ± 3,9	67,3 ± 4,0	70,4 ± 3,0
Agrégation (%)	6h	4,8 ± 0,74	7,1 ± 1,0	7,1 ± 2,1
	24h	39,3 ± 3,2	37,2 ± 4,13	36,9 ± 2,54
Biofilms (DO _{600nm})		1,64 ± 0,18	2,17 ± 0,20	4,00 ± 0,01
Acide lactique (g/L)		6,91 ± 0,61	11,30 ± 2,02	13,02 ± 2,76

CF : cytométrie en flux, MRS : dénombrement sur boîte en gélose MRS.

3.6. Adhésion aux cellules intestinales

La lignée cellulaire Caco-2 a été utilisée comme lignée modèle dans le but d'évaluer les capacités d'adhésion de *C. perfringens* DSM 756 et des souches de lactobacilles sélectionnées aux cellules de l'épithélium intestinal. La souche *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 a été utilisée comme souche témoin incapable d'adhérer aux cellules eucaryotes. Les cellules bactériennes cultivées 24h et reprises en DMEM ont été ajoutées aux cellules Caco-2 avec une MOI de 10:1 (bactéries : Caco-2). Pour déterminer le pourcentage d'adhésion, deux méthodes ont été utilisées. La méthode classique de dénombrement sur gélose MRS et l'approche moléculaire par PCR en temps réel. Le pourcentage d'adhésion a ensuite été calculé par rapport au nombre de bactéries inoculées. Les taux d'adhésion après 2h d'incubation sont représentés sur la **Figure 35**.

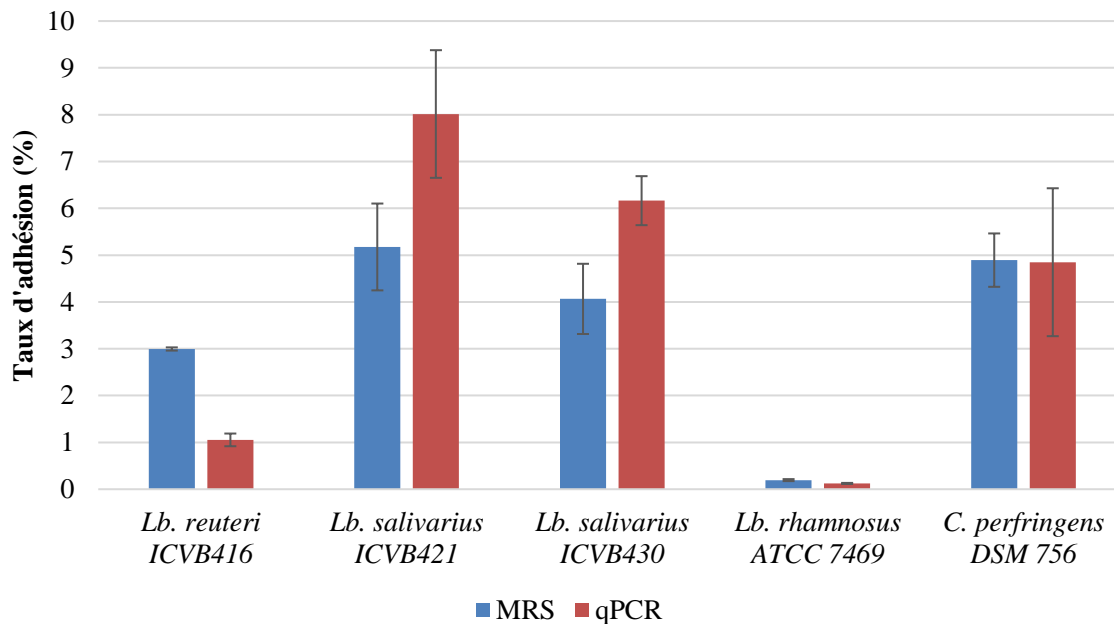


Figure 35. Pourcentage d'adhésion des souches bactériennes aux cellules Caco-2 par la méthode de dénombrement sur boîte et par PCR quantitative (qPCR).

Le témoin négatif, *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 présente les valeurs les plus basses avec une moyenne de 0,19% ; ces valeurs sont en accord avec celles données par Chauviere et al. (1992) qui ont montré que cette souche adhère faiblement aux cellules Caco-2 après 1 h d'incubation. Sa faible capacité d'adhésion a été démontrée également sur un modèle cellulaire de la muqueuse intestinale notamment par l'utilisation des glycoprotéines d'iléostomie humaine (Tuomola et al., 1999). En ce qui concerne les souches sélectionnées durant cette étude, les *Lb. salivarius* adhèrent plus fortement que la souche de *Lb. reuteri*. La méthode classique par dénombrement sur boîte, montre

que les souches *Lb. salivarius* présentent un taux d'adhésion variant de 3 à 5,18%, alors que par qPCR, ces pourcentages varient de 1,05 à 8,01%. Messaoudi et al. (2012) ont montré qu'une souche de *Lb. salivarius* SMXD51, isolée de fèces de poulet, adhère à un épithélium formé d'une monocouche de cellules Caco-2 assez faiblement avec des valeurs d'adhésion de 1%, bien inférieures à celles retrouvées durant notre étude. Toutefois nos souches sont moins adhérentes en comparaison des celles décrites dans l'étude d'Ait Seddik et al. (2017) qui présentent des taux d'adhésion sur le même modèle expérimentale variant de 5 à 8%.

En ce qui concerne la relation entre la méthode de dénombrement sur boîte et la PCR quantitative, celle-ci varie selon l'espèce. Chez *Lb. reuteri* on retrouve des valeurs plus faibles dans les résultats de la qPCR, contrairement à *Lb. salivarius*. L'avantage de l'approche moléculaire, utilisant la PCR quantitative, est principalement l'absence de risques d'une sous-estimation du nombre de bactéries du fait de la culture sur milieu gélosé en boîte de Pétri, qui ne permet d'évaluer que le nombre de microorganismes viables et cultivables. D'autre part la qPCR est une technique rapide, qui permet de différencier les bactéries dans un même échantillon en utilisant les amorces spécifiques de chaque espèce. Avec cet avantage, de tests sur l'effet de culture de barrière pourraient être faites, en observant si les souches sélectionnées ont un effet de compétition sur les sites d'union aux cellules intestinales par une administration précédant, ou de traitement si l'inoculation se fait après l'infection avec *C. perfringens*. Les inconvénients de cette technique sont principalement dus au temps d'optimisation de la méthode en utilisant les amorces spécifiques aux souches d'intérêt et le prix de revient liés à la complexité du matériel et aux traitements des échantillons (Friedrich et Lenke, 2006; Pathak et al., 2012). L'étude de l'adhésion *in vitro* s'agit d'une question controversée, par des sceptiques qui soutiennent l'incapacité des probiotiques à coloniser la muqueuse. D'un côté, la problématique vient de l'approche *in vitro*, où nombreux facteurs ne sont pas pris en compte : les cellules utilisées sont souvent utilisées en monoculture, elles proviennent de lignes cellulaires cancéreuses, les conditions d'incubation, les effets de la digestion sur les souches et la matrice alimentaire, ne sont pas envisagés. Également, il n'y a pas de microorganisme pour mimer les conditions de compétition du microbiote (Papadimitriou et al., 2015). D'un autre côté, la prémisse de qu'un probiotique doit coloniser. Ouwehand et Salminen (2003) défendent qu'il soit plus cohérent de parler de colonisation transitoire, temporelle ou de persistance des probiotiques plutôt que de colonisation.

Il est donc difficile d'extrapoler de manière fiable les résultats d'adhésion *in vitro* à la situation *in vivo* chez l'homme cependant les inconvénients décrits si des souches ont présenté valeurs d'adhésion *in vitro* elles les auront *in vivo*. Malgré tous les inconvénients décrits, il a été rapporté que les résultats des tests d'adhésion *in vitro* utilisant ce modèle ont une bonne corrélation avec ceux obtenu *in vivo* (Crociani et al., 1995; Ouwehand et Salminen, 2003). Les souches probiotiques doivent présenter une capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales, car c'est un prérequis pour la colonisation. Cette aptitude permet de prolonger le temps de séjour des souches dans l'intestin en prévenant leur élimination rapide dans les fèces. Qui plus est l'adhésion a un effet bénéfique sur la santé en permettant la mise en œuvre de l'exclusion compétitive des pathogènes et par les interactions avec les cellules épithéliales qui sont susceptibles de stimuler le système immunitaire et améliorer l'intégrité de barrière épithéliale (Surendran Nair et al., 2017; Yang et al., 2015).

La capacité d'adhésion d'une souche bactérienne dépend de plusieurs paramètres parmi lesquels nous citerons les propriétés intrinsèques de la souche, notamment les propriétés physico-chimiques de la surface de la cellule bactérienne. La composition de cette surface en acides gras et le ratio saturés/insaturés qui joue un rôle prépondérant sur la capacité d'adhésion. Toutefois il apparait que les polysaccharides empêcheraient l'adhésion et l'agrégation en masquant les récepteurs des protéines. (Polak-Berecka et al., 2014). L'adhésion peut également être influencée par les conditions de l'environnement (le pH, la concentration de nutriments et la température ; Buntin et al. (2017)), et de l'exposition aux conditions gastro-intestinales qui peuvent stimuler l'adhésion à l'épithélium (Donlan, 2002; Donlan et Costerton, 2002)

Nos observations nous ont amené à considérer la corrélation entre l'autoagrégation à 6h et le taux d'adhésion aux Caco-2. On observe que les souches *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB430 et *C. perfringens* DSM756 présentent une corrélation entre leurs capacités d'adhésion et les mesures effectuées concernant le phénomène d'autoagrégation. Cette corrélation est définie pour un diagonal comme on peut remarquer sur le graphique. Cependant, chez *Lb. rhamnosus* ATCC 7469 et *Lb. salivarius* ICVB421 il n'existe pas de relation comme montre la **Figure 36**.

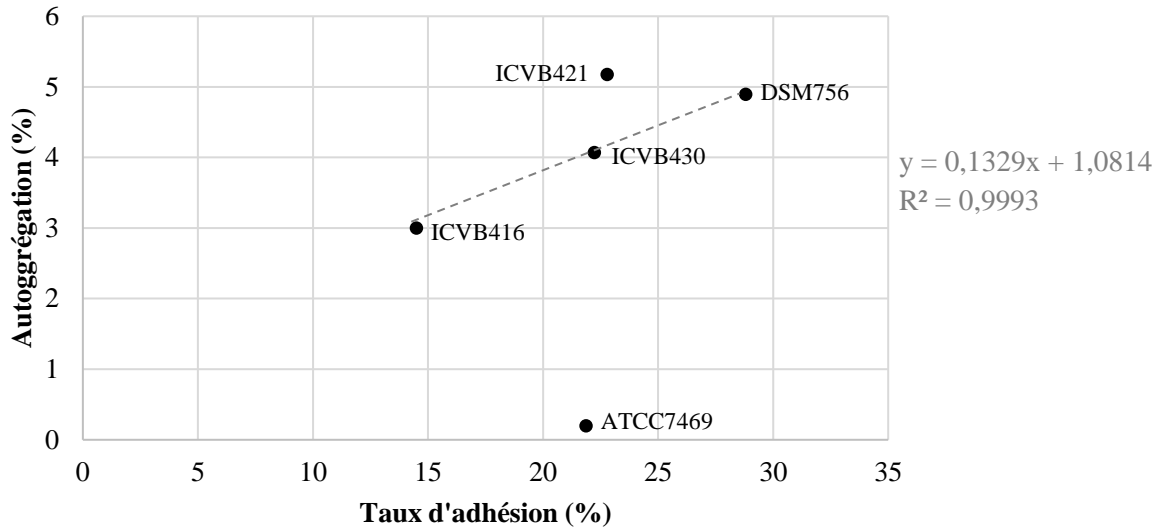


Figure 36. Corrélation entre l’autoagrégation et le taux d’adhésion aux cellules intestinales de la lignée cellulaire Caco-2. Les valeurs représentées sur axe des abscisses le taux d’adhésion, et sur l’axe des ordonnées les données obtenus dans le test d’autoagrégation.

Selon Kos et al. (2003) dans la plupart des cas, la capacité d'agrégation est liée aux propriétés d'adhésion cellulaire. Cependant Vizoso Pinto et al. (2007) ont nuancé quant à eux cette affirmation car si l'autoagrégation est liée à l'adhésion, cette relation n'est peut-être pas exclusive. Li et al. (2015) ne trouvent pour leur part aucune relation entre ces deux propriétés chez les souches bactériennes qu'ils ont étudié.

L'étude de l'adhésion des souches bactériennes aux cellules épithéliales intestinales est de première importance. Celle-ci ne peut se substituer par des approches telles que les tests d'autoagrégation, bien que ceux-ci présentent des avantages de simplicité et de gain de temps. Toutefois ce type d'approche permet une évaluation en première intention pour une présélection des souches candidates probiotiques mais qui nécessitera finalement une confirmation par des tests *in-vitro* et *in-vivo*.

4. Innocuité des souches sélectionnées

Bien que les souches de lactobacilles soient communément reconnues comme inoffensives (statut GRAS), elles sont parfois impliquées dans des infections ce qui, dans ce cas de figure, devient problématique. Il est donc impératif de démontrer l'innocuité de chaque nouvelle souche destinée à un usage probiotique. Dans notre travail, l'innocuité des souches sélectionnées a été

évaluée par le test d'hémolyse, l'étude de la résistance aux antibiotiques et l'étude de la cytotoxicité sur modèle *in-vitro* de cellules eucaryotes.

4.1. Activité hémolytique

L'activité hémolytique des souches sélectionnées a été évaluée sur gélose au sang de cheval. Dans ce test, une souche est considérée hémolytique, si un halo se forme autour de la colonie suite à la sécrétion d'enzymes qui provoquent la libération de l'hémoglobine à la suite de la destruction des globules rouges. Il y a trois types d'hémolyse : α , où l'hémoglobine est partiellement dégradée ce qui se traduit sur la gélose au sang par une décoloration verdâtre qui entoure les colonies bactériennes ; β , où l'hémoglobine est totalement dégradée autour des colonies formant des halo translucides ou γ qui correspond à l'absence d'hémolyse autour des colonies qui ne présentent pas d'halos dans la gélose au sang (Gerhardt et al., 1994). Aucune des souches de *Lactobacillus* testées n'a montré d'activité hémolytique après une lecture à 24, 48 et 72 heures, ce qui corrobore les observations faites lors de nombreuses études qui montrent que les lactobacilles ne sont généralement pas hémolytiques (Abushelaibi et al., 2017; Sha et al., 2016b; Shekh et al., 2016).

4.2. Résistance aux antibiotiques

Les souches sélectionnées ont été testées pour leur sensibilité à huit antibiotiques. Les souches ont été classées comme résistantes, intermédiaires ou sensibles selon les référentiels de l'EUCAST (Tableau 28).

Lb. reuteri présente de résistances aux antibiotiques comme la pénicilline G, la vancomycine et la ciprofloxacine selon les points critiques établis par l'EUCAST. Wang et al. (2014c) ont démontré que des souches de *Lb. reuteri* isolées de poulet ne présentaient pas de résistance, ou étaient sensibles à l'action des antibiotiques comme la kanamycine, la tétracycline ou l'érythromycine. Les souches de *Lb. reuteri* testées par Klare et al. (2007) présentaient une résistance à la vancomycine, et une sensibilité intermédiaire aux pénicillines et à l'oxytétracycline. La résistance à la clindamycine et ciprofloxacine a été déjà décrit sur *Lactobacillus*. La présence de cette résistance permet son énumération dans de protocoles décrits par les règlements ISO, comme par exemple, « ISO 20128:2006 : Produits laitiers ; Dénombrement de *Lactobacillus acidophilus* présomptifs sur un milieu sélectif ».

Tableau 28. Sensibilités des souches Lactobacilles aux antibiotiques

Antibiotiques	Pénicilline G	Cefotaxine	Gentamicine	Vancomycine	Clindamycine	Ciprofloxacine	Tétracycline	Triméthoprim Sulfaméthoxazole
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC7469	I	R	S	R	S	R	S	R
<i>Lb. reuteri</i> ICVB416	R	S	S	R	-	R	S	-
<i>Lb. salivarius</i> ICVB421	S	S	S	R	S	S	S	R
<i>Lb. salivarius</i> ICVB430	R	S	S	R	S	S	S	S

Légende. Les lettres affichées signifient **S** : Régime posologique standard et sensible (Un microorganisme est classé dans la catégorie du régime posologique standard sensible, lorsqu'il y a une forte probabilité de succès thérapeutique en utilisant un régime posologique standard de l'agent) ; **I** : Sensible, exposition accrue (Un microorganisme est classé dans la catégorie d'exposition accrue et sensible lorsqu'il y a une forte probabilité de succès thérapeutique parce que l'exposition à l'agent est augmentée en ajustant le schéma posologique ou par sa concentration au site de l'infection) et **R** : Résistant (Un microorganisme est classé comme résistant lorsqu'il y a une forte probabilité d'échec thérapeutique même en cas d'exposition accrue)(http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). - : non testé.

Les souches de *Lb. salivarius* ICVB421 et ICVB430 sont sensibles à la céfotaxine (famille des β -lactamines), gentamicine (aminoglycosides), clindamycine (lincosamides), ciprofloxacine (fluoroquinolones) et tétracycline. Par ailleurs ces deux souches sont résistantes à la vancomycine, mais elles sont discordantes pour la résistance au triméthoprim-sulfaméthoxazole (du groupe des sulfonamides) en étant résistante la souche ICVB421. Par contre la résistance à la pénicilline G est montrée par ICVB430.

Dans cette étude, les souches testées ont montré une résistance à la vancomycine (famille des glycopeptides), qui est décrite comme résistance naturelle chez les lactobacilles (**Ammor et al., 2007**). La résistance à la vancomycine est liée à la modification du pentapeptide du peptidoglycane qui présente une terminaison D-Alanine/D-Lactate ou D-Alanine/D-serine au lieu de D-Alanine/D-Alanine et, qui par conséquent, ne permet pas la liaison de l'antibiotique à la paroi (**Gueimonde et al., 2013**).

La résistance aux antibiotiques est un des paramètres importants pour la sélection de candidats probiotiques. Il est cependant utile de rappeler que la résistance en elle-même n'est pas problématique si elle est intrinsèque à la souche, c'est à dire si il s'agit d'une résistance naturelle qui n'a pas été acquise et qui n'est donc pas transférable par des éléments mobiles comme les plasmides, à des autres bactéries, pathogènes ou commensales de l'intestin (**Devirgiliis et al., 2013; Hibberd et Davidson, 2008**). Ce type de résistance peut même être intéressant lors du traitement d'une infection par la co-administration du probiotique avec l'antibiotique pour rétablir la flore intestinale et éviter des effets secondaires comme les diarrhées dues aux médicaments (**Blaabjerg et al., 2017**).

D'un autre côté, la présence de gènes de résistance aux antibiotiques codés par des plasmides potentiellement transmissibles présente des risques en raison de la possibilité de transfert horizontal dans les bactéries réceptrices de l'intestin (**Mater et al., 2007**).

4.3. Cytotoxicité envers les cellules eucaryotes de la lignée HT-29

La cytotoxicité a été évaluée pour les trois souches sélectionnées et le témoin *Lb. rhamnosus* ATCC7469 probiotique utilisé chez le porc avec des effets immunomodulateurs et potentialisation de l'intégrité de la barrière (**Zhang et al., 2015; Zhu et al., 2014**). Deux concentrations bactériennes ont été testées. Une concentration très élevée de 10^7 UFC/puits, correspondant à un ratio de 1 : 100 (cellule HT-29 : bactéries) et une concentration de 10^5 UFC/puits, correspondant à la fourchette du MOI (multiple of Infection bactéries/cellules) retrouvée dans différentes études REF. Le ratio est alors de 1 : 1. Un mélange des 3 souches à 10^7 et 10^5 UFC total/puit a aussi été testé (il est appelé Mix dans la Figure 37).

Les données obtenues (**Figure 37**) suggèrent que les souches ICVB430 et ICVB421, qui appartiennent à l'espèce de *Lb. salivarius*, ont un effet cytotoxique quand elles sont ajoutées à une concentration de 10^7 UFC/puits, et lorsqu'on teste la combinaison des 3 souches. Pour une concentration de 10^5 UFC/puits, les valeurs montrent que les souches ne présentent pas d'effet cytotoxique sur les cellules HT-29 et par conséquent, la fonction de barrière intestinale des cellules est maintenue en présence de ces probiotiques potentiels. L'effet cytotoxique des bactéries est dû à la forte concentration cellulaire et l'activité métabolique des bactéries, car la viabilité des cellules HT-29 n'est pas perturbée quand elles sont en contact avec 10^7 bactéries inactivées par chaleur. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Er et al. (**2015**) pour lesquels la cytotoxicité de

souches sur les cellules eucaryotes est dépendante de la quantité de bactéries testées influait sur la viabilité cellulaire.

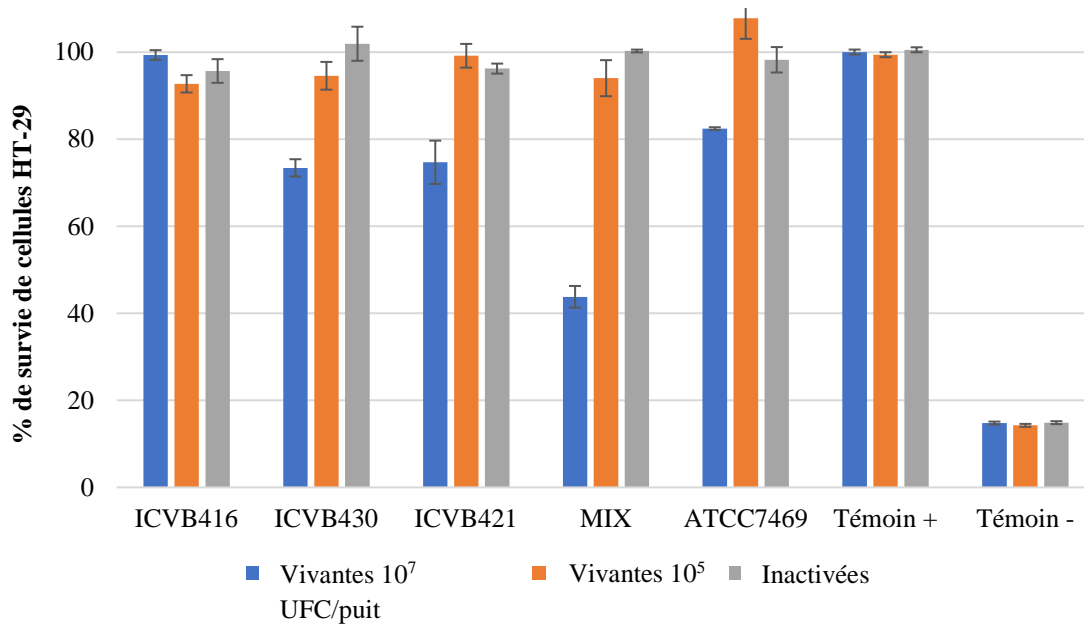


Figure 37. Viabilité cellulaire (%) de la lignée cellulaire eucaryote HT-29, après 24 h de contact avec les bactéries lactiques. **ICVB416** : *Lb. reuteri* ICVB416 ; **ICVB421** : *Lb. salivarius* ICVB421 ; **ICVB430** : *Lb. salivarius* ICVB430. **MIX** : Mélange en volumes égales des trois souches précédentes. **ATCC7469** : *Lb. rhamnosus* souche de référence. **Témoin +** : cellules HT-29 sans ajouts. **Témoin -** : Triton 0,1%.

5. Description des propriétés technologiques des souches

Après avoir sélectionné les souches potentiellement probiotiques sur la base de critères fonctionnels et démontré l'innocuité de ces dernières, nous avons évalué quelques aptitudes technologiques dans l'optique d'une production à grand échelle pour une utilisation chez le poulet d'élevage. La survie lors du processus de conservation par lyophilisation a donc été étudiée ainsi que la stabilité du produit dans les conditions de stockage prédéfinies. Enfin, pour les souches devant être administrées aux poulets dans l'eau de boisson, la viabilité des souches a été évaluée en milieu aqueux.

5.1. Survie des bactéries à la lyophilisation et conservation sous forme déshydratée

Afin d'avoir un effet probiotique chez le poulet, une grande quantité de bactéries vivantes de l'ordre de 10^8 UFC/g d'aliment de poulet ou mL d'eau est nécessaire. Pour obtenir des concentrations élevées, nous avons cultivé les souches pendant 24 h à 37°C en milieu MRS enrichi avec du glucose (20g/L), de la peptone (5g/L) et de l'extrait de levure (4g/L) en tamponnant le pH à 6,5. Dans ces conditions, les densités cellulaires varient de $7,25 \cdot 10^9$ UFC/mL à $1,93 \cdot 10^{10}$ UFC/mL (**Tableau 29**).

Les culots des cultures ont été ensuite lyophilisés avec deux cryoprotecteurs différents : le lait écrémé (20%) et le saccharose (20%). En termes de survie des souches lors de la lyophilisation, une diminution de la population d'environ 1 log a été observée quel que soit le cryoprotecteur ajouté.

Tableau 29. Effet du processus de lyophilisation selon des cryoprotecteurs.

	<i>Lb. reuteri</i> ICVB416	<i>Lb. salivarius</i> ICVB421	<i>Lb. salivarius</i> ICVB430
Biomasse à T ₀ (UFC/g)	$1,93 \cdot 10^{10}$	$7,25 \cdot 10^9$	$9,58 \cdot 10^9$
Lait d'écrémé (UFC/g)	$1,1 \cdot 10^9$	$6,67 \cdot 10^8$	$1,14 \cdot 10^9$
Saccharose (UFC/g)	$1,6 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	$1,02 \cdot 10^9$

Après leur lyophilisation, les souches ont été stockées à température ambiante pendant 6 mois et la viabilité a été mesurée par dénombrement sur boîte. La **Figure 38** permet d'établir la réduction de la population au cours du temps. La conservation en présence de saccharose présente des diminutions de 1 log alors que souches conservées en présence de lait écrémé perdent 3 log après 80 jours de stockage. En revanche pour les périodes plus longues après 176 jours, le taux de mortalité des souches est indépendant de la méthode de conservation sauf *Lb. reuteri* ICVB416 qui reste stable entre 80 et 176 jours quand elle est conservée dans du lait écrémé.

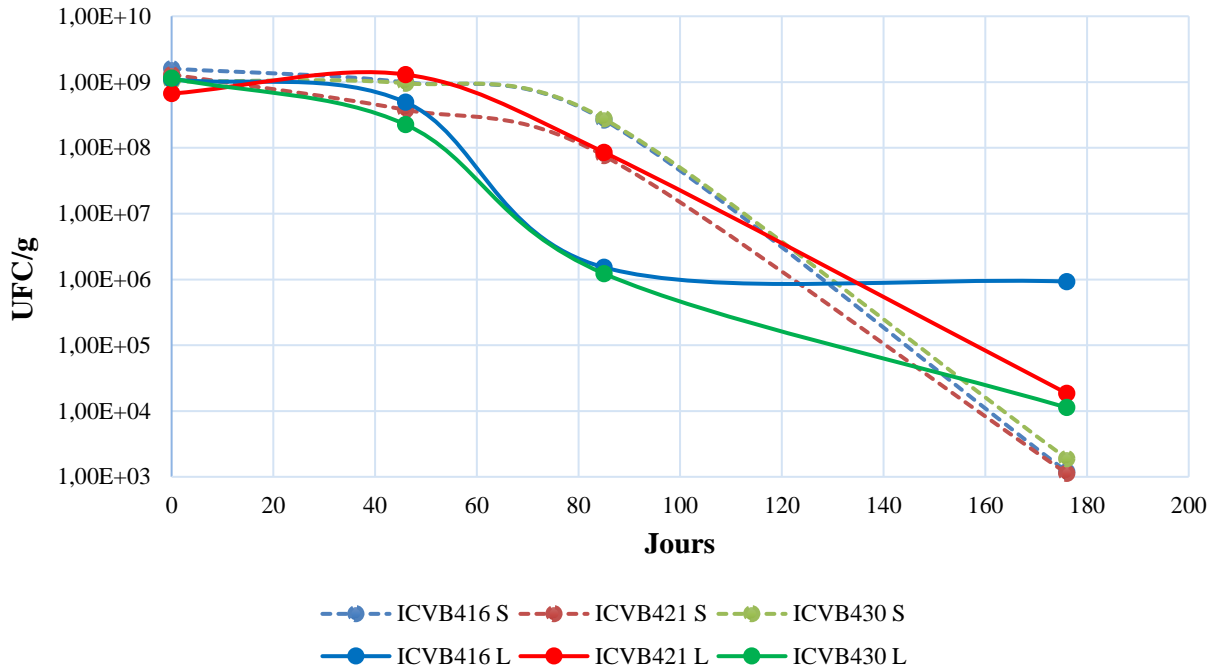


Figure 38. Survie des souches lyophilisées. Les courbes en trait plein représentent les souches lyophilisées dans 20% de saccharose (S). Les courbes en trait discontinu représentent la lyophilisation avec 20% de lait écrémé (L).

5.2. Survie des souches de lactobacilles en suspension aqueuse.

Dans les élevages industriels, les probiotiques peuvent être administrés comme supplément dans la nourriture des animaux ou dans l'eau de boisson. L'administration la moins coûteuse est la supplémentation aqueuse si les souches survivent bien dans ce milieu. Le pourcentage de survie des *Lactobacillus* a été établi dans l'eau du réseau et dans du tampon PBS utilisé comme témoin pour évaluer l'effet de la pression osmotique et du chlore. Le **Tableau 30** montre les résultats obtenus après 24 h de contact.

Tableau 30. Survie bactérienne (%) après mises en suspensions aqueuses.

	<i>Lb. reuteri</i> ICVB416	<i>Lb. salivarius</i> ICVB421	<i>Lb. salivarius</i> ICVB430
PBS 1X	93,7 ± 2,3	97,8 ± 1,8	97,3 ± 1,8
H ₂ O	93,7 ± 4,2	97,6 ± 3,1	97,7 ± 0,5

Toutes les souches présentent des taux de survie supérieurs à 93,7 %. Après une analyse ANOVA, il n'y a pas de différence significative entre les pourcentages des souches testées en PBS et en eau du réseau. Cela indique que ces souches pourraient être administrées aux poulets par le biais de l'eau de boisson des animaux.

5.3. Inhibition croisée des souches de bactéries lactiques

Dans le but de commercialiser un mélange probiotique, le test d'inhibition croisée a été réalisé selon la méthode des spots de Schillinger et Lücke (1989). 5 µL d'une culture de 18h sont déposés en spot à la surface d'une gélose MRS inondée avec une cible (Figure 39 ci-dessous). Il n'y a pas d'inhibition croisée des souches entre-elles.

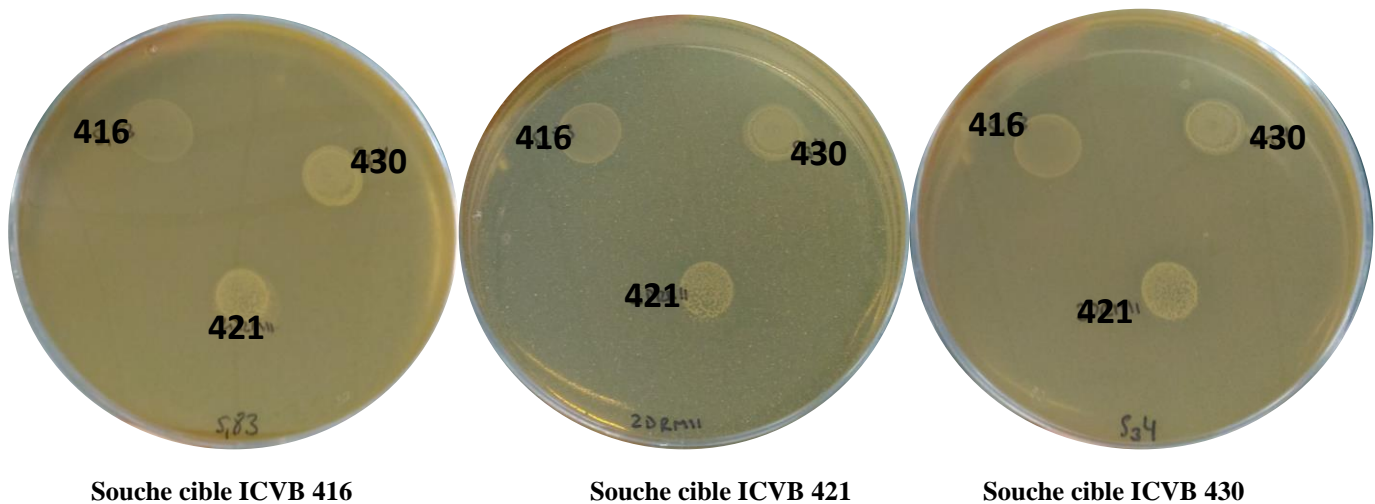


Figure 39. Test d'activité croisée en spots

Suite aux résultats de cette première analyse, les souches sélectionnées pourraient donc être utilisées en combinaison dans un produit multi-probiotique car il n'y a pas d'antagonismes entre elles.

6. Séquençage et analyse des génomes

Les ADNs des 3 souches sélectionnées ont été extraits et ensuite séquencés par les plateformes technologiques Illumina MiSeq et HiSeq 2500 (MicrobesNG, Birmingham, Royaume-Uni). Le logiciel RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) a permis de déterminer la taille du génome et le pourcentage

de G+C. Selon les données obtenues le génome de *Lb. reuteri* présente une taille et un pourcentage de G+C supérieurs à ceux retrouvés pour les souches de *Lb. salivarius* (**Tableau 31**).

Tableau 31. Données génétiques des souches de lactobacilles sélectionnées.

Génome	Taille (pb)	%G+C	RNA total	Nombre de séquences de codage
<i>Lb. reuteri</i> ICVB416	2 120 802	38,5	80	2249
<i>Lb. salivarius</i> ICVB421	1 944 585	33,3	71	1999
<i>Lb. salivarius</i> ICVB430	1 902 367	33,0	68	1891

L'étude des génomes nous a permis de réaliser une analyse *in silico* des propriétés fonctionnelles démontrées durant les expériences décrites précédemment.

6.1. Recherche de gènes codant des molécules antibactériennes putatives

Les génomes des souches sélectionnées ont été analysés *in silico* grâce au logiciel en ligne antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>). Ce logiciel permet la détection de gènes en relation avec les métabolites secondaires produits par les bactéries et permet d'identifier les substances bioactives potentiellement produites par les souches considérées (**Weber et al., 2015**). Les souches de *Lb. salivarius* ICVB421 et ICVB430 possèdent dans leur génome un gène « ressemblant » à celui codant la bactériocine Abp118 de *Lb. salivarius* UCC118 (**Corr et al., 2007**) avec 18% de similarité seulement (**Figure 40**).

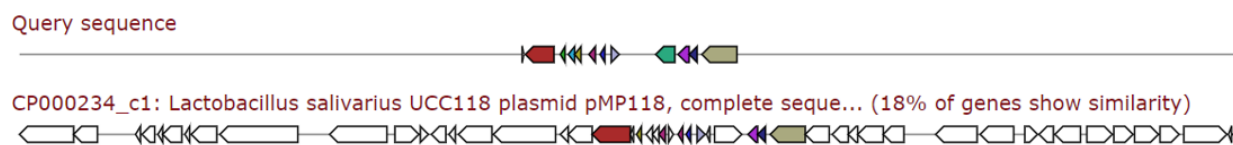


Figure 40. Prédiction de la présence de gènes de bactériocines dans les génomes des souches de *Lactobacillus salivarius*.

En revanche, l'analyse des 2 génomes de *Lb. salivarius*, à l'aide du logiciel en ligne BAGEL3 (<http://bagel.molgenrug.nl/index.php/main>) qui permet l'identification de gènes codant pour des bactériocines ou des peptides bactéricides modifiés ou non au niveau post-traductionnel (**van Heel et al., 2013**) a permis de prédire la présence de deux possibles gènes de bactériocines dans les

génomés. Ces gènes sont ceux d'une bactériocine de type III (entérolysine A) (**Figure 41**) et d'une bactériocine de type IIb (bactériocine LS2) (**Figure 42**).

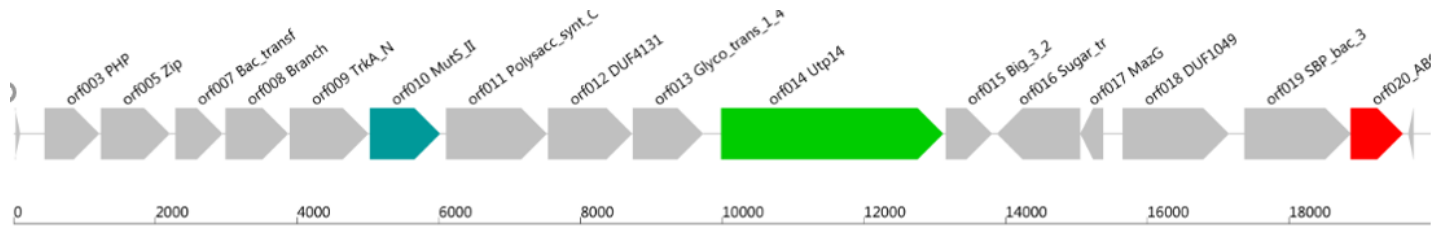


Figure 41. Gène putatif de l'entérolysine A dans les génomes des souches de *Lactobacillus salivarius*.

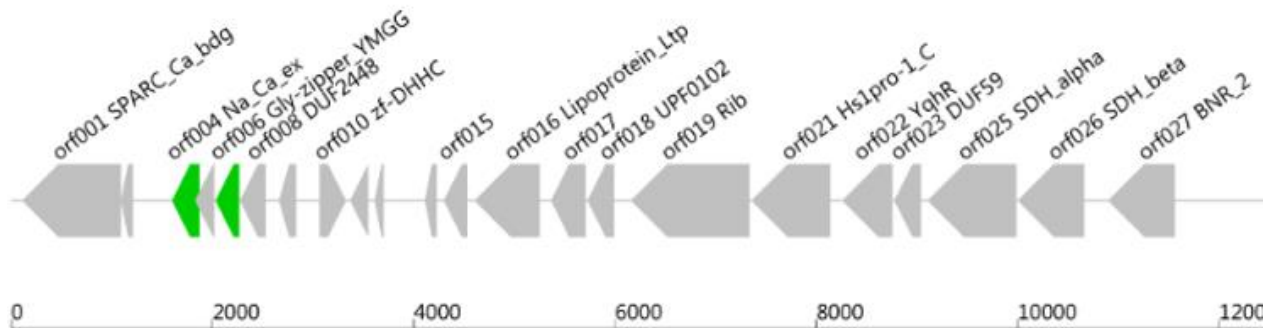


Figure 42. Gènes potentiels codant la synthèse de la bactériocine LS2 dans les génomes de *Lactobacillus salivarius*.

Lb. reuteri ICVB416 quant à elle ne possède pas le gène de la reutérintine, ce qui a été par la suite confirmé par l'analyse du génome à l'aide des logiciels Anti-SMASH et BAGEL3.

6.2. Recherche moléculaire des propriétés d'innocuité

6.2.a. Facteurs de virulence

Pour la prédiction des facteurs de virulence dans le génome, une analyse *in silico*, a été faite par RAST. Pour aboutir à prédire ces facteurs, plusieurs stratégies de détection des marqueurs ont été suivies :

- (i) recherche d'homologie avec les gènes déjà décrits,

- (ii) identification de facteurs de virulence parmi les gènes acquis de façon horizontale,
- (iii) comparaison avec des génomes de souches pathogènes ou non.

La même méthodologie est utilisée pour à prédire la résistance aux antibiotiques (**Bakour et al., 2016**).

Parmi les souches analysées, RAST n'a trouvé aucun gène de virulence dans les génomes. Ceci correspond aux résultats donnés par le CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/>) qui donne en plus la probabilité que la bactérie analysée soit pathogène pour les êtres humains. Dans cette analyse, *Lb. reuteri* ICVB416 présente un score de probabilité de 0,091, *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430 un score de 0,065. L'absence de gènes de virulence est conforme à l'étude réalisée par Bennedsen et al. (2011), dans laquelle les auteurs ont analysé les génomes de 16 lactobacilles à la recherche de facteurs de virulence sans en trouver aucun.

6.2.b. Gènes de résistance aux antibiotiques

Comme expérimentalement établi, les 3 souches présentent des résistances à quelques antibiotiques. Les 2 souches de *Lb. salivarius*, présentent de gènes de résistance par exemple aux fluoroquinolones. Les souches portent également des gènes impliqués dans les mécanismes de résistance non-spécifique comme les pompes à efflux impliquées dans la multi-résistance aux médicaments aussi appelés transporteurs multi-*drugs* come le MATE. Il s'agit de transporteurs secondaires qui utilisent l'énergie des gradients d'ions ou de substrat-produit pour l'expulsion des composés cytotoxiques comme les médicaments (**Gueimonde et al., 2009; Poolman et Konings, 1993**). RAST et Blastx montrent que *Lb. salivarius* ICVB421 possède un transporteur de flux de la famille MATE et un autre transporteur impliqué dans la multirésistance ; une protéine de transport de type ABC à ATP. En ce qui concerne *Lb. salivarius* ICVB430, seule la protéine de la famille d'efflux MATE est présente.

Lb. reuteri ICVB416 présente une résistance spécifique à la tétracycline et aux fluoroquinolones. Il n'est pas étonnant de retrouver les gènes de résistance à la tétracycline dans cette souche, car ces gènes sont les plus répandus dans les lactobacilles (**Ammor et al., 2007**). La souche possède également des gènes codant pour des pompes à efflux impliquées dans la multi-résistance aux médicaments aussi appelés transporteurs multi-*drugs*.

La présence de gènes de résistance aux antibiotiques n'est pas obligatoirement synonyme de risque car celui-ci n'apparaît que quand la résistance est transférable (**Gueimonde et al., 2013**). Il

a été démontré que lorsque les lactobacilles portent des éléments transférables, l'administration orale présente un risque potentiel, car le tractus gastro-intestinal est une niche écologique connue pour être un terrain favorable aux transferts horizontaux. En effet, dans le tractus gastro-intestinal :

- (i) la quantité de microorganismes est extrêmement élevée favorisant ainsi les interactions microbiennes et générant un immense réservoir de gènes de résistances aux antibiotiques
- (ii) les conditions hostiles comme le pH, les sels biliaires, la concurrence, les facteurs de défense de l'hôte (peptides antimicrobiens), ou l'immunité et stimulent l'adaptation **(Mater et al., 2007; Zeng et Lin, 2017)**

Cependant, nous n'avons pas retrouvé des éléments transposables ou de plasmides transférables dans les souches séquencées.

6.2.c. Gènes de résistance aux autres composants toxiques

Les 3 souches présentent des gènes permettant la mise en place de mécanismes de résistances au mercure, au cuivre, au cadmium, au cobalt et au zinc. Elles portent aussi le gène de la BSH qui permet l'hydrolyse de la bile. La présence de ce gène peut être une caractéristique souhaitable chez un probiotique car elle permet de multiplier les effets bénéfiques notamment sur la survie dans les conditions drastiques du tractus digestif, et par conséquent induire des effets positifs sur la santé chez l'hôte. D'autres mécanismes, incluant des systèmes à deux composants et les transporteurs multidrugs interviennent dans le processus de survie à la bile par l'élimination active des composés biliaires des cellules **(Koskenniemi et al., 2011)**.

6.2.d. Présence de gènes du système CRISPR

Seules les souches de *Lb. salivarius* présentent des gènes associés au système CRISPR qui permet la défense contre de l'ADN étranger.

6.3. Caractérisation prédictive du métabolisme des souches

L'étude des souches sélectionnées ainsi que celle de leurs génomes montre qu'elles possèdent la machinerie permettant d'utiliser différents hydrates de carbone. Chez *Lb. reuteri* ICVB416, on retrouve les gènes impliqués dans la fermentation de monosaccharides (D-ribose, xylose, L-arabinose, D-gluconate et cetogluconates, D-galactarate, D-glucarate et D-glycerate) et de disaccarides (saccharose, lactose et galactose). Cette souche possède également les gènes intervenant dans l'utilisation du lactate et le métabolisme du glycérol. Elle peut produire de l'acide lactique, comme nous l'avons démontré expérimentalement, mais présente aussi les gènes impliqués dans le mécanisme de fermentation de l'acetyl-CoA en butyrate, ainsi que les gènes du métabolisme de l'acétoïne et butane diol.

Concernant les souches de *Lb. salivarius* ICVB421 et ICVB430: elles sont pourvues de l'ensemble des déterminants permettant l'utilisation des sucres aminés, comme la chitine et la N-acétylglucosamine. Ces souches sont également capables de croître en utilisant le fructose, le D-ribose et le mannose, le saccharose, le lactose et le galactose. En outre, elles peuvent également métaboliser le lactate.

6.4. Prédiction des capacités probiotiques

Comme il a été décrit précédemment, les capacités probiotiques d'agrégation, d'adhésion et de formation de biofilm sont liées. Nos recherches *in-silico* nous ont permis de rechercher les mécanismes pour lesquelles les bactéries sélectionnées pourraient présenter un intérêt.

L'analyse à l'aide du logiciel RAST suggère la présence de facteurs d'agrégation. Les fragments génomiques ont été analysés par BLASTp qui a identifié des protéines possédant des domaines LysM de liaison au peptidoglycane. Ces protéines présentent des homologies avec des APFs et peuvent être ancrées dans l'enveloppe cellulaire par ces domaines LysM (**Goh et Klaenhammer, 2010 ; Kang et al., 2017**). Dans le génome des souches ICVB421 et ICVB430, il y a des séquences qui présentent 98% de similarité avec la protéine peptidase M23B capable de se lier avec le peptidoglycane (**Kang et al., 2017**). En revanche, aucun gène codant pour des protéines de la couche S (*slpA*) ou pour des facteurs comme AggLb ou AggE n'a été trouvé. Toutefois, *Lb. reuteri* ICVB416, même si elle ne présente pas le gène *slpA*, elle présente le gène codant pour AggH impliqué dans l'agrégation bactérienne cellule-cellule (**Roos et al., 1999**).

En ce qui concerne l'adhésion, les trois souches portent le gène de sortase (*srtA*) qui code pour une protéine importante dans les interactions avec le mucus (**Lebeer et al., 2008**).

Les souches de *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430 ont au niveau de leurs génomes des gènes codant pour une protéine de liaison à la fibronectine : *LSL_0873*, et le gène responsable de la liaison au mucus *mbp2*. Le gène *mbp3* n'a pas été trouvé. *Lb. reuteri* ICVB416 présente le gène *Lreu_0932* responsable de la liaison à la fibronectine.

Aucune des trois souches ne présentent ni le gène *mub* qui a été décrit pour ses propriétés de liaison au mucus et d'agrégation (Mackenzie et al., 2010), ni le gène *msa* qui est responsable de la synthèse d'une adhésine à mannose présente dans les récepteurs des cellules épithéliales et qui favorise l'adhésion à l'intestin (Gross et al., 2010).

6.5. Prédiction des capacités technologiques

Selon l'analyse des génomes par le logiciel RAST, les souches présentent des gènes de réponse au stress oxydatif mais aussi au stress osmotique. Cela peut être corrélé avec la survie de ces souches quand elles ont été testées pour leur viabilité dans l'eau.

7. Test *in vivo*

Afin d'étudier l'effet bénéfique des souches sélectionnées et caractérisées *in vitro*, un test *in vivo* a été réalisé. Les expériences *in vivo* se sont déroulées pendant 17 jours sur 240 poulets (30 par condition expérimentale). Durant les essais, les souches de *Lactobacillus* ont été administrées seules (*Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB421 ou *Lb. salivarius* ICVB430), par binôme (*Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB421; *Lb. reuteri* ICVB 416 et *Lb. salivarius* ICVB 430) et tous les trois ensembles par gavage une fois par jour, puis aux jours 1 et 2, et jours 10 au 13. Il y a un seul groupe qui manque, c'est celui de *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430, en cherchant développer un probiotique « multistrain » et en augmentant le nombre d'échantillons par traitement. Une souche de *C. perfringens* décrite comme agent causal de l'EN a été administrée à raison de 10^7 UFC durant les jours 14, 15 et 16 dans les lots de poulets ayant été gavés avec les bactéries lactiques et dans un lot témoin sans ajout de probiotiques (Cp). Un lot non gavé et non vacciné faisant office de lot témoin (NCp). Ces conditions sont récapitulées dans le **Tableau 32** (ci-dessous).

Tableau 32. Conditions testées *in vivo* (expérimentation animale).

Jour d'essai	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Régime	Régime démarreur									Régime de croissance							
Vaccination	A								B								
<i>Lactobacillus</i>																	
<i>C. perfringens</i>																	
Mesures										×				×			×

(A) vaccin *Advent@9X*, (B) VACCIN Intervet, Bursal Vac-G603 contre la bursite infectieuse aviaire

7.1. Essai de croissance ou performance zootechnique pendant la phase de démarrage.

Cette partie de l'essai avait comme but de déterminer si l'administration des souches, ou des mélanges de souches, peut favoriser les performances zootechniques des poulets sains. Les lactobacilles ont été administrés dans deux périodes décrites comme étant cruciales pour l'éventuelle installation des probiotiques dans le microbiote du poulet; ce sont : (i) les premiers jours de vie, pour cette raison l'apport des *Lactobacillus* a été fait les jours 1 et 2. L'échantillon a été pris le 10^{ème} jour, pour savoir si les souches sont implantées et par conséquent, si elles ont des effets sur le poids des poulets. (ii) l'apport de souches après le changement de régime, c'est-à-dire, les 10, 11, 12, 13^{èmes} jours. La mesure du poids et la consommation alimentaire au 14^{ème} jour a permis de rechercher un bénéfice suite à l'administration des différents traitements probiotiques. Les résultats obtenus jusqu'au 14^{ème} jour sont donnés dans le **Tableau 33**. L'indice de consommation ou FCR est défini comme étant la quantité d'aliments ingérée en kg par kg de gain de poids chez les poulets en termes de gain moyen quotidien de poids vif et d'ingéré alimentaire quotidien. Cette mesure présente un intérêt économique majeur car 70% du coût total de la production est dû uniquement au coût des aliments pour animaux. Il a été recherché une amélioration du FCR, car il augmentera sensiblement la marge bénéficiaire dans les élevages (Sarangi et al., 2016).

Tableau 33. Effets sur le poids vif des poulets, la consommation alimentaire et la FCR (*Feed Conversion Ratio*) après supplémentation des *Lactobacillus*.

	Poids moyen par oiseau (g)		Consommation alimentaire moyenne par oiseau (g)		FCR	
	J10	J14	J0-J10	J10-J14	J0-J10	J10-J14
Témoin (sans ajouts)	320,4 ± 12,8 ^B	547,4 ± 22,2 ^{AB}	311,50 ± 9,9 ^{AB}	280,21 ± 10,3	1,117 ± 0,02 ^{AB}	1,236 ± 0,04 ^{AB}
<i>Lb. reuteri</i> ICVB 416	317,9 ± 10,7 ^B	544,8 ± 24,8 ^{AB}	305,50 ± 12,3 ^{AB}	275,63 ± 12,3	1,123 ± 0,02 ^{AB}	1,217 ± 0,05 ^B
<i>Lb. salivarius</i> ICVB 421	329,8 ± 8,4 ^{AB}	564,6 ± 17,9 ^A	314,17 ± 10,1 ^{AB}	285,42 ± 9,0	1,127 ± 0,01 ^{AB}	1,217 ± 0,04 ^B
<i>Lb. salivarius</i> ICVB 430	326,9 ± 17,4 ^{AB}	555,4 ± 22,9 ^{AB}	316,33 ± 14,7 ^A	282,08 ± 12,6	1,130 ± 0,02 ^A	1,234 ± 0,04 ^{AB}
ICVB 416 + ICVB 421	320,2 ± 9,2 ^{AB}	543,4 ± 20,1 ^{AB}	303,17 ± 9,4 ^B	273,75 ± 7,8	1,109 ± 0,03 ^{AB}	1,229 ± 0,02 ^{AB}
ICVB 416 + ICVB 430	334,1 ± 15,06^A	566,5 ± 20,0 ^A	314,67 ± 9,1 ^{AB}	284,38 ± 9,8	1,098 ± 0,03 ^B	1,223 ± 0,04 ^{AB}
ICVB 416 + ICVB 421 + ICVB 430	320,9 ± 12,3 ^{AB}	536,7 ± 16,0 ^B	304,79 ± 8,4 ^{AB}	274,58 ± 8,7	1,125 ± 0,04 ^{AB}	1,274 ± 0,05 ^A

J0-J10 : du 1^{er} au 10^{ème} jour ; J10-J14 : du 10^{ème} au 14^{ème} jour. Les lettres en index montrent de différences significatives. Les groupes qui possèdent la même lettre ne sont pas différents significativement. **Témoin sans ajouts** : Groupe témoin non supplémenté en lactobacilles. ***Lb. reuteri* ICVB 416** : supplémenté en lactobacille ; ***Lb. salivarius* ICVB 421** : supplémenté en lactobacille ; ***Lb. salivarius* ICVB 430** : supplémenté en lactobacille ; **ICVB 416 + ICVB 421** : supplémenté en mélange de *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB 421 ; **ICVB 416 + ICVB 430** : supplémenté en mélange de *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB 430 ; **ICVB 416 + ICVB 421 + ICVB 430** : supplémenté en mélange de *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB 421 et *Lb. salivarius* ICVB 430.

L'administration des *Lactobacillus* seuls ou en mélange dans les deux premiers jours de vie n'influence ni le poids ni la consommation d'aliments des poulets (il n'y a pas de différences significatives entre les groupes). En ce qui concerne les mesures faites au jour 10 dans tous les traitements sauf quand les animaux ont été traité avec *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB430, qui ont présenté un poids significativement supérieur que celui du témoin. Ceci diffère des études de Blajman et al. (2017) qui montrent des différences significatives entre le groupe témoin et le groupe nourrit avec une souche probiotique, *Lb. salivarius* DSPV 001P. Cependant dans l'étude de Blajman et al. (2017), le probiotique est administré quotidiennement dans l'aliment alors que lors de notre expérience, l'apport des probiotiques potentiels est réalisé d'une manière discontinue. Ehrmann et al. (2002) ont quant à eux établi que *Lb. salivarius* TMW1.992, une souche à potentiel probiotique, est capable de survivre et de persister dans le tractus gastro-intestinal des volailles (Ehrmann et al., 2002).

Les mêmes résultats (pas de gain de poids, ni d'augmentation de la consommation alimentaire) sont également retrouvés dans la 2^{ème} période de tests sur les oiseaux (jours 10 à 14). Selon Oakley et al. (2014) les effets des probiotiques sont plus visibles quand ceux-ci sont administrés dans les premiers jours de vie (où le microbiote initial est en cours de développement). Les auteurs estiment que l'efficacité des probiotiques peut apparaitre aussi après un changement de régime ou une perturbation dus au stress ou à la consommation d'antibiotique par exemple. Cependant, Peng et al. (2016) montrent qu'une souche de *Lb. plantarum*, désignée B1, présente les meilleurs effets quand elle est administrée pendant toute la période de l'essai ou en fin d'essai (du jour 22 au 42). D'autres études quant à elles semblent indiquer l'absence d'effets significatifs sur les performances des animaux lorsqu'ils sont traités avec des probiotiques, comme le montre Nakphaichit et al. (2011) pour la souche *Lb. reuteri* KUB-AC5 ou Ashayerizadeh et al. (2011) avec le probiotique Primalac (*Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium thermophilum* et *Ent. faecium*) Ces écarts sont en partie dus à la souche de *Lactobacillus* choisie, la posologie, la méthode de préparation et l'état des animaux (Brisbin et al., 2011).

Par ailleurs il a été démontré que l'effet d'un probiotique est lié aux nombres de germes qui arrivent vivants dans l'intestin (Minelli et Benini, 2008; Ouwehand, 2017). L'effet de la concentration de probiotique a été décrit par Mountzouris et al. (2010) qui soulignent l'importance de la quantité de probiotiques administrée pour maximiser leur efficacité. Les souches probiotiques

ont d'autre part besoin d'une administration constante pour montrer des effets surtout quand l'environnement, ou l'écosystème, où ils sont implantés est développé et complexe (**Grazul et al., 2016**).

Les différences observées pour l'impact des probiotiques sur la prise de poids peuvent être également liées à la composition des microbiotes chez les volailles lors des essais indépendants, même lorsque les conditions sont soigneusement contrôlées et strictement identiques d'un essai à l'autre (**Kers et al., 2018**). Les microbiotes sont façonnés par des facteurs biologiques intrinsèques chez les hôtes (facteurs maternelles, races), mais également par des facteurs environnementaux comme la localisation, la litière, la température, l'hygiène (**Brooks et al., 2015; Kers et al., 2018; Laukens et al., 2015**).

Des effets favorisant la colonisation précoce des bactéries bénéfiques ont été trouvés après une administration *in ovo*, la base de cette technique est d'inoculer les probiotiques dans le liquide amniotique de l'œuf pour qu'ils soient le premier aliment de l'animal (**Ferket, 2006**). L'administration *in ovo* peut se traduire en la potentialisation du développement et le maintien d'une bonne santé intestinale (**Roto et al., 2016**). L'administration de ces bactéries au moment précis peut favoriser l'implantation du probiotique dans le microbiote du poussin.

7.2. Effet des souches sur l'entérite nécrotique.

Le but de cette partie de l'essai était d'étudier l'effet préventif de l'administration des probiotiques sur le développement de l'entérite nécrotique.

Les *Lactobacillus* ont été administrés aux 10, 11, 12 et 13^{èmes} jours. Au 14^{ème} jour, tous les lots sauf le témoin négatif ont été infectés par *C. perfringens*. Les mesures effectuées au 17^{ème} jour ont permis de chercher l'effet des lactobacilles comme agent préventif contre l'entérite nécrotique, pour cela des mesures de poids et la recherche des lésions nécrotiques au niveau de l'intestin des poulets (**Tableau 34**). Les lésions macroscopiques ont été mesurées dans les 8 traitements, et définies comme indiqué sur la **Figure 43**.

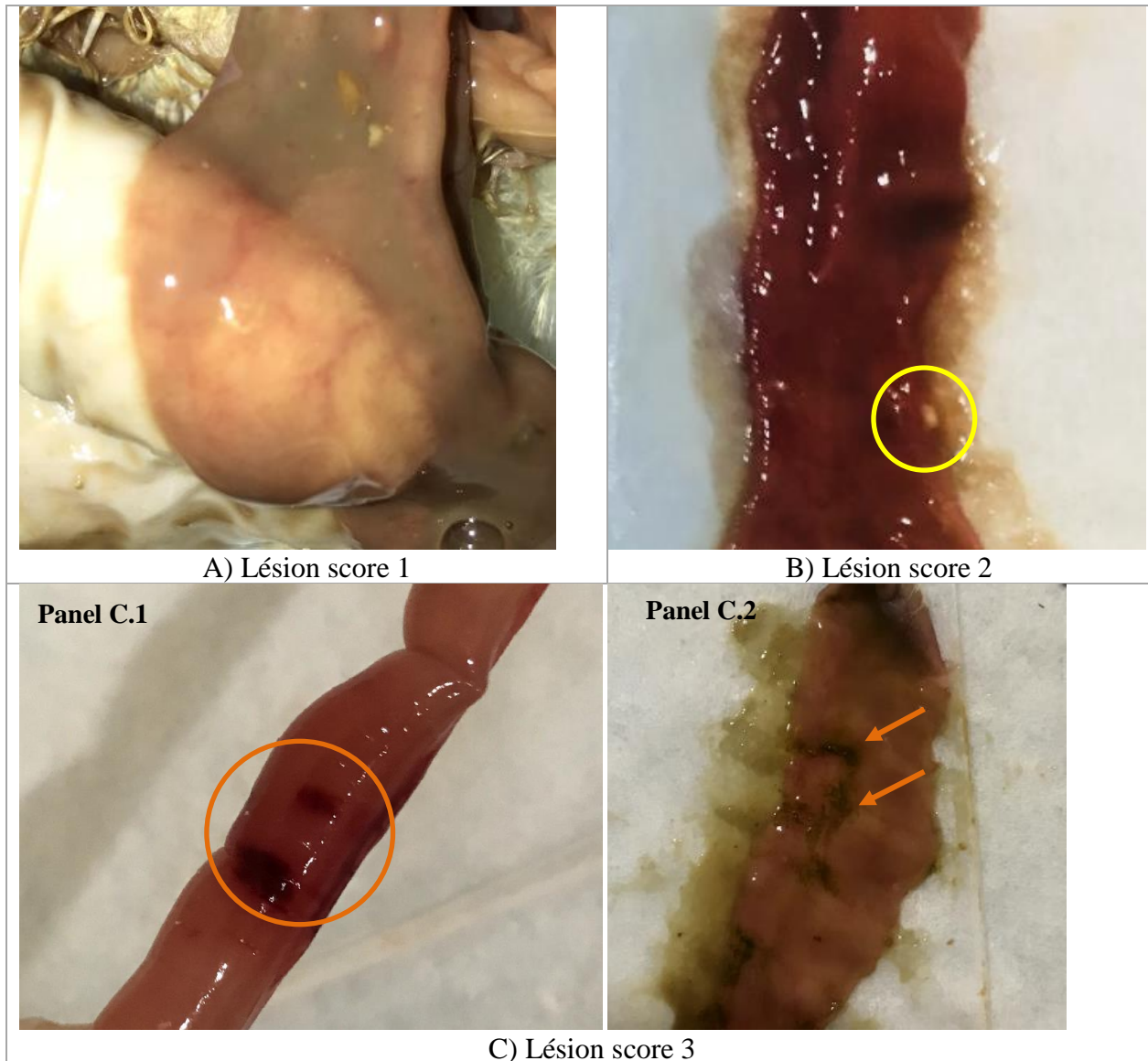


Figure 43. Lésions de l'entérite nécrotique (Score 1 : l'intestin est fin et friable ; Score 2. La photo montre l'intestin mince et friable avec une petite tache de nécrose (cercle jaune). Il y a aussi des rougeurs dans le tractus intestinal, et un peu de mucus gris qui en est caractéristique; de score 3 : l'intestin montre une lésion plus grande visible à travers la paroi extérieure du tractus intestinal. Il y a des taches de nécrose plus grandes (cercle et flèches orange), qui sont les zones vertes tachées par la bile. Le panel C.1 montre le tube fermé et le panel C.2 indique le tube ouvert et exposé face interne au-dessus)

Tableau 34. Lésions intestinales. Pourcentages de mortalité, poids des animaux, FCR trouvés au 17^{ème} jour de l'essai.

	Score de lésions				Moyenne de score de lésion	Poids à 17 j	FCR	% mortalité
	0	1	2	3				
NCp	9	9	6	0	0,88 ± 0,8 ^C	765,00 ± 33,7 ^a	1,225 ± 0,02 ^B	0 ± 0
Cp	5	4	9	6	1,67 ± 1,09 ^{AB}	699,58 ± 35,2 ^c	1,245 ± 0,04 ^{AB}	8.33 ± 12,9
<i>Lb. reuteri</i> ICVB 416	4	12	5	3	1,29 ± 0,91 ^{BC}	709,79 ± 62,3 ^{bc}	1,255 ± 0,05 ^{AB}	8.33 ± 20,41
<i>Lb. salivarius</i> ICVB 421	0	8	12	4	1,83 ± 0,70 ^A	744,58 ± 45,7 ^{abc}	1,244 ± 0,04 ^{AB}	4.17 ± 10,21
<i>Lb. salivarius</i> ICVB 430	2	11	8	3	1,50 ± 0,83 ^{AB}	707,50 ± 61,4 ^{bc}	1,277 ± 0,05 ^A	12.5 ± 20,91
ICVB 416 + ICVB 421	0	12	8	4	1,67 ± 0,76 ^{AB}	713,75 ± 34,9 ^{abc}	1,241 ± 0,02 ^{AB}	4.17 ± 10,21
ICVB 416 + ICVB 430	4	16	4	0	1,00 ± 0,59^C	753,13 ± 36,9^{ab}	1,232 ± 0,03 ^{AB}	8.33 ± 12,90
ICVB 416 + ICVB 421 + ICVB 430	1	10	10	2	1,56 ± 0,73 ^{AB}	710,35 ± 39,6 ^{bc}	1,250 ± 0,03 ^{AB}	12.5 ± 13,69

Les lettres en index montrent de différences significatives. Les groupes qui possèdent la même lettre ne sont pas différents significativement. **NCp** : Groupe témoin non supplémenté en lactobacilles et non challengé avec *C. perfringens*. **Cp** : Groupe témoin positif, non supplémenté en lactobacilles et challengé à partir du jour 14 avec *C. perfringens* ; ***Lb. reuteri* ICVB416** : supplémenté en lactobacille et challengé ; ***Lb. salivarius* ICVB 421** : supplémenté en lactobacille et challengé ; ***Lb. salivarius* ICVB 430** : supplémenté en lactobacille et challengé ; **ICVB 416 + ICVB 421** : supplémenté en mélange de *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB 421 et challengé ; **ICVB 416 + ICVB 430** : supplémenté en mélange de *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB 430 et challengé. **ICVB 416 + ICVB 421+ ICVB 430** : supplémenté en mélange de *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB 421, et *Lb. salivarius* ICVB 430 et challengé.

Des différences significatives dans les mesures du poids des poulets après traitements sont apparues après l'infection par *C. perfringens*. En effet, le groupe traité avec le mélange de *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB430 présente des poids similaires (753,13g) à ceux du groupe de poulet non challengés (765g) et ils sont significativement différents du groupe infecté (699,58g). Un effet significativement différent se trouve dans le score de lésion car ce groupe présente un nombre réduit de lésions dans l'intestin (**Tableau 33**): les souches *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB430 sont synergiques et diminuent les lésions de l'intestin, c'est-à-dire, que l'effet qu'a *Lb. reuteri* ICVB416 sur les lésions quand il est inoculé sur les poulets d'une façon individuelle est augmenté par l'ajout de *Lb. salivarius* ICVB430 générant des différences significatives dans la mesure de ce paramètre.

Concernant le reste des traitements testés, il n'y a pas de différences significatives avec le témoin challengé avec *C. perfringens*, sauf la supplémentation avec *Lb. salivarius* ICVB421 dans les poulets challengés qui aggrave les lésions de l'EN. Il a été décrit que tous les BL n'ont pas d'effets probiotiques chez l'animal. Certains n'entraînent aucun changement comme mentionné ci-dessus, mais d'autres peuvent même avoir des effets néfastes sur l'animal. Même si ce phénomène n'a pas été décrit très souvent. Par exemple Oliveira et Widmer (2018) démontrent que l'administration d'un probiotique multi-souche à base de *Lactobacillus*, *Bifidobacter*, et *Strep. thermophilus* favorise l'implantation de *Cryptosporidium*.

La supplémentation avec *Lb. salivarius* ICVB430 génère de plus hautes valeurs de FCR ce qui se traduit par une diminution de la performance de l'animal car il faudra que l'animal consomme plus d'aliments pour qu'il gagne du poids corporel. Pour ce qui est du paramètre de la mortalité, celle-ci a été retrouvée dans tous les groupes challengés présentent des mortalités aux niveaux de 4,17 à 12,5% cependant ces pourcentages n'ont pas de différences significatives par rapport au groupe témoin (NCp).

En résumé les données obtenues durant cet essai *in vivo* montrent que le traitement le plus performant est celui qui utilise le mélange de *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB430. Cet effet synergique, entre deux ou plusieurs souches probiotiques, a été déjà décrit dans la littérature. Par exemple, la combinaison de *Lb. reuteri* LM1 et *Lb. salivarius* LM2 est efficace contre la spirochétose intestinale aviaire (Mappley et al., 2011). Carter et al. (2017) ont démontré l'effet protecteur exercé par la combinaison de *Lb. salivarius* 59 (à $5 \cdot 10^7$ UFC/mL) et d'*Ent. faecium* PXN33 en réduisant la colonisation de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Enteritidis S1400 chez

les poussins. Casarin Penha Filho et al. (2015) ont montré l'effet d'une solution probiotique à base de *Lactobacillus* ($1 \cdot 10^5$ UFC) sur la réduction de la colonisation par *Salmonella* lorsque cette souche était fournie aux poussins âgés de 1 à 7 jours.

Gérard et al. (2008) ont indiqué que certains lactobacilles sont particulièrement efficaces contre *C. perfringens*. Ainsi ils ont relevé une diminution de la population de *C. perfringens* dans les caeca après le traitement par *Lactobacillus* spp. Des résultats similaires ont été obtenues par Kizerwetter-Świda et Binek (2009) en utilisant *Lb. salivarius* 3d ; Geier et al. (2010) avec *Lb. johnsonii* qui réduisait le score des lésions intestinales et le FCR, mais qui n'a pas diminué la mortalité des poulets infectés ; ou Li et al. (2018) qu'après la supplémentation de *Lb. acidophilus* LAP5 dans le régime alimentaire ils ont constaté des améliorations sur la prise de poids et les taux de mortalité. Des probiotiques à base de *Lactobacillus* ont déjà été proposés comme traitement préventif de l'EN. C'est le cas de *Lb. johnsonii* FI9785 qui en étant administré à des concentrations de $1 \cdot 10^9$ UFC réduit l'étendue de la colonisation et la persistance de *C. perfringens* chez les poussins de 20 jours (La Ragione et al., 2004) ou *Lb. johnsonii* BS15 qui présente des bénéfices chez les poulets atteints d'EN subclinique. *Lb. johnsonii* BS15 améliore le développement intestinal et la digestion, ajuste la microflore intestinale en diminuant le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* pour empêcher les réductions de poids typique de l'EN subclinique car les *Bacteroidetes* sont considérées comme le principal groupe de bactéries favorisant l'utilisation des glucides (Qing et al., 2017).

D'autres *Lactobacillus* comme *Lb. fermentum* 1.2029, présentent des effets comme la réduction de la gravité des lésions de l'EN chez les poulets en régulant la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale et en atténuant l'inflammation en modifiant les niveaux d'expression d'interleukine-10, interféron- γ et TLR2 (Cao et al., 2012).

Conclusion générale

L'objectif de cette étude était d'isoler et de caractériser des bactéries potentiellement probiotiques pour prévenir, voire soigner, l'entérite nécrotique du poulet. Les souches candidates ont été isolées à partir de caeca de poulets sains élevés dans la région des Hauts-de-France. De nombreuses expériences *in vitro* ont été réalisées pour sélectionner les souches montrant l'effet antagoniste avec un potentiel probiotique afin de les tester *in vivo*.

L'étude a commencé avec 70 isolats de bactéries lactiques provenant de 3 poulets de chair sains, obtenus d'une ferme de la région des Hauts-de-France. L'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF a montré que les bactéries prédominantes dans l'échantillon appartenaient aux espèces *Lb. reuteri* (32 souches) et *Lb. salivarius* (30 souches) et dans une moindre mesure à d'autres espèces comme *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri*, *Lb. johnsonii* et *Lb. antri*. Les streptocoques isolés appartiennent aux espèces *Strep. lutetiensis* et *Strep. alactolyticus*. La technique de PCR-RAPD a permis d'établir les proximités génétiques entre les espèces de lactobacilles isolées durant cette étude. Ainsi, grâce à cette technique de PCR-RAPD, les profils en doublons ont pu être éliminés. Par application de cette méthode et d'autres critères, la suite de l'étude a porté sur 14 souches de *Lb. reuteri* et 28 souches *Lb. salivarius*.

Plusieurs critères ont été retenus afin de caractériser les souches ainsi identifiées. D'abord, un premier critère basé sur le potentiel antagoniste notamment par la présence d'une activité anti-*C. perfringens* a été jugé prépondérant. L'antagonisme révélé est essentiellement attribué à la production d'acide lactique ainsi les souches produisant des quantités comprises entre 4,65 et 15,4 g/L ont été retenues. Le troisième critère utilisé pour affiner cette sélection est la capacité de ces souches à former des biofilms, à l'instar de ceux formés par les bactéries pathogènes. L'interprétation statistique de la capacité des souches à former des biofilms a mis en relief les souches appartenant à l'espèce *Lb. salivarius* par rapport à celles de *Lb. reuteri*. A l'issue de ce criblage, seules 13 souches ont été favorablement jugées pour la suite des analyses ; il s'agissait de *Lb. reuteri* ICVB412, ICVB413, ICVB414, ICVB415, ICVB416, ICVB417, ICVB418 et ICVB493 et *Lb. salivarius* ICVB419, ICVB421, ICVB423 et ICVB430.

Les souches ainsi choisies ont été ensuite testées aux conditions mimant l'environnement gastro-intestinal du poulet. De la même manière, elles ont été analysées pour leur capacité de résistance aux conditions de pH acide, à la présence de bile et de plusieurs enzymes digestives. La survie bactérienne a été réalisée par dénombrement classique sur boîtes de Pétri et par la technique de

cytométrie en flux. Les capacités d'agrégation (auto et coagrégation) et l'innocuité des souches (analyse de l'activité hémolytique) ont été ensuite établies lors d'un deuxième criblage. A ce stade 3 souches ont été sélectionnées dont *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430 qui ont été retenues pour une analyse *in vivo*.

L'innocuité de *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430 a été confirmée par l'évaluation de leur cytotoxicité sur cellules épithéliales intestinales de la lignée HT-29 et par la recherche de la résistance aux antibiotiques. Les résultats ont montré l'absence de cytotoxicité de ces trois souches à des concentrations de 10^5 UFC/mL. Toutefois, elles présentent des résistances chromosomiques intrinsèques à certains antibiotiques comme la vancomycine.

Les capacités d'adhésion de souches ont été également évaluées. L'adhésion est une propriété fréquemment et systématiquement recherchée dans la qualification d'un probiotique car elle permet de prolonger le temps de séjour dans l'intestin pour exprimer leurs effets bénéfiques sur l'hôte. Les souches choisies présentent une adhésion similaire aux souches déjà décrites dans d'autres études entre 1 et 8% ; parmi les souches sélectionnées, les souches de *Lb. salivarius* sont les plus adhérentes.

L'analyse *in silico* des génomes des souches *Lb. reuteri* ICVB416, *Lb. salivarius* ICVB421 et *Lb. salivarius* ICVB430 a porté notamment sur la recherche des gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires, des facteurs de virulence, de résistance aux antibiotiques, la présence de gènes du système CRISPR et des gènes relatifs aux stress.

Lb. reuteri ICVB416 ne présente pas de gènes pouvant coder la synthèse de molécules antibactériennes, contrairement aux souches de *Lb. salivarius* dont les génomes semblent contenir des gènes semblables à ceux de la salivaricine selon l'analyse avec le logiciel antiSMASH et l'enterolysine A et la bactériocine LS2 selon le logiciel BAGEL 3. Aucune des trois souches ne présente de gène de virulence selon RAST, mais elles portent des gènes de résistance aux antibiotiques comme les transporteurs d'efflux multi-*drugs*. D'une façon plus spécifique, *Lb. reuteri* ICVB416 possède des gènes de résistance à la tétracycline et aux fluoroquinolones. Chez les deux souches de *Lb. salivarius* sont présents seulement les gènes de résistance aux fluoroquinolones. Les trois isolats ont montré des gènes de résistance au stress oxydatif et osmotique. Néanmoins, des éléments transposables ou des plasmides conjugatifs n'ont pas été

trouvé dans les séquences génomiques après l'analyse avec le logiciel RAST. Chez *Lb. salivarius* des gènes associés au système CRISPR sont présents.

Dans l'optique d'une commercialisation, une caractérisation des propriétés technologiques des souches de lactobacilles sélectionnées a été faite. Des tests de lyophilisation, de conservation sous forme déshydratée sur une période de 6 mois et la viabilité des souches en milieu aqueux, dans l'optique d'une administration aux animaux par l'eau de boisson, ont permis de caractériser plus concrètement ces souches. Les souches ont montré une bonne tolérance au processus de lyophilisation avec les cryoprotecteurs testés (lait écrémé et saccharose). La conservation des lyophilisats à température ambiante pendant une longue période de temps (6 mois) diminue drastiquement la viabilité des souches. Concernant la survie des souches en suspension aqueuse, les souches présentent une bonne survie qu'elles soient testées dans le PBS ou dans l'eau pendant 24h. Un dernier test sur l'inhibition croisée des trois souches choisies a été fait pour écarter l'hypothèse d'une inhibition ou d'une compétition. Selon ce test, les souches ne présentent pas d'activités inhibitrices entre elles.

Enfin, une expérience *in vivo* a été menée et pendant laquelle il a été possible de voir que l'apport d'un consortium associant les deux souches *Lb. reuteri* ICVB416 et *Lb. salivarius* ICVB430 améliorait les performances des poulets traités, qui présentaient un score de lésion similaire au groupe qui n'a pas été infecté par *C. perfringens* et des poids significativement plus élevés que ceux des poulets témoins sans ajout de souches de lactobacilles mais infecté avec *C. perfringens*.

A l'issu de ce travail et au regard des résultats obtenus, les perspectives suivantes nous semblent intéressantes à envisager :

- Réaliser une analyse métagénomique sur les caeca de poulets de l'expérience *in vivo* pour voir les effets sur le microbiote dans les animaux challengés.
- Répéter l'essai *in vivo* pour vérifier les données obtenues et pouvoir analyser d'autres aspects comme l'effet sur l'inflammation et le système immunitaire. Dans ce contexte aussi, il faudrait designer une approche moléculaire en utilisant des amorces de qPCR spécifiques pour évaluer l'efficacité et la persistance des souches choisies pendant le temps d'administration.

- Trouver une méthode de conservation de souches permettant de prolonger la survie lors du stockage.
- A long terme, cela serait également intéressant d’imaginer et mettre au point des probiotiques de la prochaine génération en utilisant les technologies basées sur le système CRISPR-Cas9 chez les souches qui possèdent déjà ce système. Avec ce mécanisme, on pourrait améliorer leur potentiel thérapeutique pour
 - (i) administrer des vaccins par le mécanisme d'expression d'un antigène de *C. perfringens* ou de ses toxines modifiées, et de cette façon stimuler la réponse immunitaire des poulets face à l’entérite nécrotique.
 - (ii) modifier leur capacité de résistance aux conditions gastro-intestinales par une production maximale de BSH, ou par modification de la couche superficielle des souches bactériennes, pour améliorer la quantité de bactéries qui survivent au passage du tractus gastrointestinal.
 - (iii) éliminer les résistances aux antibiotiques présentes dans leur génome.

Références bibliographiques

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., and Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 79, 316–325. doi:10.1016/j.lwt.2017.01.041.
- Acar, J., Casewell, M., Freeman, J., Friis, C., and Goossens, H. (2000). Avoparcin and virginiamycin as animal growth promoters : a plea for science in decision-making. *Clin. Microbiol. Infect.* 6, 477–482. doi:10.1046/j.1469-0691.2000.00128.x.
- Ait Seddik, H., Bendali, F., Cudennec, B., and Drider, D. (2017). Anti-pathogenic and probiotic attributes of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum* strains isolated from feces of Algerian infants and adults. *Res. Microbiol.* 168, 244–254. doi:10.1016/j.resmic.2016.12.003.
- Ait Seddik, H., Ceugniz, A., Bendali, F., Cudennec, B., and Drider, D. (2016). Yeasts isolated from Algerian infants ' s feces revealed a burden of *Candida albicans* species , non - *albicans* *Candida* species and *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 198, 71–81. doi:10.1007/s00203-015-1152-x.
- Al Atya, A. K., Belguesmia, Y., Chataigne, G., Ravallec, R., Vachée, A., Szunerits, S., et al. (2016). Anti-MRSA activities of enterocins DD28 and DD93 and evidences on their role in the inhibition of biofilm formation. *Front. Microbiol.* 7, 817. doi:10.3389/fmicb.2016.00817.
- Alakomi, H., Skyttä, E., Saarela, M., and Helander, I. M. (2005). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2000–2005. doi:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.Updated.
- Alexander, D. J. (2000). Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 19, 443–462. doi:10.1016/B978-1-4557-0297-8.00402-X.
- Alexander, D. J. (2001). Newcastle disease. *Br. Poult. Sci.* 42, 5–22. doi:10.1080/713655022.
- Alexander, D. J., and Capua, I. (2008). Avian influenza in poultry. *Worlds. Poult. Sci. J.* 64, 513–531. doi:10.1017/S0043933908000184.
- Alizadeh, M., Rogiewicz, A., Mcmillan, E., Patterson, R., and Slominski, B. A. (2016). Effect of yeast-derived products and distillers dried grains with solubles (DDGS) on growth performance and local innate immune response of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *Avian Pathol.* 45, 334–345. doi:10.1080/03079457.2016.1155693.
- Allos, B. M. (2001). *Campylobacter jejuni* Infections : Update on Emerging Issues and Trends. *Clin. Infectious Dis.* 32, 1201–1206.
- Ammor, M. S., Florez, A. B., and Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24, 559–570. doi:10.1016/j.fm.2006.11.001.
- Anderson, R. C., Cookson, A. L., McNabb, W. C., Park, Z., Mccann, M. J., Kelly, W. J., et al. (2010). *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol.* 10, 316.
- Annett, C. B., Viste, J. R., Chirino-Trejo, M., Classen, H. L., Middleton, D. M., and Simko, E. (2002). Necrotic enteritis : Effect of barley , wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathol.* 31, 598–601. doi:10.1080/0307945021000024544.
- ANSES (2010). *Clostridium perfringens*. 2–4.
- ANSES (2017). Suivi des ventes de médicaments des antibiotiques contenant vétérinaires en France en 2016.
- Antonissen, G., Croubels, S., Pasmans, F., Ducatelle, R., Eeckhaut, V., Devreese, M., et al. (2015). Fumonisin affect the intestinal microbial homeostasis in broiler chickens , predisposing to

- necrotic enteritis. *Vet. Res.* 46, 1–11. doi:10.1186/s13567-015-0234-8.
- Antonissen, G., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Timbermont, L., et al. (2014). The Mycotoxin Deoxynivalenol Predisposes for the Development of *Clostridium perfringens*-Induced Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *PLoS One* 9, e108775. doi:10.1371/journal.pone.0108775.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., and Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poult. Sci. J.* 60. doi:10.1079/WPS200415.
- Apajalahti, J., and Vienola, K. (2016). Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 221, 323–330. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.05.004.
- Arrieta, M. C., Bistriz, L., and Meddings, J. B. (2006). Alterations in intestinal permeability. *Gut* 55, 1512–1520. doi:10.1136/gut.2005.085373.
- Arruda, P. H. E., Madson, D. M., Ramirez, A., Rowe, E. W., and Songer, J. G. (2016). Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *Can. Vet. J.* 57, 183–188.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 5, 209–219. doi:10.1586/14737159.5.2.209.
- Ashayerizadeh, A., Dabiri, N., Mirzadeh, K., and Ghorbani, M. R. (2011). Effects of dietary inclusion of several biological feed additives on growth response of broiler chickens. *J. Cell Anim. Biol.* 5, 61–65.
- Ashraf, R., and Shah, N. P. (2014). Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54, 938–956. doi:10.1080/10408398.2011.619671.
- Avis de l'Anses (2016). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la saisine n 2016-SA-0160 concernant l'utilisation de la colistine en médecine vétérinaire. doi:2011-SA-0133.
- Awad, W. A., Hess, C., and Hess, M. (2018). Re-thinking the chicken-*Campylobacter jejuni* interaction: a review. *Avian Pathol.* doi:10.1080/03079457.2018.1475724.
- Awan, M. A., Otte, M. J., and James, A. D. (1994). The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: A review. *Avian Pathol.* 23, 405–423. doi:10.1080/03079459408419012.
- Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., and Lindgren, S. E. (1989). Production of a Broad Spectrum Antimicrobial Substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2, 131–136. doi:10.3109/08910608909140210.
- Azizpour, K., Bahrambeygi, S., Mahmoodpour, S., and Azizpour, A. (2009). History and Basic of probiotics. *Res. J. Biol. Sci.* 4, 409–426.
- Bai, D. M., Wei, Q., Yan, Z. H., Zhao, X. M., Li, X. G., and Xu, S. M. (2003). Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid. *Biotechnol. Lett.* 25, 1833–1835. doi:10.1023/A:1026276925649.
- Bakour, S., Sankar, S. A., Rathored, J., and Biagini, P. (2016). Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics. *Future Microbiol.* 11. doi:10.2217/fmb.15.149.
- Banerjee, G., and Ray, A. K. (2017). The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* 115, 66–77. doi:10.1016/j.rvsc.2017.01.016.
- Barbara, A. J., Trinh, H. T., Glock, R. D., and Songer, J. G. (2008). Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of

- chicks. *Vet. Microbiol.* 126, 377–382. doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.019.
- Barrett, E., Hayes, M., Connor, P. O., Gardiner, G., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., et al. (2007). Salivaricin P, One of a Family of Two-Component Antilisterial Bacteriocins Produced by Intestinal Isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3719–3723. doi:10.1128/AEM.00666-06.
- Baruzzi, F., Quintieri, L., Morea, M., and Caputo, L. (2011). “Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food,” in *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, ed. A. Mendez-Vilas (Formatex Research Center), 1102–1111.
- Begley, M., Gahan, C. G. M., and Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625–651. doi:10.1016/j.femsre.2004.09.003.
- Begley, M., Hill, C., and Gahan, C. G. M. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729–1738. doi:10.1128/AEM.72.3.1729.
- Belguesmia, Y., Choiset, Y., Pr, H., Dalgalarroondo, M., Chobert, J., and Drider, D. (2010). Partial purification and characterization of the mode of action of enterocin S37: A bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *J. Environmental Public Heal.*, 1–8. doi:10.1155/2010/986460.
- Bendali, F., Hebraud, M., and Sadoun, D. (2014). Anti-bacterial and anti-adherence activities of a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei* against *Listeria monocytogenes*. 2, 52–63.
- Bennedsen, M., Stuer-Lauridsen, B., Danielsen, M., and Johansen, E. (2011). Screening for antimicrobial resistance genes and virulence factors via genome sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2785–2787. doi:10.1128/AEM.02493-10.
- Bhardwaj, A. K., Vinothkumar, K., and Rajpara, N. (2013). Bacterial Quorum Sensing Inhibitors: Attractive Alternatives for Control of Infectious Pathogens Showing Multiple Drug Resistance. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.*, 68–83.
- Bird, I. M. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *Br. Med. J.* 299, 783–787. doi:10.1136/bmj.299.6702.783.
- Birri, D. J., Brede, D. A., and Nes, I. F. (2012). Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from a healthy infant. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 402–410. doi:10.1128/AEM.06588-11.
- Bjerrum, L., Engberg, R. M., Leser, T. D., Jensen, B. B., Finster, K., and Pedersen, K. (2006). Microbial Community Composition of the Ileum and Cecum of Broiler Chickens as Revealed by Molecular and Culture-Based Techniques. *Poult. Sci.* 85, 1151–1164.
- Blaabjerg, S., Artzi, D. M., and Aabenhus, R. (2017). Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Outpatients — A Systematic Review. *Antibiotics* 6, 21. doi:10.3390/antibiotics6040021.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
- Blajman, J. E., Olivero, C. A., Fusari, M. L., Zimmermann, J. A., Rossler, E., Berisvil, A. P., et al. (2017). Impact of lyophilized *Lactobacillus salivarius* DSPV 001P administration on growth performance, microbial translocation, and gastrointestinal microbiota of broilers reared under low ambient temperature. *Res. Vet. Sci.* 114, 388–394. doi:10.1016/j.rvsc.2017.07.011.
- Blanchard, A. E., Liao, C., and Lu, T. (2016). An Ecological Understanding of Quorum Sensing-Controlled Bacteriocin Synthesis. *Cell. Mol. Bioeng.* 9, 443–454. doi:10.1007/s12195-016-0447-6.

- Botha, M., Botes, M., Loos, B., Smith, C., and Dicks, L. M. T. (2012). *Lactobacillus equigenerosi* strain Le1 invades equine epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4248–4255. doi:10.1128/AEM.00552-12.
- Brisbin, J. T., Davidge, L., Roshdieh, A., and Sharif, S. (2015). Characterization of the effects of three *Lactobacillus* species on the function of chicken macrophages. *Res. Vet. Sci.* 100, 39–44. doi:10.1016/j.rvsc.2015.03.003.
- Brisbin, J. T., Gong, J., Orouji, S., Esufali, J., Mallick, A. I., Parvizi, P., et al. (2011). Oral treatment of chickens with Lactobacilli influences elicitation of immune responses. *Clin. vaccine Immunol.* 18, 1447–1455. doi:10.1128/CVI.05100-11.
- Bron, P. A., and Kleerebezem, M. (2011). Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. *Bioeng. Bugs* 2, 80–87. doi:10.4161/bbug.2.2.13910.
- Brooks, J. P., Edwards, D. J., Harwich, M. D., Rivera, M. C., Fettweis, J. M., Serrano, M. G., et al. (2015). The truth about metagenomics: Quantifying and counteracting bias in 16S rRNA studies Ecological and evolutionary microbiology. *BMC Microbiol.* 15, 1–14. doi:10.1186/s12866-015-0351-6.
- Broom, L. J. (2017). Necrotic enteritis ; current knowledge and diet-related mitigation. *Worlds. Poult. Sci. J.* 73. doi:10.1017/S0043933917000058.
- Brown, K., Uwiera, R. R. E., Kalmokoff, M. L., Brooks, S. P. J., and Inglis, G. D. (2017). Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 12–24. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006.
- Bunthof, C. J., Bloemen, K., Breeuwer, P., Rombouts, F. M., and Abee, T. (2001). Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2326–2335. doi:10.1128/AEM.67.5.2326-2335.2001.
- Buntin, N., Vos, W. M. De, and Hongpattarakere, T. (2017). Variation of mucin adhesion , cell surface characteristics , and molecular mechanisms among *Lactobacillus plantarum* isolated from different habitats. doi:10.1007/s00253-017-8482-3.
- Bywater, R. J. (2005). Identification and Surveillance of Antimicrobial Resistance What is the Contribution of Animal Sources. *Poult. Sci.* 84, 644–648.
- Cadieux, P., Wind, A., Sommer, P., Schaefer, L., Crowley, K., Britton, R. A., et al. (2008). Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4645–4649. doi:10.1128/AEM.00139-08.
- Calefi, A. S., Takashi, B., Honda, B., Costola-de-souza, C., Siqueira, A. De, Namazu, L. B., et al. (2018). Effects of long-term heat stress in an experimental model of avian necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 93, 1344–1353.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Harvey, R. B., Genovese, K. J., Kennedy, C. N., et al. (2008). Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. *Anim. Heal. Res. Rev.* 9, 217–225. doi:10.1017/S1466252308001540.
- Caly, D. L., Chevalier, M., Flahaut, C., Cudennec, B., Al Atya, A. K., Chataigné, G., et al. (2017). The safe enterocin DD14 is a leaderless two-peptide bacteriocin with anti-*Clostridium perfringens* activity. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 282–289. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.016.
- Caly, D. L., D’Inca, R., Auclair, E., and Drider, D. (2015). Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: A microbiologist’s perspective. *Front. Microbiol.* 6, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2015.01336.
- Campana, R., Van Hemert, S., and Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic

- acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathog.* 9, 1–12. doi:10.1186/s13099-017-0162-4.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., et al. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int. J. Food Microbiol.* 125, 286–292. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.012.
- Cao, L., Li, C., Yang, X. J., Li, Z. J., Sun, F. F., Wu, X. H., et al. (2012). Reduced lesions in chickens with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis by *Lactobacillus fermentum* 1.2029. *Poult. Sci.* 91, 3065–71. doi:10.3382/ps.2012-02548.
- Carnevali, O., Maradonna, F., and Gioacchini, G. (2017). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture* 472, 144–155. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.03.037.
- Cars, O. (2008). Meeting the challenge of antibiotic resistance. *BMJ* 337, 726–728.
- Carter, A., Adams, M., La Ragione, R. M., and Woodward, M. J. (2017). Colonisation of poultry by *Salmonella* Enteritidis S1400 is reduced by combined administration of *Lactobacillus salivarius* 59 and *Enterococcus faecium* PXN-33. *Vet. Microbiol.* 199, 100–107. doi:10.1016/j.vetmic.2016.12.029.
- Casarin Penha Filho, R. A., Acelas Díaz, S. J., Santos Fernando, F., Chang, Y. F., Andreatti Filho, R. L., and Berchieri Junior, A. (2015). Immunomodulatory activity and control of *Salmonella* Enteritidis colonization in the intestinal tract of chickens by *Lactobacillus* based probiotic. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 167, 64–69. doi:10.1016/j.vetimm.2015.06.006.
- Cassir, N., Benamar, S., and Scola, B. La (2016). *Clostridium butyricum* : from beneficial to a new emerging pathogen. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 37–45. doi:10.1016/j.cmi.2015.10.014.
- CDC (2016). One Health. Available at: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/history/index.html> [Accessed August 30, 2018].
- Ceugniez, T. D. A., Ille, U. N. L., Et, S. C., Octorat, T. H. D. E. D., and Ceugniez, A. (2017). par Recherche de levures antagonistes , à potentiel probiotique , dans les produits du Terroir du Nord-Pas-de-Calais Étude de *Kluyveromyces marxianus* et *K. lactis* , isolées d ’ un fromage.
- Chang, M. H., and Chen, T. C. (2000). Reduction of *Campylobacter jejuni* in a Simulated Chicken Digestive Tract by Lactobacilli Cultures. *J. Food Prot.* 63, 1594–1597.
- Chauviere, G., Coconnier, M.-H., Kerneis, S., Fourniat, J., and Servin, A. L. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* 138, 1689–1696. doi:10.1099/00221287-138-8-1689.
- Chen, Y., Liang, W., Yang, S., Wu, N., Gao, H., Sheng, J., et al. (2013). Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: Clinical analysis and characterisation of viral genome. *Lancet* 381, 1916–1925. doi:10.1016/S0140-6736(13)60903-4.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., and Huang, L. (2014). Antibiotic alternatives : the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 1–15. doi:10.3389/fmicb.2014.00217.
- Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., and Dicks, L. M. T. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 23–28. doi:10.1016/j.copbio.2017.07.011.
- Clench, M., and Mathias, J. (1995). The avian cecum: a review. *Wilson Bull.* 107, 93–121. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4163516>.
- Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., Duboux, M., and Le Blay, G. (2007). Inhibitory activity

- spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria. *BMC Microbiol.* 7, 101. doi:10.1186/1471-2180-7-101.
- Coburn, B., Grassl, G. A., and Finlay, B. (2007). *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunol. Cell Biol.* 85, 112–118. doi:10.1038/sj.icb.7100007.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2007a). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 454–460. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02212.x.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1065–1073. doi:10.1007/s00217-007-0632-x.
- Collado, M. C., Surono, I., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2007b). Indigenous dadih lactic acid bacteria: Cell-surface properties and interactions with pathogens. *J. Food Sci.* 72, 89–93. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00294.x.
- Collier, C. T., Hofacre, C. L., Payne, A. M., Anderson, D. B., Kaiser, P., and Gaskings, H. R. (2008). Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 122, 104–115. doi:10.1016/j.vetimm.2007.10.014.
- Collins, F. W. J., O'Connor, P. M., O'Sullivan, O., Gómez-Sala, B., Rea, M. C., Hill, C., et al. (2017). Bacteriocin Gene-Trait matching across the complete *Lactobacillus* Pan-genome. *Sci. Rep.* 7, 1–14. doi:10.1038/s41598-017-03339-y.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., et al. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium* : Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812–826.
- Cooper, K. K., and Songer, J. G. (2009). Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe* 15, 55–60. doi:10.1016/j.anaerobe.2009.01.006.
- Cooper, K. K., Songer, J. G., and Uzal, F. A. (2013). Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 25, 314–327. doi:10.1177/1040638713483468.
- Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., and Ross, R. P. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3060–3067. doi:10.1128/AEM.71.6.3060.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., and Gahan, C. G. M. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 7617–7621. doi:10.1073/pnas.0700440104.
- Corthésy, B., Gaskins, H. R., and Mercenier, A. (2007). Cross-Talk between Probiotic Bacteria and the Host Immune System. *J. Nutr.*, 781S–790S.
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms : A Common Cause of Persistent Infections. *Science* (80-.). 284, 1318. doi:10.1126/science.284.5418.1318.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2012). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics ? *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 95–105. doi:10.1038/nrmicro2937.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564–582.
- Cox, G., and Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 287–292. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
- Crociani, J., Grill, J., Huppert, M., and Ballongue, J. (1995). Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol.* 21. doi:1/j.1472-765X.1995.tb01027.x.

- Cuperus, T., Coorens, M., van Dijk, A., and Haagsman, H. P. (2013). Avian host defense peptides. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 352–369. doi:10.1016/j.dci.2013.04.019.
- Curry, S. R., Marsh, J. W., Schlackman, J. L., and Harrison, L. H. (2012). Prevalence of clostridium difficile in uncooked ground meat products from Pittsburgh, Pennsylvania. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4183–4186. doi:10.1128/AEM.00842-12.
- Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V. A., et al. (2016). Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review. *Lancet Infect. Dis.* 16, 239–251. doi:10.1016/S1473-3099(15)00466-1.
- Dahiya, J. P., Hoehler, D., Wilkie, D. C., Kessel, A. G. Van, and Drew, M. D. (2005). Dietary Glycine Concentration Affects Intestinal *Clostridium perfringens* and Lactobacilli Populations in Broiler Chickens 1. *Poult. Sci.* 84, 1875–1885.
- Dahiya, J. P., Wilkie, D. C., Van Kessel, A. G., and Drew, M. D. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129, 60–88. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.12.003.
- Dale, E., and Brown, C. (2013). Zoonotic Diseases from Poultry. *Brazilian J. Vet. Pathol.* 6, 76–82.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G., and Verstraete, W. (2000). Protective effect of the bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 709–714. doi:10.1007/s002530000330.
- De Castro Cardoso, P. M., Filipa, A., and Baltazar Vicente, A. F. (2013). Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Sci.* 93, 586–592. doi:10.1016/j.meatsci.2012.09.018.
- De Gregorio, P. R., Tomás, M. S. J., Terraf, M. C. L., and Nader-Macías, M. E. F. (2014). *In vitro* and *in vivo* effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *J. Med. Microbiol.* 63, 685–696. doi:10.1099/jmm.0.069401-0.
- De Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E. (1960). A Medium For The Cultivation Of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 130–135.
- Derache, C., Esnault, E., Bonsergent, C., Le Vern, Y., Quéré, P., and Lalmanach, A.-C. (2009a). Differential modulation of b-defensin gene expression by *Salmonella* Enteritidis in intestinal epithelial cells from resistant and susceptible chicken inbred lines. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 959–966. doi:10.1016/j.dci.2009.03.005.
- Derache, C., Labas, V., Aucagne, V., Meudal, H., Landon, C., Delmas, A. F., et al. (2009b). Primary Structure and Antibacterial Activity of Chicken Bone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4647–4655. doi:10.1128/AAC.00301-09.
- Devirgiliis, C., Zinno, P., and Perozzi, G. (2013). Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Front. Microbiol.* 4, Article 301. doi:10.3389/fmicb.2013.00301.
- Diaz Carrasco, J. M., Redondo, L. M., Redondo, E. A., Dominguez, J. E., Chacana, A. P., and Fernandez Miyakawa, M. E. (2016). Use of Plant Extracts as an Effective Manner to Control *Clostridium perfringens* Induced Necrotic Enteritis in Poultry. *Biomed Res. Int.* 2016, 3278359.
- Ding, W. K., and Shah, N. P. (2007). Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. *Food Microbiol. Saf.* 72, 446–450. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00565.x.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890. doi:10.3201/eid0809.020063.

- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–19. doi:10.1128/CMR.15.2.167.
- Donohoe, D. R., Garge, N., Zhang, X., Sun, W., O’Connell, T. M., Bunger, M. K., et al. (2012). The Microbiome and Butyrate Regulate Energy Metabolism and Autophagy in the Mammalian Colon. *Cell Metab.* 13, 517–526. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.018.
- Drew, M. D., Syed, N. A., Goldade, B. G., Laarveld, B., and Kessel, A. G. Van (2004). Effects of Dietary Protein Source and Level on Intestinal Populations of *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens. *Poult. Sci.* 83, 414–420.
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., and Chikindas, M. L. (2016). Bacteriocins : Not only antibacterial agents. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 8, 177–182. doi:10.1007/s12602-016-9223-0.
- Drider, D., and Rebuffat, S. (2011). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*. Springer New York Available at: <https://books.google.fr/books?id=33fADjPoB8gC>.
- Drider, D., and Salvat, G. (2015). *Securité sanitaire des aliments*. Economica.
- Dumonceaux, T. J., Hill, J. E., Hemmingsen, S. M., and Kessel, A. G. Van (2006). Characterization of Intestinal Microbiota and Response to Dietary Virginiamycin Supplementation in the Broiler Chicken Characterization of Intestinal Microbiota and Response to Dietary Virginiamycin Supplementation in the Broiler Chicken †. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2815–2823. doi:10.1128/AEM.72.4.2815.
- Dziva, F., and Stevens, M. P. (2008). Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol.* 37, 355–366. doi:10.1080/03079450802216652.
- ECDPC (2016). European Centre for Disease Prevention and Control Salmonellosis -Annual Epidemiological Report 2016 [2014 data] - Internet. Available at: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/Salmonellosis - Annual Epidemiological Report 2016 %5B2014 data%5D.pdf>.
- EFSA (2007). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. doi:10.2903/j.efsa.2007.587.
- EFSA, and ECDC (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses , zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. doi:10.2903/j.efsa.2017.5077.
- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., and Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J. Appl. Microbiol.* 92, 966–975.
- Elferink, S. J. W. H. O., Krooneman, J., Gottschal, J. A. N. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., and Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 125–132. doi:10.1128/AEM.67.1.125-132.2001.
- Elliker, P. R., Anderson, A. W., and Hannesson, G. (1956). An Agar Culture Medium for Lactic Acid Streptococci and Lactobacilli. *J. Dairy Sci.* 39, 1611–1612. doi:10.3168/jds.S0022-0302(56)94896-2.
- Elshaghabee, F. M. F., Bockelmann, W., Meske, D., Vrese, M. de, Walte, H. G., Schrezenmeir, J., et al. (2016). Ethanol production by selected intestinal microorganisms and lactic acid bacteria growing under different nutritional conditions. *Front. Microbiol.* 7, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2016.00047.
- Elshaghabee, F. M. F., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., and Panwar, H. (2017). *Bacillus*

- As Potential Probiotics : Status , Concerns , and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 8, 1490. doi:10.3389/fmicb.2017.01490.
- EMA (2015). European public MRL assessment report (EPMAR). United Kingdom.
- Er, S., Koparal, A. T., and Kivanç, M. (2015). Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. *Turkish J. Biol.* 39, 23–30. doi:10.3906/biy-1402-62.
- ESVAC (2017). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015 Trends from 2010 to 2015 (EMA/184855/2017).
- Ewaschuk, J. B., Diaz, H., Meddings, L., Diederichs, B., Dmytrash, A., Backer, J., et al. (2008). Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 295, 1025–1034. doi:10.1152/ajpgi.90227.2008.
- Ezema (2013). Probiotics in animal production : A review. *J. Vet. Med. Anim. Heal.* 5, 308–316. doi:10.5897/JVMAH2013.0201.
- FAO/OMS (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03873.
- FAO (2016a). *Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation.* , ed. Harinder P.S. Makkar FAO Animal Production and Health Paper No. 179. Rome doi:10.3920/BM2008.1002.
- FAO (2016b). The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance. Rome.
- Farrell, D. (2012). The role of poultry in human nutrition. Available at: <http://www.fao.org/docrep/013/al709e/al709e00.pdf>.
- Fasina, Y. O., and Lillehoj, H. S. (2018). Characterization of intestinal immune response to *Clostridium perfringens* infection in broiler chickens. *Poult. Sci.* 0, 1–11. doi:10.3382/ps/pey390.
- FDA (2016). Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals.
- Felis, G. E., and Dellaglio, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 8, 44–61.
- Ferket, P. R. (2006). Incubation and in ovo nutrition affects neonatal development. in *33rd Annual Carolina Poultry Nutrition Conference.*
- Fernández, L., Álvarez-ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Kocíncová, D., Lam, J. S., et al. (2013). Characterization of the polymyxin B resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 110–119. doi:10.1128/AAC.01583-12.
- Filazi, A., Yurdakok-dikmen, B., Kuzukiran, O., and Sireli, U. T. (2017). “Mycotoxins in Poultry,” in *Poultry Science* (Milad Manafi, IntechOpen). doi:10.5772/66302.
- Fonseca, F., Cenard, S., and Passot, S. (2015). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology.* , eds. W. F. Wolkers and H. Oldenhof Springer Science+Business Media New York 2015 doi:10.1007/978-1-4939-2193-5.
- Food and Agriculture Organisation (2018). Meat Market Review. *Meat Mark. Rev.*, 1–11. Available at: <http://www.fao.org/3/I9286EN/i9286en.pdf>.
- Food and Veterinary Office (2015). Residue monitoring for critically important antimicrobials. Luxembourg doi:10.2875/858963.
- Fowler, J., Kakani, R., Haq, A., Byrd, J. A., and Bailey, C. A. (2015). Growth promoting effects of prebiotic yeast cell wall products in starter broilers under an immune stress and *Clostridium perfringens* challenge.
- Friedrich, U., and Lenke, J. (2006). Improved enumeration of lactic acid bacteria in mesophilic dairy starter cultures by using multiplex quantitative real-time PCR and flow cytometry-fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4163–4171.

- doi:10.1128/AEM.02283-05.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Fuller, R. (1992). “History and development of probiotics,” in *Probiotics: The scientific basis* (Dordrecht: Springer Netherlands), 1–8. doi:10.1007/978-94-011-2364-8_1.
- Gaffga, N. H., Behraves, C. B., Etestad, P. J., Smelser, C. B., Rhorer, A. R., Cronquist, A. B., et al. (2012). Outbreak of Salmonellosis Linked to Live Poultry from a Mail-Order Hatchery. *N. Engl. J. Med.* 366, 2065–2073.
- Gaggia, F., Mattarelli, P., and Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141, S15–S28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031.
- Gänzle, M., and Gobbetti, M. (2013). “Physiology and Biochemistry of Lactic Acid Bacteria,” in *Handbook on Sourdough Biotechnology*, eds. M. Gänzle and M. Gobbetti (Springer Science+Business Media New York), 183–216. doi:10.1007/978-1-4614-5425-0.
- Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M., and Ávila, M. (2014). Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. *Food Control* 44, 22–25. doi:10.1016/j.foodcont.2014.03.034.
- Gasbarrini, G., and Bonvicini, F. (2016). Probiotics History. *J. Clin. Gastroenterol.* 50, S116-119. doi:10.1097/MCG.0000000000000697.
- Geier, M. S., Mikkelsen, L. L., Torok, V. A., Allison, G. E., Olnood, C. G., and Boulianne, M. (2010). Comparison of alternatives to in-feed antimicrobials for the prevention of clinical necrotic enteritis. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1329–1338. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04758.x.
- Gérard, P., Brézillon, C., Quéré, F., Salmon, A., and Rabot, S. (2008). Characterization of Cecal Microbiota and Response to an Orally Administered *Lactobacillus* Probiotic Strain in the Broiler Chicken. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14, 115–122. doi:10.1159/000106090.
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., and Krieg, N. R. (1994). *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Washington, D. C.: American Society for Microbiology.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Aqil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., et al. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology : A brief review on production to purification. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 7, 222–229. doi:10.1016/j.jrras.2014.03.002.
- Giesecke, J., and McCarthy, N. (2001). Incidence of Guillain-Barré Syndrome following Infection with *Campylobacter jejuni*. *Am. J. Epidemiol.* 153, 610–614. doi:10.1093/aje/153.6.610.
- GLEAM2.0. (2018). Global Livestock Environmental Assessment Model.
- Goh, Y. J., and Klaenhammer, T. R. (2010). Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5005–5012. doi:10.1128/AEM.00030-10.
- Golic, N., Veljovi, K., Popovi, N., Djoki, J., Strahini, I., Mrvaljevi, I., et al. (2017). *In vitro* and *in vivo* antagonistic activity of new probiotic culture against *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*. *BMC Microbiol.* 17. doi:10.1186/s12866-017-1015-5.
- Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 59, 425–436. doi:10.2323/jgam.59.425.
- Gómez, N. C., Ramiro, J. M. P., Quecan, B. X. V., and de Melo Franco, B. D. G. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Front. Microbiol.* 7, 863. doi:10.3389/fmicb.2016.00863.

- Gong, J., Forster, R. J., Yu, H., Chambers, J. R., Wheatcroft, R., Sabour, P. M., et al. (2002). Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum. *FEMS Microbiol. Ecol.* 41, 171–179.
- Gonzalez-Rodriguez, I., Ruiz, L., Gueimonde, M., Margolles, A., and Sanchez, B. (2013). Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol. Lett.* 340, 1–10. doi:10.1111/1574-6968.12056.
- Gould, L. H., and Limbago, B. (2010). *Clostridium difficile* in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? *Clin. Infect. Dis.* 51, 577–582. doi:10.1086/655692.
- Gouriet, F., Million, M., Henri, M., Fournier, P., and Raoult, D. (2012). *Lactobacillus rhamnosus* bacteremia : an emerging clinical entity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 2469–2480. doi:10.1007/s10096-012-1599-5.
- Granato, D., Perotti, F., Masserey, I., Rouvet, M., Golliard, M., Servin, A., et al. (1999). Cell Surface-Associated Lipoteichoic Acid Acts as an Adhesion Factor for Attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to Human Enterocyte-Like Caco-2 Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1071–1077.
- Grande Burgos, M., Pulido, R., del Carmen López Aguayo, M., Gálvez, A., and Lucas, R. (2014). The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 22706–22727. doi:10.3390/ijms151222706.
- Grant, A., Hashem, F., and Parveen, S. (2016). *Salmonella* and *Campylobacter*: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. *Food Microbiol.* 53, 104–109. doi:10.1016/j.fm.2015.09.008.
- Grazul, H., Kanda, L. L., and Gondek, D. (2016). Impact of probiotic supplements on microbiome diversity following antibiotic treatment of mice. *Gut Microbes* 7, 101–114. doi:10.1080/19490976.2016.1138197.
- Gross, G., Snel, J., Boekhorst, J., Smits, M. A., and Kleerebezem, M. (2010). Biodiversity of mannose-specific adhesion in *Lactobacillus plantarum* revisited: strain-specific domain composition of the mannose-adhesin. *Benef. Microbes* 1, 61–66. doi:10.3920/BM2008.1006.
- Gueimonde, M., Flórez, A. B., Reyes-gavilán, C. G. D. L., Margolles, A., Microbiología, D. De, Lácteos, D. P., et al. (2009). Intrinsic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria: the role of multidrug resistance transporters. *Int. J. Probiotics Prebiotics* 4, 181–186.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., and Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front. Microbiol.* 4, 1–6. doi:10.3389/fmicb.2013.00202.
- Guo, S., Liu, D., Zhang, B., Li, Z., Li, Y., Ding, B., et al. (2017). Two *Lactobacillus* species inhibit the growth and α -toxin production of *Clostridium perfringens* and induced proinflammatory factors in chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Front. Microbiol.* 8, 2081. doi:10.3389/fmicb.2017.02081.
- Gupta, R. S., and Gao, B. (2009). Phylogenomic analyses of clostridia and identification of novel protein signatures that are specific to the genus *Clostridium sensu stricto* (cluster I). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 285–294. doi:10.1099/ijss.0.001792-0.
- Hai, N. V. (2015). The use of probiotics in aquaculture. *J. Appl. Microbiol.* 119, 917–935. doi:10.1111/jam.12886.
- Hamilton-Miller, J. M. T., and Shah, S. (1998). Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 153–154. doi:10.1046/j.1472-765X.1998.00297.x.
- Han, F.-F., Liu, Y.-F., Xie, Y.-G., Gao, Y.-H., Luan, C., and Wang, Y.-Z. (2011). Antimicrobial peptides derived from different animals : comparative studies of antimicrobial properties ,

- cytotoxicity and mechanism of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1847–1857. doi:10.1007/s11274-010-0643-9.
- Han, S. K., and Shin, H. S. (2004). Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste. *Int. J. Hydrogen Energy* 29, 569–577. doi:10.1016/j.ijhydene.2003.09.001.
- Hancock, R. E. W., and Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *PNAS* 97, 8856–8861. doi:10.1073/pnas.97.16.8856.
- Handwerker, S., Pucci, M. J., Volk, K. J., Liu, J., and Lee, M. S. (1994). Vancomycin-Resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* 176, 260–264.
- Hao, Y., Gu, X. H., and Wang, X. L. (2012). Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers : 1 . Intestinal structure and digestive function. *Poult. Sci.* 91, 781–789.
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., and Foey, A. D. (2013). Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 5, 1869–1912. doi:10.3390/nu5061869.
- Hartemink, R., Domenech, V. R., and Rombouts, F. M. (1997). Methods LAMVAB — A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. 29, 77–84.
- Harvey, R. B., Norman, K. N., Andrews, K., Hume, M. E., Scanlan, C. M., Callaway, T. R., et al. (2011). *Clostridium difficile* in Poultry and Poultry Meat. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 1321–1323. doi:10.1089/fpd.2011.0936.
- Hermans, P., and Morgan, K. (2007). Prevalence and associated risk factors of necrotic enteritis on broiler farms in the United Kingdom; a cross-sectional survey. *Avian Pathol.* 36, 43–51.
- Hibberd, P. L., and Davidson, L. (2008). Probiotic Foods and Drugs : Impact of US Regulatory Status on Design of Clinical Trials. *Clin. Infect. Dis.* 1, S137-40. doi:10.1086/523321.
- Hoelzer, K., Bielke, L., Blake, D. P., Cox, E., Cutting, S. M., Devriendt, B., et al. (2018a). Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: Challenges and needs. *Vet. Res.* 49, 64. doi:10.1186/s13567-018-0560-8.
- Hoelzer, K., Bielke, L., Blake, D. P., Cox, E., Cutting, S. M., Devriendt, B., et al. (2018b). Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 2: new approaches and potential solutions. *Vet. Res.* 49, 70. doi:10.1186/s13567-018-0560-8.
- Hoerr, F. J. (2010). Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* 54, 91–99. doi:10.2298/VETGL1502091R.
- Hofacre, C. L., Smith, J. A., and Mathis, G. F. (2018). An optimist ’ s view on limiting necrotic enteritis and maintaining broiler gut health and performance in today ’ s marketing , food safety , and regulatory. *Poult. Sci.* 0, 1–5. doi:10.3382/ps/pey082/4945454.
- Hofmann, A. F., and Eckmann, L. (2006). How bile acids confer gut mucosal protection against bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 4333–4334. doi:10.1073/pnas.0600780103.
- Højby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010). International Journal of Antimicrobial Agents Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Holzappel, W. H. ., and Wood, B. J. B. (1995). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer-S. , eds. B. J. B. Wood and W. H. Holzappel Boston, MA: Springer US doi:10.1007/978-1-4615-5817-0.
- Hong, Y. H., Dinh, H., Lillehoj, H. S., Song, K., and Oh, J. (2014). Differential regulation of microRNA transcriptome in chicken lines resistant and susceptible to necrotic enteritis disease. *Poult. Sci.* 93, 1383–1395. doi:10.3382/ps.2013-03666.
- Hor, Y. Y., and Liong, M. T. (2014). Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and

- bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatologica Sin.* 32, 141–147. doi:10.1016/j.dsi.2014.03.001.
- Howard, Z. R., O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., and Ricke, S. C. (2012). *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Res. Int.* 45, 755–764. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.030.
- Hynönen, U., and Palva, A. (2013). *Lactobacillus* surface layer proteins: Structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5225–5243. doi:10.1007/s00253-013-4962-2.
- Immerseel, F. Van, Buck, J. De, Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Immerseel, F. Van, et al. (2010). *Clostridium perfringens* in poultry : an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33, 537–549. doi:10.1080/03079450400013162.
- Iowa State University (2016). Newcastle Disease.
- Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Ho, Y., et al. (2013). Relative Disease Susceptibility and Clostridial Toxin Antibody Responses in Three Commercial Broiler Lines Coinfected with *Clostridium perfringens* and *Eimeria maxima* Using an Experimental Model of Necrotic Enteritis Research Note — Relative Disease Suscep. *Avian Dis.* 57, 684–687.
- Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., and Chirakkal, H. (2018). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens* -induced necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 92, 370–374. doi:10.3382/ps.2012-02528.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., and Jalaludin, S. (1998). Growth performance, intestinal microbial populations , and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poult. Sci.* 77, 1259–1265. doi:10.1093/ps/77.9.1259.
- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult. Sci.* 82, 640–647. doi:10.1093/ps/82.4.640.
- Johnson, R. P., Gyles, C. L., Huff, W. E., Ojha, S., Huff, G. R., Rath, N. C., et al. (2008). Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. *Anim. Heal. Res. Rev.* 9, 201–215. doi:10.1017/S1466252308001576.
- Jones, S. E., and Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol.* 9, 1–9. doi:10.1186/1471-2180-9-35.
- Joosten, H. M. L. J., and Nuñez, M. (1995). Adsorption of nisin and enterocin 4 to polypropylene and glass surfaces and its prevention by Tween 80. *Let. Appl. Microbiol.* 21, 389–392. doi:10.1111/j.1472-765X.1995.tb01089.x.
- Joyce, S. A., Macsharry, J., Casey, P. G., Kinsella, M., Murphy, E. F., and Shanahan, F. (2014). Regulation of host weight gain and lipid metabolism by bacterial bile acid modification in the gut. *PNAS* 111, 7421–7426. doi:10.1073/pnas.1323599111.
- Juncioni de Arauz, L., Faustino Jozala, A., Gava Mazzola, P., and Vessoni Penna, T. C. (2009). Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 20, 146–154. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.056.
- Kaakoush, N. O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H. M., and Man, S. M. (2015). Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 687–720. doi:10.1128/CMR.00006-15.
- Kabir, S. M. L. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3531–3546. doi:10.3390/ijms10083531.
- Kanai, T., Mikami, Y., Hayashi, A., and Interleukin-, M. Á. (2015). A breakthrough in probiotics : *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in

- inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol.* 50, 928–939. doi:10.1007/s00535-015-1084-x.
- Kang, M., Lim, H., Oh, J., Lim, Y., Wuertz-kozak, K., Harro, J. M., et al. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 75, ftx009. doi:10.1093/femspd/ftx009.
- Kariuki, S., Gordon, M. A., Feasey, N., and Parry, C. M. (2015). Antimicrobial resistance and management of invasive *Salmonella* disease. *Vaccine* 33, C21–C29. doi:10.1016/j.vaccine.2015.03.102.
- Keessen, E. C., Gaastra, W., and Lipman, L. J. A. (2011). *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. *Vet. Microbiol.* 153, 205–217. doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.020.
- Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., Smidt, H., et al. (2018). Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Front. Microbiol.* 9, 235. doi:10.3389/fmicb.2018.00235.
- Keto-Timonen, R., Heikinheimo, A., Eerola, E., and Korkeala, H. (2006). Identification of *Clostridium* Species and DNA Fingerprinting of *Clostridium perfringens* by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis □. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4057–4065. doi:10.1128/JCM.01275-06.
- Keyburn, A. L., Bannam, T. L., Moore, R. J., and Rood, J. I. (2010). NetB, a Pore-Forming Toxin from Necrotic Enteritis Strains of *Clostridium perfringens*. 1913–1927. doi:10.3390/toxins2071913.
- Keyburn, A. L., Boyce, J. D., Vaz, P., Bannam, T. L., Ford, M. E., Parker, D., et al. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog.* 4. doi:10.1371/journal.ppat.0040026.
- Keyburn, A. L., Portela, R. W., Sproat, K., Ford, M. E., Bannam, T. L., Yan, X., et al. (2013). Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Vet. Res.* 44, 1. doi:10.1186/1297-9716-44-54.
- Keyburn, A. L., Sheedy, S. A., Ford, M. E., Williamson, M. M., Awad, M. M., Rood, J. I., et al. (2006). Alpha-Toxin of *Clostridium perfringens* Is Not an Essential Virulence Factor in Necrotic Enteritis in Chickens □. *Infect. Immun.* 74, 6496–6500. doi:10.1128/IAI.00806-06.
- Khan, M. M. T., Pyle, B. H., and Camper, A. K. (2010). Specific and rapid enumeration of viable but nonculturable and viable-culturable gram-negative bacteria by using flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5088–5096. doi:10.1128/AEM.02932-09.
- Kiczorowska, B., Samolińska, W., Al-Yasiry, A. R. M., Kiczorowski, P., and Winiarska-Mieczan, A. (2017). The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition – a review. *Ann. Anim. Sci.* 17, 605–625. doi:10.1515/aoas-2016-0076.
- Kim, D. H., and Austin, B. (2008). Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Let. Appl. Microbiol.* 47, 141–147. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02401.x.
- Kizerwetter-Świda, M., and Binek, M. (2009). Protective effect of potentially probiotic *Lactobacillus* strain on infection. *Polish J. Vet. Sci. Vol.* 12, 15–20.
- Kizerwetter-Świda, M., and Binek, M. (2016). Assessment of potentially probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* 19, 15–20. doi:10.1515/pjvs-2016-0003.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., et al. (2007). Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates

- and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 900–912. doi:10.1093/jac/dkm035.
- Knap, A. I., Lund, B., Kehlet, A. B., Hofacre, C., Mathis, G., Knap, I., et al. (2010). *Bacillus licheniformis* prevents necrotic enteritis in broiler chickens research. *Avian Dis.* 54, 931–935. doi:10.1637/9106-101509-ResNote.1.
- Kon, K., and Rai, M. (2016). *Antibiotic resistance. Mechanisms and New Antimicrobial Approaches.*, eds. K. Kon and M. Rai Academic Press doi:10.1016/B978-0-12-803642-6.00018-6.
- Kondo, F., Tottori, J., and Soki, K. (1988). Ulcerative enteritis in broiler chickens caused by *Clostridium colinum* and *in vitro* activity of 19 antimicrobial agents in tests on isolates. *Poult. Sci.* 67, 1424–1430. doi:10.3382/ps.0671424.
- Koransky, J. R., Stargel, M. D., and Dowell, V. R. (1979). *Clostridium septicum* bacteremia. Its clinical significance. *Am. J. Med.* 66, 63–66. doi:10.1016/0002-9343(79)90483-2.
- Kos, B., J.Suskovic, Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., and Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* 94, 981–987.
- Koskenniemi, K., Laakso, K., Koponen, J., Kankainen, M., Greco, D., Auvinen, P., et al. (2011). Proteomics and Transcriptomics Characterization of Bile Stress Response in Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.002741. doi:10.1074/mcp.M110.002741.
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance KEVIN. *J. Appl. Physiol.* 92, 2177–2186.
- Kwok, S., Chang, S. Y., Sninsky, J. J., and Wang, A. (1994). A Guide to the Design and Use of Mismatched and Degenerate Primers. *PCR Methods Appl.* 3, S39-47.
- La Ragione, R. M., Narbad, A., Gasson, M. J., and Woodward, M. J. (2004). *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. *Lett. Appl. Microbiol.* 38, 197–205. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01474.x.
- La Ragione, R. M., and Woodward, M. J. (2003). Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. *Vet. Microbiol.* 94, 245–256. doi:10.1016/S0378-1135(03)00077-4.
- Lacey, J. A., Keyburn, A. L., Forda, M. E., Portela, R. W., Johanesen, P. A., Lyras, D., et al. (2017). Conjugation-mediated horizontal gene transfer of *Clostridium perfringens* plasmids in the chicken gastrointestinal tract results in the formation of new virulent strains. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.01814-17.
- Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M., and Cepeda, A. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiol. Res.* 206, 60–73. doi:10.1016/j.micres.2017.09.010.
- Lan, P. T. N., Hayashi, H., Sakamoto, M., and Benno, Y. (2002). Phylogenetic Analysis of Cecal Microbiota in Chicken by the Use of 16S rDNA Clone Libraries. *Microbiol. Immunol.* 46, 371–382.
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., and Larson, E. L. (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals : Perspective , Policy , and Potential.
- Landoni, M. F., and Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *Vet. J.* 205, 21–7. doi:10.1016/j.tvjl.2015.04.016.
- Larsen, N., Nissen, P., and Willats, W. G. T. (2007). The effect of calcium ions on adhesion and

- competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp . and *E. coli* O138. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 113–119. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.033.
- Laukens, D., Brinkman, B. M., Raes, J., De Vos, M., and Vandenabeele, P. (2015). Heterogeneity of the gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 117–132. doi:10.1093/femsre/fuv036.
- Laxminarayan, R., Van Boeckel, T., and Teillant, A. (2015). The economic costs of withdrawing antimicrobial growth promoters from the livestock sector. *OECD Food, Agric. Fish. Pap.* doi:http://dx.doi.org/10.1787/5js64kst5wv1-en.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and Keersmaecker, S. C. J. De (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728–764. doi:10.1128/MMBR.00017-08.
- Leccese Terraf, M. C., Juárez Tomás, M. S., Nader-Macías, M. E. F., and Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1517–1529. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x.
- Lee, C. W., and Saif, Y. M. (2009). Avian influenza virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 301–310. doi:10.1016/j.cimid.2008.01.007.
- Lee, J. su, Chung, M.-J., and Seo, J.-G. (2013). *In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria against Clostridium difficile.* doi:10.5487/TR.2013.29.2.099.
- Lee, K. W., Lillehoj, H. S., Jeong, W., Jeoung, H. Y., and An, D. J. (2018). Avian necrotic enteritis : Experimental models , host immunity , pathogenesis , risk factors , and vaccine development. *Poult. Sci.* 90, 1381–1390. doi:10.3382/ps.2010-01319.
- Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V. R., Marri, P. R., Rosey, E. L., Gong, J., et al. (2010). Identification of Novel Pathogenicity Loci in *Clostridium perfringens* Strains That Cause Avian Necrotic Enteritis. *PLoS One* 5, e10795. doi:10.1371/journal.pone.0010795.
- Levy, S. B. (1992). *The antibiotic paradox: how miracle drugs are destroying the miracle.* New York: Plenum.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 371–387. doi:10.1038/nrd3975.
- Li, Q., Liu, X., and Zhou, J. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int. J. Agric. Policy Res.* 3, 84–92. doi:10.15739/IJAPR.030.
- Li, Z., Wang, W., Liu, D., and Guo, Y. (2018). Effects of *Lactobacillus acidophilus* on the growth performance and intestinal health of broilers challenged with *Clostridium perfringens*. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9, 1–10.
- Li, Z., Wang, W., Lv, Z., Liu, D., Guo, Y., Li, Z., et al. (2017). *Bacillus subtilis* and yeast cell wall improve the intestinal health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*. *Br. Poult. Sci.* 58, 635–643. doi:10.1080/00071668.2017.1370697.
- Liao, S. F., and Nyachoti, C. M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim. Nutr.* 3, 331–343. doi:10.1016/j.aninu.2017.06.007.
- Linares, D. M., Gómez, C., Renes, E., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Ross, R. P., et al. (2017). Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Front. Microbiol.* 8, 846. doi:10.3389/fmicb.2017.00846.
- Lindgren, S. E., and Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 87, 149–164. doi:10.1016/0378-1097(90)90703-S.

- Liu, Y., Li, Y., Shi, T., Zhao, J., Wang, H., Liu, T., et al. (2016). The optimization of spray drying process of *Lactobacillus reuteri*. *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 615–618. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.008.
- Ljungh, Å., and Wadström, T. (2006). *Lactic Acid Bacteria as Probiotics Further Reading*.
- Lu, J., Idris, U., Harmon, B., Maurer, J. J., Lee, M. D., and Hofacre, C. (2003). Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken Diversity and Succession of the Intestinal Bacterial Community of the Maturing Broiler Chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6816–6824. doi:10.1128/AEM.69.11.6816.
- Lund, P., Tramonti, A., and De Biase, D. (2014). Coping with low pH: molecular strategies in neutralophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 38, 1091–1125. doi:10.1111/1574-6976.12076.
- M'Sadeq, S. A., Wu, S., Swick, R. A., and Choct, M. (2015). Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Anim. Nutr.* 1, 1–11. doi:10.1016/j.aninu.2015.02.004.
- Mackenzie, D. A., Jeffers, F., Parker, M. L., Vibert-vallet, A., Bongaerts, R. J., Roos, S., et al. (2010). Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* 156, 3368–3378. doi:10.1099/mic.0.043265-0.
- Macwana, S. J., and Muriana, P. M. (2012). A “bacteriocin PCR array” for identification of bacteriocin-related structural genes in lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods* 88, 197–204. doi:10.1016/j.mimet.2011.11.008.
- Madsen, K. (2006). Probiotics and the Immune Response. *J. Clin Gastroenterol* 40, 232–234.
- Madsen, K. L. (2012). Enhancement of epithelial barrier function by probiotics. *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* 5, 55–59.
- Mainville, I., Arcand, Y., and Farnworth, E. R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 99, 287–296. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020.
- Majeed, H., Lampert, A., Ghazaryan, L., and Gillor, O. (2013). The Weak Shall Inherit: Bacteriocin-Mediated Interactions in Bacterial Populations. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0063837.
- Mappley, L. J., Tchorzewska, M. A., Cooley, W. A., Woodward, M. J., and La Ragione, R. M. (2011). Lactobacilli Antagonize the Growth, Motility, and Adherence of *Brachyspira pilosicoli*: a Potential Intervention against Avian Intestinal Spirochetosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5402–5411. doi:10.1128/AEM.00185-11.
- Maron, D. F., Smith, T. J. S., and Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global. Health* 9, 48. doi:10.1186/1744-8603-9-48.
- Marrec, C. L. E., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., and Urdaci, M. C. (2000). Biochemical and Genetic Characterization of Coagulin, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins, Produced by *Bacillus coagulans* I 4. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5213–5220.
- Marshall, B. M., and Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718–733. doi:10.1128/CMR.00002-11.
- Martin, F.-P. J., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I., Lundstedt, T., Lek, P., et al. (2008). Probiotic modulation of symbiotic gut microbial – host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 4, 157. doi:10.1038/msb4100190.

- Martinez-Haro, M., Taggart, M. A., Green, A. J., and Mateo, R. (2009). Avian Digestive Tract Simulation To Study the Effect of Grit Geochemistry and Food on Ph Shot Bioaccessibility. *Environmetnal Sci. Technol.* 43, 3–9.
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Herмосillo, O. A., and Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN Microbiol.* 2012, 1–13. doi:10.5402/2012/916845.
- Martoni, C. J., Labb, A., Ganopolsky, J. G., Prakash, S., and Jones, M. L. (2015). Changes in bile acids , FGF-19 and sterol absorption in response to bile salt hydrolase active *L . reuteri* NCIMB 30242. *Gut Microbes* 6, 57–65.
- Mater, D. D. G., Langella, P., Corthier, G., and Flores, M. J. (2007). A probiotic *Lactobacillus* strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 14, 123–127. doi:10.1159/000106091.
- Mathias, A., Duc, M., Favre, L., Benyacoub, J., Blum, S., and Cortes, B. (2010). Potentiation of polarized intestinal Caco-2 cell responsiveness to probiotics complexed with secretory IgA. *J. Biol. Chem.* 285, 33906–33913. doi:10.1074/jbc.M110.135111.
- McReynolds, J. L., Byrd, J. A., Anderson, R. C., Moore, R. W., Edrington, T. S., Genovese, K. J., et al. (2004). Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 83, 1948–1952.
- Mekonnen, M. M., and Hoekstra, A. Y. (2012). A Global Assessment of the Water Footprint of Farm Animal Products. *Ecosystems* 15, 401–415. doi:10.1007/s10021-011-9517-8.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Rossero, A., Ferchichi, M., Prévost, H., Drider, D., et al. (2011). Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*. *Int. Microbiol.* 14, 103–110. doi:10.2436/20.1501.01.140.
- Messaoudi, S., Madi, A., Prévost, H., Feuilloley, M., Manai, M., Dousset, X., et al. (2012). *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe* 18, 584–589. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.10.004.
- Metschnikoff, E. (1907). *The prolongation of life. Optimistic studies.* London, UK.
- Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., and Kojic, S. (2015). AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* Subsp . *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion , and pathogen exclusion *in vitro*. *PLoS One* 10, e0126387. doi:10.1371/journal.pone.0126387.
- Millet, S., and Maertens, L. (2011). The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. *Vet. J.* 187, 143–144. doi:10.1016/j.tvjl.2010.05.001.
- Minelli, E. B., and Benini, A. (2008). Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. *Microb. Ecol. Health Dis.* 20, 180–183. doi:10.1080/08910600802408095.
- Ming, L. C., Rahim, R. A., Wan, H. Y., and Ariff, A. B. (2009). Formulation of protective agents for improvement of *Lactobacillus salivarius* I 24 survival rate subjected to freeze drying for production of live cells in powdered form. *Food Bioprocess Technol.* 2, 431–436. doi:10.1007/s11947-009-0184-0.
- Moore, R. J. (2016). Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathol.* 45, 275–281. doi:10.1080/03079457.2016.1150587.
- Morar, M., and Wright, G. D. (2010). The Genomic Enzymology of Antibiotic Resistance. *Annu. Rev. Genet.* 44, 25–51. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163517.
- Moslehi-jenabian, S., Pedersen, L. L., and Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. *Nutrients* 2, 449–473. doi:10.3390/nu2040449.
- Motevaseli, E., Shirzad, M., Akrami, S. M., Mousavi, A. S., Mirsalehian, A., and Modarressi, M. H. (2013). Normal and Tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli,

- independent of pH and lactate. *J. Med. Microbiol.* 62, 1065–1072. doi:10.1099/jmm.0.057521-0.
- Mottet, A., and Tempio, G. (2017). Reviews Global poultry production : current state and future outlook and challenges. *Worlds. Poult. Sci. J.* 73, 1–12. doi:10.1017/S0043933917000071.
- Mountzouris, K. C., Tsitsrikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G., et al. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poult. Sci.* 89, 58–67. doi:10.3382/ps.2009-00308.
- Mu, Q., Tavella, V. J., and Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Front. Microbiol.* 9, 757. doi:10.3389/fmicb.2018.00757.
- Munita, J. M., and Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 4, 1–37. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms.
- Murphy, D., Ricci, A., Auce, Z., Beechinor, J. G., Bergendahl, H., Da, D., et al. (2017). EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union , and the resulting impacts on food safety (RONAFA). *EFSA J.* 15, 4666. doi:10.2903/j.efsa.2017.4666.
- Murry, A. C., Hinton, A., and Morrison, H. (2004). Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Poult. Sci.* 3, 603–607.
- Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., and Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1337–1345. doi:10.1007/s11274-009-0020-8.
- Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S., Nakayama, J., et al. (2011). The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poult. Sci.* 90, 2753–2765. doi:10.3382/ps.2011-01637.
- Nancib, A., Nancib, N., Boubendir, A., and Boudrant, J. (2015). The use of date waste for lactic acid production by a fed-batch culture using *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Brazilian J. Microbiol.* 46, 893–902. doi:10.1590/S1517-838246320131067.
- Navarro, M., McClane, B., and Uzal, F. (2018). Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins. *Toxins (Basel)*. 10, 212. doi:10.3390/toxins10050212.
- Nayak, S. K. (2011). “Biology of Eukaryotic Probiotics,” in *Probiotics, Microbiology Monographs 21*, ed. M.-T. Liong (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 29–56. doi:10.1007/978-3-642-20838-6.
- O’Neill, J. (2014). Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.
- O’Toole, G. O., Kaplan, H. B., and Kolter, R. (2000). Biofilm Formation As Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49–79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49.
- O’Toole, P. W., and Cooney, J. C. (2008). Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* doi:10.1155/2008/175285.
- Oakley, B. B., Lillehoj, H. S., Kogut, M. H., Kim, W. K., Maurer, J. J., Lee, M. D., et al. (2014). The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 368, 100–112. doi:10.1111/1574-6968.12608.
- OECD/FAO (2017). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026*. doi:http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2017-en.
- OECD/FAO (2018a). “Meat,” in *OECD/FAO Agricultural Outlook 2018-2027* (OECD Publishing,

- Paris/Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome), 149–162. doi:<https://doi.org/10.1787/19991142>.
- OECD/FAO (2018b). OECD - FAO Agricultural Outlook 2018 - 2027. OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. doi:https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2018-en.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 57–62. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.005.
- Ohland, C. L., and Macnaughton, W. K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 298, G807–G819. doi:10.1152/ajpgi.00243.2009.
- Ohtani, K., and Shimizu, T. (2015). Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. *Res. Microbiol.* 166, 280–289. doi:10.1016/j.resmic.2014.09.010.
- OIE (2013). Report Of The Meeting Of The Oie Scientific Commission For Animal Diseases.
- OIE (2014). Chapter 2.3.6. Avian Tuberculosis. doi:10.15713/ins.mmj.3.
- OIE (2018). Code sanitaire pour les animaux terrestres.
- Oliveira, B. C. M., and Widmer, G. (2018). Probiotic Product Enhances Susceptibility of Mice to Cryptosporidiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. Available at: <http://aem.asm.org/content/84/21/e01408-18.abstract>.
- OMS (2004). Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: scientific assessment. Geneva, December 1-5 Available at: <http://www.who.int/iris/handle/10665/68883>.
- Opengart, K. (2008). *Diseases of Poultry. Necrotic enteritis*. 12th ed. , ed. and D. E. S. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. McDougald, L. K. Nolan ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA.
- Orozco, F. G., and Zuluaga, F. (2014). Lactic Acid Yield Using Different Bacterial Strains, Its Purification, and Polymerization through Ring-Opening Reactions. *Int. J. Polym. Sci.* Article ID.
- Ouwehand, A. C. (2017). A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Benef. Microbes* 8, 143–151. doi:10.3920/BM2016.0140.
- Ouwehand, A. C., and Salminen, S. (2003). *In vitro* Adhesion Assays for Probiotics and their *in vivo* Relevance: A Review. *Microb. Ecol. Health Dis.* 15, 175–184. doi:10.1080/08910600310019886.
- Ozen, M., and Dinleyici, E. C. (2015). The history of probiotics : the untold story. *Benef. Microbes* 6, 159–165. doi:10.3920/BM2014.0103.
- Page, S. W., and Gautier, P. (2012). Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 31, 145–188. doi:10.20506/rst.31.1.2106.
- Paiva, D. M., Walk, C. L., and McElroy, A. P. (2013). Influence of dietary calcium level , calcium source , and phytase on bird performance and mineral digestibility during a natural necrotic enteritis episode. *Poult. Sci.* 92, 3125–3133.
- Paiva, D., and McElroy, A. (2014). Necrotic enteritis: Applications for the poultry industry. *J. Appl. Poult. Res.* 23, 557–566. doi:10.3382/japr.2013-00925.
- Palliyeguru, M. W. C. D., and Rose, S. P. (2014). Sub-clinical necrotic enteritis : its aetiology and predisposing factors in commercial broiler production. *Worlds. Poult. Sci. J.* 70, 803–816. doi:10.1017/S0043933914000865.
- Papadimitriou, K., Zoumpopoulou, G., Foligné, B., Alexandraki, V., Kazou, M., Pot, B., et al. (2015). Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front. Microbiol.* 6, 58. doi:10.3389/fmicb.2015.00058.

- Park, C., and Seo, Y. (2015). Heat Shock Proteins : A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity. *Plant Pathol. J.* 31, 323–333.
- Park, S. S., Lillehoj, H. S., Allen, P. C., Park, D. W., Fitzcoy, S., Daniel, A., et al. (2008). Immunopathology and cytokine responses in broiler chickens coinfectd with *Eimeria maxima* and *Clostridium perfringens* with the use of an animal model of necrotic enteritis. *Avian Dis.* 52, 14–22.
- Park, Y. H., Hamidon, F., Rajangan, C., Soh, K. P., Gan, C. Y., Lim, T. S., et al. (2016). Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 36, 567–576. doi:10.5851/kosfa.2016.36.5.567.
- Parreira, V. R., Costa, M., Eikmeyer, F., Blom, J., and Prescott, J. F. (2012). Sequence of Two Plasmids from *Clostridium perfringens* Chicken Necrotic Enteritis Isolates and Comparison with *C. perfringens* Conjugative Plasmids. *PLoS One* 7, e49753. doi:10.1371/journal.pone.0049753.
- Patel, S., and Goyal, A. (2012). The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech* 2, 115–125. doi:10.1007/s13205-012-0044-x.
- Pathak, S., Awuh, J. A., Leversen, N. A., Flo, T. H., and Åsjsjø, B. (2012). Counting mycobacteria in infected human cells and mouse tissue: A comparison between qPCR and CFU. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0034931.
- Patz, J. A., and Hahn, M. B. (2013). *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases.* , eds. J. S. Mackenzie, M. Jeggo, P. Daszak, and J. A. Richt Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg doi:10.1007/978-3-642-36889-9.
- Pavel, A. B., and Vasile, C. I. (2012). PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics* 13. doi:10.1186/1471-2105/13/9.
- Peng, Q., Zeng, X. F., Zhu, J. L., Wang, S., Liu, X. T., Hou, C. L., et al. (2016). Effects of dietary *Lactobacillus plantarum* B1 on growth performance , intestinal microbiota , and short chain fatty acid profiles in broiler chickens. *Poult. Sci.* 95, 893–900. doi:doi.org/10.3382/ps/pev435.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., and Gobbato, N. (1995). Immune System Stimulation by Probiotics. *J. Dairy Sci.* 78, 1597–1606. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76784-4.
- Pérez Ibarreche, M., Castellano, P., and Vignolo, G. (2014). Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Sci.* 96, 295–303. doi:10.1016/j.meatsci.2013.07.010.
- Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity : lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 86. doi:10.3389/fcimb.2012.00086.
- Pisano, M. B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, M. P., et al. (2014). Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Sardinian Dairy Products. *Biomed Res. Int.* Article ID, 9 pages. doi:10.1155/2014/286390.
- Polak-Berecka, M., Wasko, A., Paduch, R., Skrzypek, T., and Sroka-Bartnicka, A. (2014). The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leewenhoek* 106, 751–762. doi:10.1007/s10482-014-0245-x.
- Poolman, B., and Konings, W. N. (1993). Secondary solute transport in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1183, 5–39. doi:10.1016/0005-2728(93)90003-X.
- Porter, R. E. (1998). Bacterial enteritides of poultry. *Poult. Sci.* 77, 1159–1165. doi:10.1093/ps/77.8.1159.
- Pourabedin, M., Guan, L., and Zhao, X. (2015). Xylo-oligosaccharides and virginiamycin differentially modulate gut microbial composition in chickens. *Microbiome* 3, 1–12.

- doi:10.1186/s40168-015-0079-4.
- Prescott, J. F., Parreira, V. R., Gohari, I. M., Lepp, D., and Gong, J. (2016). The pathogenesis of necrotic enteritis in chickens : what we know and what we need to know : a review. *Avian Pathol.* 45, 288–294. doi:10.1080/03079457.2016.1139688.
- Prescott, J. F., Sivendra, R., and Barnum, D. A. (1978). The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced Necrotic Enteritis in the chicken. *Can. Vet. J.* 19, 181–183.
- Qing, X., Zeng, D., Wang, H., Ni, X., Liu, L., Lai, J., et al. (2017). Preventing subclinical necrotic enteritis through *Lactobacillus johnsonii* BS15 by ameliorating lipid metabolism and intestinal microflora in broiler chickens. *AMB Express* 7, 139. doi:10.1186/s13568-017-0439-5.
- Quinteiro-Filho, W. M., Brisbin, J. T., Hodgins, D. C., and Sharif, S. (2015). *Lactobacillus* and *Lactobacillus* cell-free culture supernatants modulate chicken macrophage activities. *Res. Vet. Sci.* 103, 170–175. doi:10.1016/j.rvsc.2015.10.005.
- Quinto, E. J., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., and Mateo, J. (2014). Probiotic lactic acid bacteria : A review. *Food Nutr. Sci.* 5, 1765–1775.
- Rabin, N., Zheng, Y., Du, Y., Bonsu, E., and Sintim, H. O. (2015). Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Med. Chem.* 7, 647–671.
- Raftis, E. J., Salvetti, E., Torriani, S., Felis, G. E., and Toole, P. W. O. (2011). Genomic Diversity of *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 954–965. doi:10.1128/AEM.01687-10.
- Rao, R. K., and Samak, G. (2013). Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Curr. Nutr. Food Sci.* 9, 99–107.
- Rappé, M. S., and Giovannoni, S. J. (2003). The Uncultured Microbial Majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 369–394. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090759.
- Rasch, M. (2002). The influence of temperature, salt and pH on the inhibitory effect of reuterin on *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 72, 225–231. doi:10.1016/S0168-1605(01)00637-7.
- Ratsep, M., Naaber, P., Kõljalg, S., Smidt, I., Shkut, E., and Sepp, E. (2014). Effect of *Lactobacillus plantarum* Strains on Clinical Isolates of *Clostridium difficile* in vitro. *J. Probiotics Heal.* 2. doi:10.4172/2329-8901.1000119.
- Rees, J. H., Soudain, S. E., Gregson, N. A., and Hughes, R. A. C. (1995). *Campylobacter jejuni* Infection and Guillain–Barré Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333, 1374–1379. doi:10.1056/NEJM1995112333332102.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S., and Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds : Characteristics and Applications. *Food Eng. Rev.* 4, 124–140. doi:10.1007/s12393-012-9051-2.
- Riddell, C., and Kong, X. (1992). The Influence of Diet on Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *Avian Dis.* 36, 499–503.
- Riley, M. (2009). Bacteriocins, Biology, Ecology, and Evolution. *Encycl. Microbiol.*, 4600.
- Rinttilä, T., and Apajalahti, J. (2013). Intestinal microbiota and metabolites — Implications for broiler chicken health and performance 1. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 647–658.
- Risøen, P. A., Brurberg, M. B., Eijsink, V. G. H., and Nes, I. F. (2000). Functional analysis of promoters involved in *quorum sensing*-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Mol. Microbiol.* 37, 619–628. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02029.x.
- Rodrigues, I., Svihus, B., Bedford, M. R., Gous, R., and Choct, M. (2018). Intermittent lighting improves resilience of broilers during the peak phase of sub-clinical necrotic enteritis

- infection. *Poult. Sci.* 97, 438–446. doi:10.3382/ps/pex315.
- Rood, J. I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B. A., Melville, S. B., et al. (2018). Anaerobe Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, 1–6. doi:10.1016/j.anaerobe.2018.04.011.
- Rood, J. I., Keyburn, A. L., and Moore, R. J. (2016). NetB and necrotic enteritis : the hole movable story. *Avian Pathol.* 45, 295–301. doi:10.1080/03079457.2016.1158781.
- Roos, S., Lindgren, S., and Jonsson, H. (1999). Autoaggregation of *Lactobacillus reuteri* is mediated by a putative DEAD-box helicase. *Mol. Microbiol.* 32, 427–436.
- Rossolini, G. M. (2015). Multidrug-resistant and extremely drug-resistant bacteria: are we facing the end of the antibiotic era? *J. Siena Acad. Sci.* 7. doi:10.4081/jsas.2015.6409.
- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., and Pollini, S. (2014). Update on the antibiotic resistance crisis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 18, 56–60. doi:10.1016/j.coph.2014.09.006.
- Roto, S. M., Kwon, Y. M., and Rick, S. C. (2016). Applications in ovo technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Front. Vet. Sci.* 3, 63. doi:10.3389/fvets.2016.00063.
- Roy, P., Dhillon, A. S., Shivaprasad, H. L., Schaberg, D. M., Bandli, D., and Johnson, S. (2001). Pathogenicity of different serogroups of avian salmonellae in specific-pathogen-free chickens. *Avian Dis.* 45, 922–937. doi:10.2307/1592871.
- Ruiz, L., Margolles, A., and Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front. Microbiol.* 4, 1–8. doi:10.3389/fmicb.2013.00396.
- Russo, P., Capozzi, V., Arena, M. P., Spadaccino, G., Dueñas, M. T., López, P., et al. (2014). Riboflavin-overproducing strains of *Lactobacillus fermentum* for riboflavin-enriched bread. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 3691–3700. doi:10.1007/s00253-013-5484-7.
- Sadeyen, J.-R., Trotureau, J., Protais, J., Beaumont, C., Sellier, N., Salvat, G., et al. (2006). *Salmonella* carrier-state in hens : study of host resistance by a gene expression approach. 8, 1308–1314. doi:10.1016/j.micinf.2005.12.014.
- Sakurai, J., Nagahama, M., and Oda, M. (2004). *Clostridium perfringens* alpha-Toxin : Characterization and mode of action. *J. Biochem.* 136, 569–574. doi:10.1093/jb/mvh161.
- Salas-Jara, M., Ilabaca, A., Vega, M., and García, A. (2016). Biofilm Forming *Lactobacillus*: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* 4, 35. doi:10.3390/microorganisms4030035.
- Salminen, M. K., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M., Valtonen, V., et al. (2004). *Lactobacillus* Bacteremia, Clinical Significance, and Patient Outcome, with Special Focus on Probiotic *L. rhamnosus* GG. *Clin. Infect. Dis.* 38, 62–9.
- Salvetti, E., Torriani, S., and Felis, G. E. (2012). The Genus *Lactobacillus* : A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 217–226. doi:10.1007/s12602-012-9117-8.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Toxicol.* 21, 1–26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
- Sanders, P., Perrin-Guyomard, A., and Moulin, G. (2017). Évolution de l' utilisation des antibiotiques en production animale. *Cah. Nutr. diététique* 52, 301–311. doi:10.1016/j.cnd.2017.06.002.
- Santos, R. L., Raffatellu, M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, M., and Ba, A. J. (2009). Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends Microbiol.* 17, 498–506. doi:10.1016/j.tim.2009.08.008.

- Saranghi, N. R., Babu, L. K., Kumar, A., Pradhan, C. R., Pati, P. K., and Mishra, J. P. (2016). *Probiotics in Animal Nutrition*. doi:10.14202/vetworld.2016.313-319.
- Sato, Y., Wigle, W. L., Gallagher, S., Johnson, A. L., Sweeney, R. W., and Wakenell, P. S. (2016). Outbreak of Type C Botulism in Commercial Layer Chickens. *Avian Dis.* 60, 90–94. doi:10.1637/11293-100415-Case.1.
- Savva, C. G., Da Costa, S. P. F., Bokori-Brown, M., Naylor, C. E., Cole, A. R., Moss, D. S., et al. (2013). Molecular architecture and functional analysis of NetB, a pore-forming toxin from *Clostridium perfringens*. *J. Biol. Chem.* 288, 3512–3522. doi:10.1074/jbc.M112.430223.
- Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., and Britton, R. A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology* 156, 1589–1599. doi:10.1099/mic.0.035642-0.
- Schatzmayr, G., and Streit, E. (2013). Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin J.* 6, 213–222. doi:10.3920/WMJ2013.1572.
- Schillinger, U., and Lücke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901–1906. doi:10.1016/S0168-1605(03)00051-5.
- Schnürer, J., and Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 70–78. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.014.
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., and Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 9, 111–122. doi:10.1007/s12602-017-9264-z.
- Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K., and Ha, J. K. (2010). Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 23, 1657–1667. doi:10.5713/ajas.2010.r.08.
- Servin, A. L., and Coconnier, M.-H. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17, 741–754. doi:10.1016/S1521-6918(03)00052-0.
- Sha, Y., Wang, B., Liu, M., Jiang, K., and Wang, L. (2016a). Interaction between *Lactobacillus pentosus* HC-2 and *Vibrio parahaemolyticus* E1 in *Litopenaeus vannamei* in vivo and in vitro. *Aquaculture* 465, 117–123. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.09.007.
- Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., and Wang, B. (2016b). Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 452, 28–36. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.10.014.
- Sharifuzzaman, S. M., and Austin, B. (2017). “Probiotics for Disease Control in Aquaculture,” in *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*, eds. B. Austin and A. Newaj-Fyzul (John Wiley & Sons Ltd), 189–222. doi:10.1002/9781119152125.ch8.
- Shekh, S. L., Dave, J. M., and Vyas, B. R. M. (2016). Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and γ -amino butyric acid production. *LWT - Food Sci. Technol.* 74, 234–241. doi:10.1016/j.lwt.2016.07.052.
- Shen, S., Samaranayake, L. P., and Yip, H. K. (2005). Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. *Arch. Oral Biol.* 50, 23–32. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.07.002.
- Shida, K., and Nanno, M. (2008). Probiotics and immunology : separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol.* 29, 565–573. doi:10.1016/j.it.2008.07.011.
- Shimizu, T., Ohtani, K., Hirakawa, H., Ohshima, K., Yamashita, A., and Shiba, T. (2002).

- Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. *PNAS* 99, 996–1001.
- Shojadoost, B., Peighambari, S. M., and Nikpiran, H. (2013). Effects of virginiamycin against experimentally induced necrotic enteritis in broiler chickens vaccinated or not with an attenuated coccidial vaccine. *J. Appl. Poult. Res.* 22, 160–167.
- Shojadoost, B., Vince, A. R., and Prescott, J. F. (2012). The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Vet. Res.* 43. doi:10.1186/1297-9716-43-74.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A., and Teixeira, P. (2011). *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* 2, Article 200. doi:10.3389/fmicb.2011.00200.
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-a review. *Open Vet. J.* 8, 104–111.
- Skarin, H., Tevell Åberg, A., Woudstra, C., Hansen, T., Löfström, C., Koene, M., et al. (2013). The Workshop on Animal Botulism in Europe. *Biosecurity and Bioterrorism*, S183–S190. doi:10.1089/bsp.2012.0076.
- Smyth, J. A. (2016). Pathology and diagnosis of necrotic enteritis: is it clear-cut? *Avian Pathol.* 45, 282–287. doi:10.1080/03079457.2016.1158780.
- Snyder, L. (2000). HPLC: Past and present. *Anal. Chem.* 72, 412–420. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0034214082&partnerID=40&md5=9cb46335fc98ed115b989850f36cbaa3>.
- Songer, J. G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 216–234.
- Souillard, R., Woudstra, C., Le Maréchal, C., Dia, M., Bayon-Auboyer, M. H., Chemaly, M., et al. (2014). Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013. *Avian Pathol.* 43, 458–464. doi:10.1080/03079457.2014.957644.
- Stanley, D., Geier, M. S., Chen, H., Hughes, R. J., and Moore, R. J. (2015). Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences. *BMC Microbiol.* 15, 1–11. doi:10.1186/s12866-015-0388-6.
- Stanley, D., Hughes, R. J., and Moore, R. J. (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 4301–4310. doi:10.1007/s00253-014-5646-2.
- Stanojević-Nikolić, S., Dimić, G., Mojović, L., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., and Kocić-Tanackov, S. (2016). Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *J. Food Process. Preserv.* 40, 990–998. doi:10.1111/jfpp.12679.
- Star, L., Rovers, M., Corrent, E., and Klis, J. D. Van Der (2012). Threonine requirement of broiler chickens during subclinical intestinal *Clostridium* infection. *Poult. Sci.* 91, 643–652.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 56, 845–857. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- Stenlid, J., Karlsson, J. O., and Högberg, N. (1994). Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycol. Res.* 98, 57–63. doi:10.1016/S0953-7562(09)80337-7.
- Stern, N. J., Eruslanov, B. V., Pokhilenko, V. D., Kovalev, Y. N., Volodina, L. L., Perelygin, V. V., et al. (2008). Bacteriocins reduce *Campylobacter jejuni* colonization while bacteria producing bacteriocins are ineffective. *Microb. Ecol. Health Dis.* 20, 74–79. doi:10.1080/08910600802030196.

- Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., et al. (2006). Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3111–3116. doi:10.1128/AAC.00259-06.
- Stordeur, P., and Mainil, J. (2002). La colibacillose aviaire. *Ann. Med. Vet.* 146, 11–18.
- Sun, Q., Liu, D., and Guo, S. (2015). Effects of dietary essential oil and enzyme supplementation on growth performance and gut health of broilers challenged by *Clostridium perfringens*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 207, 234–244. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.06.021.
- Surendran Nair, M., Amalaradjou, M. A., and Venkitanarayanan, K. (2017). *Antivirulence Properties of Probiotics in Combating Microbial Pathogenesis*. Elsevier Ltd doi:10.1016/bs.aambs.2016.12.001.
- Svanström, Å., Boveri, S., Boström, E., and Melin, P. (2013). The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. *BMC Res. Notes* 6, 464.
- Svihus, B. (2014). Function of the digestive system. *J. Appl. Poult. Res.* 23, 306–314. doi:10.3382/japr.2014-00937.
- Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., and Cone, R. A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Res. Microbiol.* 168, 782–792. doi:10.1016/j.resmic.2017.04.001.
- Taheri, H. R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., and Shivazad, M. (2009). Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poult. Sci.* 88, 1586–1593. doi:10.3382/ps.2009-00041.
- Tan, Z., Luo, J., Liu, F., Zhang, Q., and Jia, S. (2015). “Effects of pH, Temperature, Storage Time, and Protective Agents on Nisin Antibacterial Stability,” in *Advances in Applied Biotechnology*, eds. T. Zhang and M. Nakajima, 305–312. doi:10.1007/978-3-662-46318-5.
- Tannock, G. W., Ghazally, S., Walter, J., Loach, D., Brooks, H., Cook, G., et al. (2005). Ecological behavior of *Lactobacillus reuteri* 100-23 is affected by mutation of the luxS gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8419–8425. doi:10.1128/AEM.71.12.8419.
- Tareb, R., Bernardeau, M., Gueguen, M., and Vernoux, J. P. (2013). *In vitro* characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bacteria, especially *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* 62, 637–649. doi:10.1099/jmm.0.049965-0.
- Tellez, G., Pixley, C., Wolfenden, R. E., Layton, S. L., and Hargis, B. M. (2012). Probiotics/direct fed microbials for *Salmonella* control in poultry. *Food Res. Int.* 45, 628–633. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.047.
- Thachil, A. J., McComb, B., Early, M. M., Heeder, C., and Nagaraja, K. V (2012). Clostridium perfringens and *Clostridium septicum* toxoid to control cellulitis in turkeys. *J. Appl. Poult. Res.* 21, 358–366.
- Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Res. Rev. J. Pharm. Anal. RRJPA* 5, 22–28. Available at: <https://www.rroj.com/open-access/a-review-on-high-performance-liquid-chromatography-hplc-.pdf>.
- Therdatha, P., Tandumrongpong, C., Pilasombut, K., Matsusaki, H., Keawsompong, S., and Nitisinprasert, S. (2016). Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling. *Springerplus* 5. doi:10.1186/s40064-016-2693-4.
- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Van Immerseel, F. (2011). Necrotic enteritis

- in broilers: An updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40, 341–347. doi:10.1080/03079457.2011.590967.
- Todorov, S., Gotcheva, B., Dousset, X., Onno, B., and Ivanova, I. (2000). Influence of growth medium on bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* st31. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 14, 50–55. doi:10.1080/13102818.2000.10819062.
- Tsai, Y. T., Cheng, P. C., and Pan, T. M. (2012). The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 853–862. doi:10.1007/s00253-012-4407-3.
- Tsiouris, V., Georgopoulou, I., Batzios, C., Pappaioannou, N., Ducatelle, R., and Fortomaris, P. (2015). The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks The effect of cold stress on the pathogenesis of necrotic enteritis in broiler chicks. *Avian Dis.* 44, 430–435. doi:10.1080/03079457.2015.1083094.
- Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C., and Salminen, S. J. (1999). Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 159–163. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00518.x.
- Udaondo, Z., Duque, E., and Ramos, J.-L. (2017). The pangenome of the genus *Clostridium*. *Environ. Microbiol.* 19, 2588–2603. doi:10.1111/1462-2920.13732.
- Uzal, F. A., Freedman, J. C., Shrestha, A., Theoret, J. R., Garcia, J., Awad, M. M., et al. (2014). Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol.* 9, 361–377.
- Uzal, F. A., McClane, B. A., Cheung, J. K., Theoret, J., Garcia, J. P., Moore, R. J., et al. (2015). Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. *Vet. Microbiol.* 179, 23–33. doi:10.1016/j.vetmic.2015.02.013.
- Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., and Visconti, A. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria : an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol. Lett.* 233, 289–295. doi:10.1016/j.femsle.2004.02.020.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., et al. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *PNAS* 112, 5649–5654. doi:10.1073/pnas.1503141112.
- van Heel, A. J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., and Kuipers, O. P. (2013). BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. *Nucleic Acids Res.* 41, 448–453. doi:10.1093/nar/gkt391.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., and Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33, 537–549. doi:10.1080/03079450400013162.
- Veillon, A., and Zuber, A. (1898). Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch. Med. Exp. Anat. Pathol.* 10, 517–545.
- Veljović, K., Popović, N., Miljković, M., Tolinački, M., Terzić-Vidojević, A., and Kojić, M. (2017). Novel aggregation promoting factor AggE contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGG09-28. *Front. Microbiol.* 8, 1843. doi:10.3389/fmicb.2017.01843.
- Ventura, M., O’Connell-Motherway, M., Leahy, S., Moreno-Munoz, J. A., Fitzgerald, G. F., and Sinderen, D. van (2007). From bacterial genome to functionality ; case bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 120, 2–12. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.011.
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., et al. (2015).

- The Impact of Food Bioactives on Gut Health*. Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London doi:10.1007/978-3-319-16104-4.
- Vizoso Pinto, M. A. G., Schuster, T., Briviba, K., Watzl, B., Holzapfel, W. H., and A P Franz, C. M. (2007). Adhesive and Chemokine Stimulatory Properties of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Strains. *J. Food Prot.* 70, 125–134. doi:10.4315/0362-028X-70.1.125.
- Vlasova, A. N., Kandasamy, S., Chattha, K. S., Rajashekara, G., and Saif, L. J. (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 172, 72–84. doi:10.1016/j.vetimm.2016.01.003.
- Vlková, E., Rada, V., Šmehilová, M., and Killer, J. (2008). Auto-aggregation and Co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiol. (Praha)*. 53, 263–269. doi:10.1007/s12223-008-0040-z.
- Vodnar, D. C., Paucean, A., Dulf, F. V., and Socaciu, C. (2010). HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca* 38, 109–113. doi:10.15835/nbha3824752.
- Vohra, A., Syal, P., and Madan, A. (2016). Probiotic yeasts in livestock sector. *Anim. Feed Sci. Technol.* 219, 31–47. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.05.019.
- Wade, B., and Keyburn, A. (2015). The true cost of necrotic enteritis. *World Poult.* 31, 16–17.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D. M., Gänzle, M. G., and Tannock, G. W. (2008). Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1 . 106 contribute to cell aggregation , *in vitro* biofilm formation , and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiol. Res.* 154, 72–80. doi:10.1099/mic.0.2007/010637-0.
- Wang, C., Chang, T., Yang, H., and Cui, M. (2014a). Surface physiological changes induced by lactic acid on pathogens in consideration of pKa and pH. *Food Control* 46, 525–531. doi:10.1016/j.foodcont.2014.06.024.
- Wang, C., Chang, T., Yang, H., and Cui, M. (2015). Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 47, 231–236. doi:10.1016/j.foodcont.2014.06.034.
- Wang, L., Fang, M., Hu, Y., Yang, Y., Yang, M., and Chen, Y. (2014b). Characterization of the most abundant *Lactobacillus* species in chicken gastrointestinal tract and potential use as probiotics for genetic engineering. *Acta Biochim Biophys Sin* 46, 612–619. doi:10.1093/abbs/gmu037.Advance.
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucocoleri, R., et al. (2015). antiSMASH 3 . 0 — a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* 43, 237–243. doi:10.1093/nar/gkv437.
- Weese, J. S., Reid-Smith, R. J., Avery, B. P., and Rousseau, J. (2010). Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 362–365. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02802.x.
- Wenk, C., Pfirter, H. P., and Bickel, H. (1980). Energetic aspects of feed conversion in growing pigs. *Livest. Prod. Sci.* 7, 483–495. doi:10.1016/0301-6226(80)90086-X.
- Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hryniewicz, W., Johnson, A., et al. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe. *Eurosurveillance* 13, 1–11.
- Wiegel, J., Tanner, R., Rainey, F. . (2006). “An Introduction to the family Clostridiaceae,” in *The Prokaryotes, Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, eds. M. Dworkin., S. Falkow., E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt., 654–678.

- Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., and Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 965–974. doi:10.1007/s00253-011-3783-4.
- Wilkie, D. C., Kessel, A. G. Van, White, L. J., Laarveld, B., and Drew, M. D. (2005). Dietary amino acids affect intestinal *Clostridium perfringens* populations in broiler chickens. *Can. J. Anim. Sci.* 85, 185–193.
- Williams, R. B. (2005). Intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens: Rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. *Avian Pathol.* 34, 159–180. doi:10.1080/03079450500112195.
- Wood, D. E., and Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15, R46. doi:10.1126/science.1093857.
- Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol.* 8, 123. doi:10.1186/1741-7007-8-123.
- Wu, S. B., Stanley, D., Rodgers, N., Swick, R. A., and Moore, R. J. (2014). Two necrotic enteritis predisposing factors, dietary fishmeal and *Eimeria* infection, induce large changes in the caecal microbiota of broiler chickens. *Vet. Microbiol.* 169, 188–197. doi:10.1016/j.vetmic.2014.01.007.
- Wu, S., Rodgers, N., and Choct, M. (2011). Real-Time PCR Assay for *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens in a Challenge Model of Necrotic Enteritis □. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1135–1139. doi:10.1128/AEM.01803-10.
- Yan, F., and Polk, D. B. (2012). Characterization of a probiotic-derived soluble protein which reveals a mechanism of preventive and treatment effects of probiotics on intestinal inflammatory diseases. *Gut Microbes* 3, 25–28.
- Yan, X., Porter, C. J., Hardy, S. P., Steer, D., Smith, A. I., Quinsey, N. S., et al. (2013). Structural and Functional Analysis of the Pore-Forming Toxin NetB from *Clostridium perfringens*. *MBio* 4, e00019-13. doi:10.1128/mBio.00019-13.Editor.
- Yang, C. M., Cao, G. T., Ferket, P. R., Liu, T. T., Zhou, L., Zhang, L., et al. (2012). Effects of probiotic , *Clostridium butyricum* , on growth performance , immune function , and cecal microflora in broiler chickens. *Poult. Sci.* 91, 2121–2129.
- Yang, F., Hou, C., Zeng, X., and Qiao, S. (2015). The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. *Pathogens* 4, 34–45. doi:10.3390/pathogens4010034.
- Yirga, H. (2015). The use of probiotics in animal nutrition. *J. Probiotics Heal.* 3. doi:10.4172/2329-8901.1000132.
- Yoo, J. Y., and Kim, S. S. (2016). Probiotics and Prebiotics : Present Status and Future. *Nutrients* 8, 173. doi:10.3390/nu8030173.
- Zarate, G., Morata de Ambrosini, V. I., Perez Chaia, A., and Gonzalez, S. N. (2002). Adhesion of Dairy Propionibacteria to Intestinal Epithelial Tissue *In Vitro* and *In Vivo*. *J. Food Prot.* 65, 534–539.
- Zeng, X., and Lin, J. (2017). Factors influencing horizontal gene transfer in the intestine. *Anim. Heal. Res. Rev.* 18, 153–159. doi:10.1017/S1466252317000159.
- Zhang, W., Zhu, Y., Yang, J., Yang, G., Zhou, D., and Wang, J. (2015). A Selected *Lactobacillus rhamnosus* Strain Promotes EGFR-Independent Akt Activation in an Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88- Infected IPEC-J2 Cell Model. *PLoS One* 10, e0125717. doi:10.1371/journal.pone.0125717.
- Zhang, X., Liu, G., Zhao, B., and Li, P. (2012). New insight into the regulation of class II bacteriocin production by *quorum sensing* in *Lactobacillus pentosus* 31-1. *African J.*

- Microbiol. Res.* 6, 3582–3588. doi:10.5897/AJMR11.1147.
- Zhitnitsky, D., Rose, J., and Lewinson, O. (2017). The highly synergistic , broad spectrum , antibacterial activity of organic acids and transition metals. *Nat. Publ. Gr.*, 1–13. doi:10.1038/srep44554.
- Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y., and Joerger, R. D. (2002a). 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 124–137. doi:10.1128/AEM.68.1.124-137.2002.
- Zhu, X. Y., Zhong, T., Pandya, Y., and Joerger, R. D. (2002b). 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens †. 68, 124–137. doi:10.1128/AEM.68.1.124.
- Zhu, Y. H., Li, X. Q., Zhang, W., Zhou, D., Liu, H. Y., and Wang, J. F. (2014). Dose-dependent effects of *Lactobacillus rhamnosus* on serum interleukin-17 production and intestinal T-cell responses in pigs challenged with *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1787–1798. doi:10.1128/AEM.03668-13.
- Zimmer, M., Vukov, N., Scherer, S., and Loessner, M. J. (2002). The Murein Hydrolase of the Bacteriophage □ 3626 Dual Lysis System Is Active against All Tested *Clostridium perfringens* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5311–5317. doi:10.1128/AEM.68.11.5311.