

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A.MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département Biologie Physico-Chimique  
Laboratoire de Biotechnologie Végétale et Ethnobotanique

**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie. Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité : Biochimie Appliquée**

**Présentée par**  
**Mlle SEBOUAI Manel**

***Thème***

**Caractérisation et encapsulation de nouvelles souches probiotiques de  
*Lactiplantibacillus* pour une application dans l'alimentation du poulet de chair**

**Soutenue le :**

**Devant le Jury composé de :**

**Nom et Prénom**

**Grade**

**Mr BETTACHE Azzeddine**

Professeur

Univ. de Béjaïa

Président

**Mr AKSAS Ali**

Professeur

Univ. de Béjaïa

Rapporteur

**Mme FARADJI-HAMMA Samia**

Professeur

Univ. de Béjaïa

Co-Rapporteur

**Mr KATI Djamel Eddine**

Professeur

Univ. de Béjaïa.

Examineur

**Mr IDOUI Tayeb**

Professeur

Univ. de Jijel

Examineur

**Mme SOBHI Widad**

Professeur

CRBt-Constantine

Invité

**Année Universitaire : 2024/2025**

## ***Dédicaces***

Je tiens à dédier ce travail à :

**Mes parents**, pour leur soutien inconditionnel, leur amour et leur encouragement tout au long de ce parcours.

**Mes sœurs Wided, Rym et Aicha**, pour leur patience et leur soutien constant, qui ont été une source inestimable de motivation.

**Mon collègue Ridha**, pour son soutien constant et ses conseils.

**Mes collègues et amis (Feriel, Chaima, Khaoula, Abla, Karima)** , dont les conseils avisés et la camaraderie ont enrichi cette aventure.

**Mes tantes, mes oncles, mes cousins et toute ma famille**

**Toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.**

## ***Remerciements***

Avant tout, je remercie Dieu Tout-Puissant de m'avoir aidé et de m'avoir donné la foi et la force nécessaire pour achever ce modeste travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, **Pr AKSAS Ali**, d'avoir accepté de me conseiller et pour son aide, son soutien et ses conseils tout au long de ce travail, ainsi que pour avoir fourni un environnement propice à la recherche.

Je souhaite également adresser mes plus sincères remerciements au **Pr FARADJI-Hamma Samia**, ma co-directrice de thèse. Merci infiniment pour tout ce que vous avez accompli pour moi et pour votre engagement dans l'achèvement de ce projet de recherche. J'espère avoir l'opportunité de collaborer à nouveau avec vous dans un avenir proche.

Je suis profondément reconnaissant à tous les membres du jury : **Pr. BETTACHE Azzeddine** (U. Bejaia), pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury; **Pr KATI Djamel Eddine** (U. Béjaia) ainsi que **Pr IDOUI Tayeb** (U.Jijel) pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de nous faire part de leurs précieuses remarques.

Je tiens à exprimer également mes plus chaleureux remerciements au **Pr SOBHI Wided** (CRBt) qui m'a accueilli les bras grands ouverts au sein du Laboratoire de Biochimie Appliquée (université de Sétif) et au CRBT (Constantine), votre aide et votre engagement si précieux, ont profondément contribué à ma formation et mon évolution.

Je tiens à présenter l'expression de ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères à **Pr BENDALI Farida**. Merci énormément Madame pour votre dévouement, tous les conseils et les encouragements dont vous m'avez fait part et la confiance que vous avez placée en moi.

Mes sincères remerciements vont à tous les membres du Laboratoire de Biochimie Appliquée, enseignants, ingénieurs et doctorants pour leur aide et pour l'ambiance agréable de travail que nous avons partagé. Je remercie également le Directeur de laboratoire, **Pr ARRAR Lekhmissi** pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans de très bonnes conditions.

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire LBME du Centre de Biotechnologie de Sfax (Tunisie), qui m'a chaleureusement accueilli, y compris les thésards, chercheurs, ingénieurs et techniciens. Je tiens à exprimer une reconnaissance particulière au **Pr BEN SALAH Riadh** et au **Dr TRABELSI Imen** pour leur aide et leur soutien sans faille tout au long de mon stage d'un mois, qui a été essentiel à la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements à tous les enseignants de l'Université de Sétif et Béjaia qui ont contribué à ma formation durant ces trois cycles universitaires.

Merci à vous tous.

### *Liste des Abbreviations*

**A:** Absorbance  
**ABTS+ :** 2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique)  
**ANOVA:** Analysis of Variance  
**ATCC:** American Type Culture Collection  
**BL :** Bactéries Lactiques  
**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool  
**DMEM:** Dulbeco's Modified Eagle Medium  
**DO:** Densité optique  
**DPPH:** 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl  
**E.:** *Escherichia*  
**EDTA:** Ethylenediaminetetraacetic acid  
**EFSA:** l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments  
**FAO:** Food and Agriculture Organization  
**GRAS:** Generally Recognized As Safe  
**L.:** *Lactiplantibacillus*  
**m/v :** masse/volume  
**m/m:** masse/masse  
**MATH:** Microbial Adhesion To Hydrocarbons  
**PBS:** Phosphate Buffered Saline  
**PCR:** Polymerase Chain Reaction  
**SVF :** Sérum de Veau Fœtal  
**TGI:** Tractus Gastro-Intestinal  
**v/v:** volume/ volume  
**WHO:** World Health Organization

## Liste des figures

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Sélection des probiotiques dans l'industrie avicole .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 9  |
| <b>Figure 2.</b> Modes d'action et activités bénéfiques des probiotiques chez les volailles. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 19 |
| <b>Figure 3.</b> Présentation schématique de la procédure d'extrusion (Créé avec BioRender.com). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 25 |
| <b>Figure 4.</b> La structure des unités chimiques de l'alginate .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 29 |
| <b>Figure 5.</b> Analyse phylogénétique moléculaire des cinq souches de bacilles par la méthode du Maximum de Vraisemblance basée sur les séquences du gène ARNr 16S. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 52 |
| <b>Figure 6.</b> Effet du surnageant cellulaire AML3F et AML2 à différentes concentrations sur la viabilité des cellules NIT-1 en utilisant le test XTT. Les résultats présentés sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM et proviennent de trois expériences indépendantes. "ns" indique des résultats non significatifs, selon l'ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey par rapport au contrôle négatif (PBS). ....                                                                                                  | 54 |
| <b>Figure 7.</b> Effet du surnageant cellulaire AML3F et AML2 et de la doxorubicine à différentes concentrations sur la viabilité de la lignée cellulaire du cancer du sein EMT6. Les cellules EMT6 ont été prétraitées avec le surnageant à différentes concentrations (0-27 $\mu$ g/mL). La doxorubicine a été utilisée comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM (n=3) ; ns : non significatif par rapport au contrôle négatif (ANOVA à un facteur suivie du test post hoc de Tukey). .... | 55 |
| <b>Figure 8.</b> Activité non hémolytique des souches de <i>Lactiplantibacillus sp.</i> ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 55 |
| <b>Figure 9.</b> Auto-aggrégation des souches de <i>Lactiplantibacillus sp.</i> Les résultats ont été exprimés en tant que moyenne de trois répétitions $\pm$ écart-type (p < 0,01). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 58 |
| <b>Figure 10.</b> Proportion d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures pour différentes souches de <i>L. plantarum</i> utilisant du chloroforme et de l'hexane. Tous les résultats sont représentés comme la moyenne $\pm$ écart-type. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 58 |
| <b>Figure 11.</b> Formation de biofilm par 4 souches de <i>Lactoplantibacillus plantarum</i> sur des microplaques en polystyrène à 96 puits à 37°C pendant 24 h. <b>(a)</b> : la Densité optique a 630nm. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de la moyenne (n = 4). <b>(b)</b> : Les photographies des biofilms teints au violet cristal. ....                                                                                                                                                                | 60 |
| <b>Figure 12.</b> Tolérance aux concentrations de 0,2 % et 0,5 % de phénol par les souches de <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> . Les données sont les moyennes de trois expériences répétées, et les barres d'erreur indiquent les écarts-types. ....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 61 |
| <b>Figure 13.</b> Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH des souches de <i>Lactiplantibacillus sp.</i> (exprimée en % $\pm$ écart-type). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 62 |
| <b>Figure 14.</b> Activité de piégeage de l'ABTS du surnageant des isolats de <i>Lactiplantibacillus</i> . Les valeurs sont exprimées en moyenne $\pm$ erreur standard de la moyenne de trois répétitions ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 63 |
| <b>Figure 15.</b> Activités enzymatiques dees souches de <i>Lactoplantibacillus sp.</i> a: activité protéolytique ; b : activité lipolytique ; c : activité cellulolytique." ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 65 |
| <b>Figure 16.</b> Microcapsules lyophilisées, montrant la granularité de l'échantillon (à gauche) et l'uniformité à grande échelle du produit (à droite). Les microcapsules ont été séchées à l'aide d'un lyophilisateur (CHRIST ALPHA 1-2 LD plus lyophilisateur (Allemagne)). ....                                                                                                                                                                                                                                         | 65 |
| <b>Figure 17.</b> Micrographies électroniques à balayage des billes d'alginate lyophilisées contenant des <i>L.plantarum</i> . Grossissement X100, X200 et X600, respectivement. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 67 |
| <b>Figure 18.</b> Effet des sucs gastriques (A) et intestinaux (B) sur la viabilité des souches de <i>Lactiplantibacillus sp.</i> libres et encapsulées, exprimé en % $\pm$ écart-type (SD) de trois expériences séparées. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 68 |

## Liste des tableaux

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau I.</b> Genres des bactéries et levures considérés comme probiotiques. ....                                               | 6  |
| <b>Tableau II.</b> Activité antibactérienne des souches de bacilles vis-à-vis de cinq pathogènes. ....                              | 49 |
| <b>Tableau III.</b> Résultats du BLAST des séquences ARNr 16S des cinq isolats de bacilles. ....                                    | 51 |
| <b>Tableau IV.</b> Résistance aux antibiotiques des cinq souches de <i>Lactiplantibacillus</i> . ....                               | 56 |
| <b>Tableau V.</b> Efficacité de l'encapsulation (EE) des souches de <i>Lactiplantibacillus sp.</i> dans des billes d'alginate. .... | 66 |

## Sommaire

|                   |   |
|-------------------|---|
| Introduction..... | 1 |
|-------------------|---|

### Partie bibliographique

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Probiotiques .....                                                                             | 5  |
| I.1. Définition .....                                                                             | 5  |
| I.2. Classification des probiotiques.....                                                         | 6  |
| I.3. Principal genre des bactéries lactiques: <i>Lactobacillus</i> comme probiotiques .....       | 6  |
| I.3.1. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> .....                                                 | 8  |
| I.4. Critères de sélection des souches probiotiques pour les poulets de chair .....               | 8  |
| I.5. Biomolécules Actives Produites par les BL .....                                              | 12 |
| I.6. Effet probiotique des bactéries lactiques .....                                              | 15 |
| I.6.1. Modulation de la réponse immunitaire .....                                                 | 15 |
| I.6.2. Compétition avec les microorganismes pathogènes .....                                      | 16 |
| I.6.3. Amélioration de la digestion des nutriments .....                                          | 16 |
| I.6.4. Production de métabolites bénéfiques .....                                                 | 17 |
| I.6.5. Réduction de l'inflammation intestinale .....                                              | 17 |
| I.7. Probiotique en élevage avicole.....                                                          | 18 |
| I.8. Amélioration de la santé intestinale par le genre <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ..... | 22 |
| II.Encapsulation des probiotiques.....                                                            | 23 |
| II.1. Méthodes d'encapsulation .....                                                              | 23 |
| II.1.1. Extrusion .....                                                                           | 24 |
| II.1.2. Émulsification.....                                                                       | 25 |
| II.1.3. Coacervation.....                                                                         | 26 |
| II.1.4. Sécheresse par pulvérisation .....                                                        | 26 |
| II.2. Polymères pour la microencapsulation des probiotiques.....                                  | 27 |
| II.2.1. Alginate .....                                                                            | 28 |
| II.2.2. $\kappa$ -Carrageenan.....                                                                | 29 |
| II.2.3. Chitosane .....                                                                           | 29 |
| II.2.4. Gélatine .....                                                                            | 30 |
| II.2.5. Amidon.....                                                                               | 30 |
| II.2.6. Xanthane.....                                                                             | 31 |

### Matériel & méthodes

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| I. Les bactéries lactiques ..... | 32 |
| I.1. Revivification.....         | 32 |

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.2. Standardisation des inocula .....                                                                                    | 32 |
| I.3. Activité antibactérienne des isolats .....                                                                           | 33 |
| I.3.2. Méthode indirecte (Test de diffusion en puits) .....                                                               | 34 |
| I.4. Identification moléculaire des isolats .....                                                                         | 34 |
| I.5. Etude de l'innocuité des souches.....                                                                                | 36 |
| I.5.1. Test de cytotoxicité .....                                                                                         | 36 |
| I.5.2. Activité hémolytique.....                                                                                          | 38 |
| I.5.3. Résistance aux antibiotiques .....                                                                                 | 38 |
| I.6. Propriétés physiologiques .....                                                                                      | 39 |
| I.6.1. Autoaggrégation.....                                                                                               | 39 |
| I.6.2. Hydrophobicité de la paroi.....                                                                                    | 39 |
| I.6.3. Adhésion des souches sur des microplaques en polystyrène (MATH) .....                                              | 40 |
| I.6.4. Tolérance au phénol .....                                                                                          | 41 |
| I.7. Propriétés fonctionnelles .....                                                                                      | 41 |
| I.7.1. Pouvoir antioxydant .....                                                                                          | 41 |
| I.7.2. Activités enzymatiques .....                                                                                       | 43 |
| I.7.3. Production d'EPS .....                                                                                             | 44 |
| II. Encapsulation .....                                                                                                   | 44 |
| II.1. Préparation de billes d'alginate contenant les bactéries lactiques .....                                            | 44 |
| II.2. Effet de l'encapsulation sur la viabilité.....                                                                      | 45 |
| II.3. Caractérisation des billes lyophilisées par microscopie électronique à balayage .....                               | 45 |
| II.4. Effet de l'encapsulation sur la survie bactérienne dans des conditions simulées du tractus gastro-intestinal        | 46 |
| II.5. Inhibition de <i>Fusarium graminearum</i> par les souches de <i>Lactiplantibacillus</i> libres et encapsulées ..... | 47 |

## **Résultats & discussion**

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Bactéries lactiques .....                                                | 48 |
| I.1. Revivification.....                                                    | 48 |
| I.2. Activité antibactérienne des isolats .....                             | 48 |
| I.3. Identification moléculaire des isolats .....                           | 51 |
| I.4. Etude de l'innocuité des souches.....                                  | 53 |
| I.4.1. Test de cytotoxicité .....                                           | 53 |
| I.4.2. Activité hémolytique.....                                            | 55 |
| I.5. Propriétés physiologiques .....                                        | 57 |
| I.5.1. Autoaggrégation et hydrophobicité de la surface cellulaire.....      | 57 |
| I.5.2. Adhésion des souches sur des microplaques en polystyrène (TCP) ..... | 59 |
| I.5.3. Tolérance au phénol .....                                            | 60 |

|                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.6. Propriétés fonctionnelles .....                                                                                                   | 61 |
| I.6.1. Pouvoir antioxydant .....                                                                                                       | 61 |
| I.6.2. Activités enzymatiques .....                                                                                                    | 63 |
| II. Encapsulation .....                                                                                                                | 65 |
| II.1. Effet de l'encapsulation sur la viabilité et caractérisation des billes d'alginate par microscopie électronique à balayage ..... | 65 |
| II.2. Effet de l'encapsulation sur la survie bactérienne dans des conditions simulées du tractus gastro-intestinal .....               | 67 |
| II.3. Inhibition de <i>Fusarium graminearum</i> par les souches de <i>Lactiplantibacillus</i> libres et encapsulées .....              | 70 |
| Conclusion .....                                                                                                                       | 72 |
| Références bibliographiques                                                                                                            |    |
| Annexes                                                                                                                                |    |

# Introduction

L'importance de la santé intestinale dans la production de poulets de chair est une priorité clé dans l'industrie, un intestin sain étant essentiel pour une performance et une productivité optimale des volailles (**Naeem, 2018; Souza et al., 2020**). Des facteurs tels que les soins prodigués aux poussins, la qualité des aliments et l'utilisation d'additifs jouent un rôle crucial dans le maintien de la santé intestinale (**Souza et al., 2020**).

L'utilisation de divers additifs dans les régimes alimentaires des poulets de chair joue un rôle crucial dans l'amélioration de la croissance, de la santé et de la qualité de la viande. Ces additifs peuvent être classés en suppléments nutritionnels et protecteurs de la santé, les antibiotiques étant un choix traditionnel (**Doski et Yaseen, 2023**).

Les antibiotiques sont utilisés normalement pour traiter les maladies microbiennes depuis plus de 50 ans. Cependant, l'utilisation excessive d'antibiotiques peut entraîner le développement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes. De plus, les antibiotiques causent d'autres problèmes, tels que la destruction de certaines bactéries bénéfiques dans l'intestin des volailles (**Alagawany et al., 2018**).

L'utilisation des probiotiques dans la production avicole a suscité une attention considérable en tant qu'alternative viable aux antibiotiques, notamment pour améliorer la santé intestinale, la performance de croissance et la qualité de la viande. Les probiotiques, qui sont des micro-organismes vivants apportant des bienfaits pour la santé, jouent un rôle crucial dans le maintien d'un microbiote intestinal équilibré, l'amélioration de l'absorption des nutriments et le renforcement de l'immunité chez les volailles (**Halder et al., 2024**).

Les bactéries lactiques (BL) jouent un rôle essentiel dans la nutrition animale, principalement en rétablissant l'équilibre de la microflore intestinale et en favorisant l'homéostasie. Leurs propriétés probiotiques ont été largement étudiées, mettant en évidence

divers mécanismes par lesquels elles améliorent la santé des animaux (**Fuller, 1989; Chaucheyras-Durand et Durand, 2010**).

Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, pour être reconnus comme tels, doivent satisfaire à plusieurs critères fondamentaux (**Parichat et Pongsak, 2023**). Ils doivent d'abord être rigoureusement identifiés au niveau du genre, de l'espèce et de la souche. Leur innocuité pour le consommateur doit être démontrée dans le cadre de l'usage prévu. De plus, leur efficacité doit être validée par des preuves scientifiques attestant de leurs bienfaits sur la santé. Enfin, ils doivent être présents en quantité suffisante et rester viables dans le produit jusqu'à sa consommation, afin de garantir leur action bénéfique.

Des recherches approfondies ont révélé les bienfaits des microorganismes pour la santé, ce qui a conduit à la découverte de nombreuses nouvelles applications (**Braune et Blaut, 2016; Douillard et de Vos, 2019**). Notamment, l'utilisation des espèces de *Lactiplantibacillus* comme alternative aux antibiotiques dans l'élevage animal a suscité une attention considérable (**Liu et al., 2023**).

*Lactiplantibacillus* est largement répandu dans divers environnements, tels que le tractus gastro-intestinal et urogénital des humains et des animaux. Ces bactéries polyvalentes présentent diverses caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétiques, y compris la production de substances antimicrobiennes telles que des peptides, des exopolysaccharides, des métabolites secondaires et des acides organiques (**Vijayakumar et al., 2015**). *Lactiplantibacillus plantarum* est largement utilisé comme probiotique (**Abdelazez et al., 2018**). Ces probiotiques possèdent des attributs tels que la régulation du pH, la production de vitamines, d'enzymes et de composés antibactériens. Ils sont également connus pour leur capacité à restaurer une microflore intestinale saine après des perturbations causées par des maladies (**Chaubey et al., 2000; Nami et al., 2014**). **Ouwehand et al. (1999)** a démontré que

*Lactiplantibacillus* améliore la croissance et la qualité des produits des animaux sans avoir d'impact négatif . De nombreuses études ont rapporté les effets bénéfiques de ce genre sur la santé humaine et animale ( **Seddik et al., 2017; Qasim et al., 2023; Liu et al., 2023**).

Cependant, leur utilisation dans l'alimentation humaine et animale pose des défis en raison des conditions hostiles dans le tractus gastro-intestinal (TGI) et du processus de fabrication des aliments. En effet, les bactéries probiotiques sont sensibles aux facteurs environnementaux tels que l'acidité, les températures élevées et l'exposition à l'oxygène pendant la fabrication des aliments.

Pour contrer ces vulnérabilités, la technologie d'encapsulation, souvent utilisant des billes d'hydrocolloïdes, est fréquemment employée pour améliorer leur survie dans des conditions difficiles et leur fonctionnalité dans le TGI (**Rao et al., 1989; Liu et al., 2020; Yang et al., 2024**). L'encapsulation dans des billes d'alginate de calcium est l'une des techniques couramment utilisées pour l'immobilisation des cellules vivantes. L'alginate de calcium a également été fréquemment utilisé pour la microencapsulation et l'immobilisation des BL, notamment en raison de sa simplicité de manipulation, de sa non-toxicité, de son faible coût et de son acceptation en tant qu'additif alimentaire (**Damayanti et al., 2021**).

Ainsi, l'objectif principal de ce travail était d'étudier la faisabilité de l'utilisation de souches de bactéries lactiques, isolées à partir de fèces de poulets de chair, en tant que probiotiques potentiels dans l'alimentation avicole. C'est dans ce contexte que notre travail expérimental a pris naissance et s'articule autour des points suivants :

- 1- Identification et caractérisation de souches de bactéries lactiques d'intérêt probiotique, isolées à partir de fèces de poulets de chair.
- 2- Évaluer les propriétés probiotiques de ces souches, notamment leur activité antibactérienne, antioxydante, leur capacité d'auto-agrégation, d'adhésion au polystyrène, leur tolérance au phénol, ainsi que leur innocuité (absence de cytotoxicité et d'hémolyse).

- 3- Étudier l'effet de l'encapsulation en alginate sur la survie des souches sélectionnées dans des conditions simulées du tractus gastro-intestinal (TGI), en comparaison avec les cellules libres.

# **Partie bibliographique**

## **I. Probiotiques**

Vers 1900, le prix Nobel Elie Metchnikoff a émis l'hypothèse que la longévité et la bonne santé des paysans bulgares étaient dues à leur consommation de produits laitiers fermentés. Plus tard, il a été convaincu que le yaourt contenait les organismes nécessaires pour protéger l'intestin des effets néfastes d'autres bactéries nocives. Les premiers essais cliniques sur les effets des probiotiques sur la constipation ont été menés dans les années 1930. Le Département de l'Agriculture des États-Unis a approuvé un produit probiotique pour le traitement de la diarrhée (infection à *Escherichia coli*) chez les porcs dans les années 1950. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les probiotiques constituent le deuxième système de défense immunitaire le plus crucial, après que les médicaments largement prescrits soient devenus inefficaces en raison de la résistance aux antibiotiques, reconnue pour la première fois en 1994 (Parvez et al., 2006).

### **I.1. Définition**

Le mot « probiotique » est dérivé du mot grec « probios », qui signifie « vie », mais sa définition a changé au fil du temps, parallèlement à l'intérêt croissant pour l'utilisation de suppléments contenant des bactéries vivantes et aux progrès de notre compréhension de leur fonctionnement. Initialement, le terme était utilisé pour décrire les substances produites par un micro-organisme qui favorisaient la croissance d'autres micro-organismes, mais il a ensuite été utilisé pour décrire des extraits de tissus favorisant le développement microbien et des additifs dans l'alimentation animale qui bénéficiaient aux animaux en équilibrant leur flore intestinale. Jusqu'à récemment, la définition de Fuller (1989) était la plus populaire et a joué un rôle important dans le développement de l'idée des probiotiques à plusieurs égards : « les probiotiques sont des compléments alimentaires microbiens vivants qui ont un effet bénéfique sur l'animal hôte en améliorant l'équilibre microbien ». L'Organisation mondiale de la santé pour l'alimentation et l'agriculture FAO/WHO (2002) a fourni la définition actuellement utilisée, qui définit les

probiotiques comme « des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte ».

## I.2. Classification des probiotiques

Les microorganismes les plus couramment utilisés comme probiotiques sont les bactéries lactiques (BL) telles que les lactobacilles et les bifidobactéries (**Kechagia et al., 2013**). Les BL sont des espèces bactériennes à Gram positif et catalase négative qui peuvent produire de l'acide lactique comme produit final principal de la fermentation des glucides ; par conséquent, le genre *Bifidobacterium* est répertorié parmi eux plutôt que phylogénétiquement, car ils utilisent une voie métabolique distincte (**Felis et al., 2015**) (**Tableau I**).

**Tableau I.** Genres des bactéries et levures considérés comme probiotiques (**Staniszewski et Kordowska, 2021**).

| Espèces <i>Lactobacillus</i>                                                                                                      | Espèces <i>Bifidobacterium</i>                                                                       | Autres                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>L. acidophilus</i><br><br><i>L. casei</i> ,<br><br><i>L. plantarum</i> ,<br><br><i>L. rhamnosus</i> ,<br><br><i>L. reuteri</i> | <i>B. longum</i> ,<br><br><i>B. breve</i> ,<br><br><i>B. bifidum</i> ,<br><br><i>B. adolescentis</i> | <i>Streptococcus thermophilus</i><br><br><i>Pediococcus acidilactici</i><br><br><i>Kluyveromyces marxianus</i><br><br><i>Pichia kudriavzevii</i> ,<br><br><i>Pichia fermentans</i> ,<br><br><i>Escherichia coli</i><br><br><i>Saccharomyces cerevisiae</i><br><br><i>Candida norvegica</i> . |

## I.3. Principal genre des bactéries lactiques: *Lactobacillus* comme probiotiques

Selon **Schleifer et Ludwig (1995)**, le groupe des bactéries lactiques comprend différents genres, dont *Lactobacillus*, qui a été décrit pour la première fois en 1901. Toutefois,

il représente un groupe extrêmement diversifié, tant sur le plan génétique que sur le plan écologique. Les lactobacilles sont des bactéries Gram-positives qui sont principalement non mobiles, négatives pour la catalase, non formant de spores, et de forme bâtonnet. Elles peuvent également avoir une forme courbée ou avoir tendance à se développer en chaînes et se développer à une température optimale comprise entre 30 et 40°C. Ils peuplent des habitats riches en nutriments associés à la nourriture, aux aliments pour animaux, au sol, aux plantes, aux animaux (à la fois vertébrés et invertébrés), et aux humains, et sont principalement caractérisés par un métabolisme fermentatif, bien qu'ils montrent également des signes de respiration, avec l'acide lactique comme principal produit (**Palareti et al., 2016; Duar et al., 2017**). Le glucose est utilisé par les lactobacilles soit par voie homo-fermentaire (production d'acide lactique à 85%), soit par voie hétérofermentaire (production d'acide lactique, CO<sub>2</sub>, éthanol et/ou acide acétique en quantité équimolaire) (**Claesson et al., 2007; Slover, 2008**).

L'histoire de la classification des lactobacilles est complexe. Les lactobacilles étaient classés en bactéries homo-fermentaires obligatoires, hétéro-fermentaires facultatives et hétéro-fermentaires obligatoires (**Schleifer, 1987**). D'autres caractéristiques phénotypiques (comme la culture, la paroi cellulaire, les activités biochimiques et la composition en acides gras) ont permis une distinction plus précise des espèces et des souches. Dans les années 1990, la mise en place de critères génotypiques a mis en évidence de nombreuses contradictions entre la structure phénotypique et phylogénétique des lactobacilles (**Falsen et al., 1999**). Au cours des années suivantes, la substitution du modèle phénotypique de la classification des bactéries au modèle phylogénétique a conduit à une révision importante de l'ensemble de la structure de la taxonomie des bactéries lactiques, à des modifications du statut taxonomique de certaines espèces et à l'apparition de nouveaux noms dans la liste taxonomique. Alors qu'en 1991, les Lactobacilles étaient classés en trois groupes (**Collins et al., 1991**), en 1995, cinq groupes

étaient déjà proposés en fonction de critères phénotypiques et génétiques (**Schleifer et Ludwig, 1995**).

Selon **Salvetti et al. (2018)**, il existe 10 groupes phylogénétiques dans le genre *Lactobacillus*, chacun étant identifié par son espèce type : (i) *Lb. delbrueckii*, (ii) *L. alimentarius*, (iii) *L. Perolens*, (iv) *L. casei* ; (v) *L. sakei* ; (vi) *L. coryniformis* ; (vii) *L. salivarius* ; (viii) *L. plantarum* ; (ix) *L. reuteri* ; qui inclut aussi des espèces proches de *Lb. vaccinoferus*. (x) *L. buchneri* est composé de membres des groupes *L. brevis*, *L. fructivorans* et *L. collinoides*.

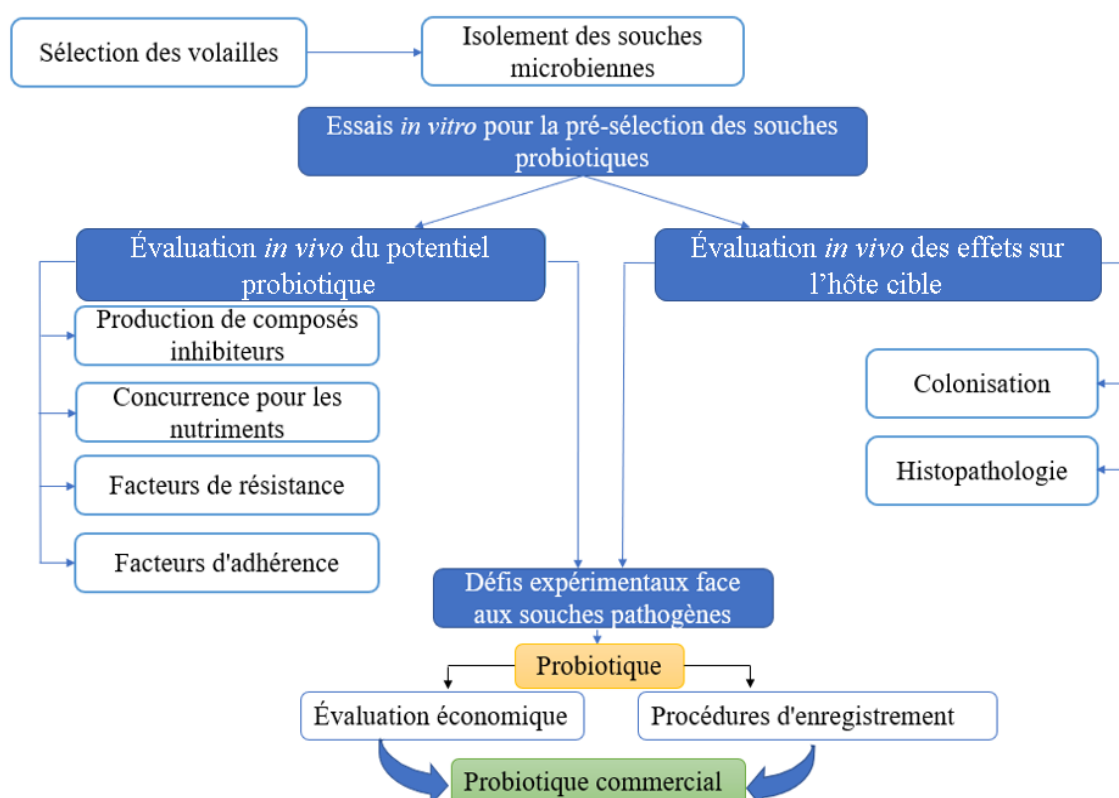
### **I.3.1. *Lactiplantibacillus plantarum***

*Lactiplantibacillus plantarum* est une bactérie à Gram positif, appartenant au genre *Lactobacillus*, et elle est largement présente dans la nature (**Siezen et al., 2010**). C'est un anaérobe facultatif typique qui ne produit que de l'acide lactique pendant la phase de fermentation. Il peut fonctionner en synergie avec d'autres bactéries lactiques (LAB) et possède une capacité puissante à fermenter les glucides. Il est également tolérant au sel. Lorsqu'il est observé au microscope électronique, il ressemble à un objet long et en forme de bâtonnet, sans spores ni flagelles, avec une épaisseur constante et une extrémité émoussée. Cette bactérie peut croître dans des conditions allant de 15 à 45 °C, bien que sa température de croissance idéale se situe entre 30 et 37 °C (**Valan Arasu et al., 2013; Martino et al., 2016**). Elle nécessite également un pH d'environ 6,5. On peut la retrouver dans le tractus urogénital (**Jose et al., 2015**), les systèmes digestifs des humains et des autres mammifères (**Parente et al., 2010**).

### **I.4. Critères de sélection des souches probiotiques pour les poulets de chair**

Il est attendu qu'une souche probiotique potentielle possède plusieurs caractéristiques essentielles pour exercer ses effets bénéfiques. Les méthodes préliminaires pour sélectionner les probiotiques en tant qu'agents de biocontrôle dans l'industrie avicole sont présentées dans la **Figure 1**. La première étape consistera à évaluer la sécurité de son utilisation, notamment en ce

qui concerne sa consommation (Saarela et al., 2000; Kechagia et al., 2013). Il devra également montrer des propriétés physiologiques qui lui permettent de survivre et de se développer avec une charge adéquate dans le tube digestif pour avoir des effets bénéfiques sur la santé (Ohashi et Ushida, 2009). Finalement, il sera nécessaire que le microorganisme probiotique possède des compétences technologiques qui facilitent son utilisation industrielle efficace et assurent sa viabilité dans la matrice alimentaire, depuis sa conception jusqu'à sa consommation (Terpou et al., 2019). La FAO/OMS a développé une norme internationale qui peut être résumée de la manière suivante pour évaluer les probiotiques et les souches qui contribuent à la santé :



**Figure 1.** Sélection des probiotiques dans l'industrie avicole (Kabir, 2009).

#### I.4.1. Origine de la souche

Le microbiome intestinal des poulets de chair est plus compatible avec les souches probiotiques isolées du même milieu écologique que l'hôte. Cela favorise la prolifération des probiotiques et leur permet d'exercer leurs avantages de manière plus efficace. Les probiotiques issus de l'intestin des poulets sont déjà adaptés aux conditions particulières de l'intestin aviaire,

comme le pH, les sels biliaires et les nutriments disponibles. Grâce à cette connaissance, leur survie et leur capacité de colonisation sont améliorées par rapport aux souches provenant de sources différentes (**Reuben et al. 2019; Sirisopapong et al., 2023**).

#### **I.4.2. Identification des souches**

D'après l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), il est nécessaire de réaliser une identification taxonomique précise de la souche pour tous les micro-organismes utilisés de manière intentionnelle dans la chaîne alimentaire (**Rychen et al., 2018**).

#### **I.4.3. Résistance aux antibiotiques**

Comme d'autres bactéries, certaines bactéries lactiques, y compris les souches probiotiques, ont été observées avec une résistance aux antibiotiques (**Salminen et al., 1998**). Selon **Bernardeau et al. (2008)**, cette résistance peut être inhérente aux gènes chromosomiques ou être associée à l'acquisition de gènes supplémentaires par le biais de plasmides ou d'autres éléments mobiles qui codent pour un mécanisme de résistance. Selon **Pradhan et al. (2020)**, les BL sont également susceptibles de changer des déterminants génétiques pour survivre dans un milieu hostile contenant des antibiotiques. Toutefois, la principale inquiétude liée à la résistance aux antibiotiques chez les bactéries probiotiques est le risque de transmission de cette résistance aux organismes pathogènes *in vivo* (**Gueimonde et al., 2013**).

La présence de marqueurs de résistance aux antibiotiques transmissibles joue un rôle crucial dans l'évaluation de l'innocuité des souches de bactéries lactiques, car des études précédentes ont signalé la présence de gènes génétiques transférables (plasmides ou transposons) qui confèrent une résistance à plusieurs antibiotiques (chloramphénicol, érythromycine, streptomycine, tétracycline et vancomycine) (**Danielsen, 2002; Comunian et al., 2010**). Selon **Toomey et al. (2009)**, des expériences de conjugaison *in vitro* ont démontré que les BL ont la capacité de transmettre leurs déterminants de résistance à d'autres espèces bactériennes. En

outre, il a été démontré que la résistance aux antibiotiques peut être transférée *in vivo* entre les BL et les bactéries commensales dans le tube digestif de rats gnotobiotiques et de souris (Jacobsen et al., 2007; Feld et al., 2008). Il est clair que les probiotiques ont également la capacité de propager des facteurs de résistance aux antibiotiques, ce qui nécessite une prise en considération des risques associés avant de mettre à la disposition des consommateurs une souche probiotique (Pradhan et al., 2020).

#### **I.4.4. Non pathogénicité de la souche**

L'un des critères les plus cruciaux à prendre en compte lors de la sélection d'un probiotique est la non pathogénicité des souches. Certaines souches probiotiques ont fait l'objet de tests spécifiques afin de garantir leur sécurité. Selon Gueimonde et Salminen (2006), l'historique de non pathogénicité de certains probiotiques pourrait être considéré comme la preuve la plus fiable de leur innocuité. Ils doivent être classés comme Généralement Reconnu Comme Sûr (GRCS).

#### **I.4.5. Capacité d'adhésion**

La prochaine étape consiste à évaluer si les candidats probiotiques potentiels peuvent coloniser les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (TGI). L'adhésion microbienne aux cellules épithéliales qui dépendent de la composition chimique et physico-chimique de la surface cellulaire de la souche probiotique. Ce comportement dépend de l'équilibre des interactions électrostatiques et de Van der Waals sur la surface cible, mais des études ont suggéré que les composants extracellulaires bactériens et la composition environnante peuvent influencer l'adhésion (Boonaert et Rouxhet, 2000; Duany et al., 2011).

Selon Pérez et al. (1998), l'adhésion bactérienne repose d'abord sur des interactions physiques non spécifiques entre deux surfaces, ce qui permet ensuite des interactions spécifiques entre les adhésines et des récepteurs complémentaires. Certaines protéines de la couche de surface

(couche S) ont été identifiées chez certaines souches de *Lactobacilli*, ce qui suggère que cette adhésion est liée à la nature protéique de ces composants (**kos et al., 2003**). L'adhésion aux cellules épithéliales intestinales nécessite l'auto- agrégation des souches probiotiques, et la capacité de co-agrégation peut constituer une barrière qui empêcherait la colonisation par des micro-organismes pathogènes. L'auto-agrégation et l'adhésion des bactéries à différentes surfaces peuvent être influencées par les caractéristiques physicochimiques de la surface cellulaire, comme l'hydrophobicité (**Del Re et al., 2000**). Cependant, avant de tirer des conclusions définitives sur l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales *in vitro*, il est crucial de considérer la complexité du mécanisme *in vivo*, qui implique des interactions complexes entre plusieurs récepteurs extracellulaires présents à la surface des cellules (**Chandran et al., 2013; Ramos et al., 2013**).

L'adhésion des probiotiques aux cellules épithéliales est liée à la fois à la capacité d'auto-agrégation et aux propriétés hydrophobes de la surface cellulaire. La capacité d'auto-agrégation des cellules microbiennes assure que le probiotique atteint une densité cellulaire élevée dans l'intestin, contribuant ainsi au mécanisme d'adhésion, tandis que l'hydrophobicité de la surface cellulaire permet une interaction améliorée entre les probiotiques et les cellules épithéliales (**kos et al., 2003; Tuo et al., 2013; Ogunremi et al., 2015**).

### **I.5. Biomolécules Actives Produites par les BL**

Différentes substances antimicrobiennes, antivirales et antifongiques, telles que les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl et les peptides antimicrobiens comme les bactériocines, sont connues pour être produites par diverses souches de *Lactiplantibacillus plantarum* (**Arena et al., 2016**).

➤ **Bactériocines**

Les bactériocines sont des peptides ou des protéines antibactériennes produites par des bactéries telles que *Lactobacillus* et *Bifidobacteria*. Elles possèdent une forte activité antibactérienne. Les bactériocines sont classées en fonction de leur taille, de leur mode d'action et de leur spectre d'inhibition. Elles ont de nombreux effets bénéfiques, tels que l'inhibition de la croissance et du développement des bactéries pathogènes, ainsi qu'une résistance à la chaleur et au pH. Le mécanisme antibactérien des bactériocines se manifeste principalement par leur effet sur les membranes cytoplasmiques bactériennes, en affectant les composants sensibles comme les peptides bactériens et en inhibant la croissance des spores et la formation de pores dans la membrane cellulaire des bactéries pathogènes (Gálvez et al., 2007; O'Connor et al., 2020).

➤ **Acides Gras**

Les acides gras figurent parmi les métabolites les plus importants des bactéries probiotiques. Ces composés offrent de nombreux effets bénéfiques, tels que des propriétés antibactériennes et antivirales. L'effet antiviral des acides gras est lié à leurs propriétés structurales uniques. Ils sont constitués d'une chaîne carbonée saturée et insaturée reliée par un groupe carboxyle (hydrophile). Les acides laurique et méristique sont particulièrement efficaces contre la croissance et le développement des bactéries. Ces dernières années, les acides gras à chaîne courte produits par les bactéries probiotiques ont suscité une attention considérable en raison de leurs puissantes propriétés antibactériennes, ce qui les positionne comme des alternatives prometteuses aux antibiotiques (Churchward et al., 2018 ; Mali et al., 2020 ; Hsu et al., 2024).

➤ **Acide Organique**

Les acides organiques produits par les probiotiques peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens et antiviraux. Ces acides sont reconnus comme d'importants post-biotiques. Les acides les plus importants produits par les bactéries probiotiques sont l'acide citrique, l'acide acétique et l'acide tartrique, tous possédant de fortes propriétés antibactériennes. L'acide lactique, l'acide acétique, l'acide tartrique, l'acide malique et l'acide citrique inhibent les pathogènes en abaissant significativement le pH. L'effet inhibiteur de l'acide lactique est lié à son impact sur les membranes cellulaires bactériennes. Le mécanisme antibactérien des acides organiques est principalement observé par la réduction du pH intracellulaire et la diminution de l'intégrité des membranes. L'acide lactique existe en deux isomères : L et D, avec l'isomère L étant plus efficace pour prévenir les infections virales. L'acide citrique et l'acide acétique contribuent également à la prévention des infections virales en créant un environnement acide. Le mécanisme antiviral des acides organiques produits par les bactéries probiotiques se manifeste par la liaison des acides organiques à la glycoprotéine (S) des virus, empêchant ainsi les virus de se lier à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (**Mani-López et al., 2012; Churchward et al., 2018; Aljumaah et al., 2020; Gurung et al., 2020**).

➤ **Peroxyde d'Hydrogène**

Le peroxyde d'hydrogène est produit principalement par toutes les bactéries, mais il est particulièrement visible dans les cultures aérobies de bactéries négatives pour la catalase et constitue le principal métabolite des bactéries lactiques (**Aljumaah et al., 2020**). Ces substances possèdent de puissantes propriétés antivirales. Elles désinfectent les matériaux en interagissant avec les composants essentiels des bactéries, des champignons et des virus, tels que les enzymes et les acides nucléiques (ADN et ARN), empêchant ainsi leur réplication et leur infection (**Bidra et al., 2020**).

### ➤ Exopolysaccharide

Les EPS sont des composants bactériens produits par les BL qui jouent un rôle important dans l'activité probiotique, telle que la survie, l'adhésion et l'effet anti-tumoral. Les EPS des BL présentent une large gamme de compositions en sucres, pouvant être classées en homopolysaccharides (un seul type de monosaccharide) ou en hétéropolysaccharides (un squelette d'unités répétées constituées de deux types de monosaccharides ou plus). Les BL sont principalement responsables de la production d'hétéropolysaccharides, composés de divers sucres tels que glucose, galactose, mannose, rhamnose, N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine (Sungur et al., 2017). L'exopolysaccharide dérivé de *Lactococcus lactis*, en tant que postbiotique, est capable d'une activité antioxydante en augmentant les niveaux d'enzymes antioxydantes (par exemple, catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase) tout en diminuant la peroxydation lipidique (par exemple, malondialdéhyde) dans le sérum et les foies de souris (Guo et al., 2013).

## I.6. Effet probiotique des bactéries lactiques

### I.6.1. Modulation de la réponse immunitaire

*Lactoplantibacillus plantarum* a été largement étudié pour ses propriétés immunomodulatrices chez les poulets. Selon les recherches, des souches de *L. plantarum* telles que GX17 (Abbas, 2022), CRL681, et CRL1506 (Yin et al., 2023) peuvent renforcer les réponses immunitaires des poulets. Ces souches ont démontré leur capacité à améliorer les réponses immunitaires humores, la production de cytokines, et la fonction de barrière intestinale, entraînant une meilleure résistance aux pathogènes tels que *E. coli* et *Salmonella gallinarum*. Les postbiotiques de *L. plantarum* ont également montré une amélioration des performances de croissance, de la synthèse de mucine, et de l'état immunologique chez les poulets de chair, favorisant la santé intestinale et la colonisation de bactéries bénéfiques (Baïllo

et *al.*, 2023). De plus, l'administration de lactobacilles, que ce soit *in ovo* ou par voie orale, a été démontrée pour modifier l'expression des gènes des cytokines, les réponses en anticorps, et la cellularité de la rate, indiquant un impact majeur sur les systèmes immunitaires avicoles (Chang et *al.*, 2022).

### **I.6.2. Compétition avec les microorganismes pathogènes**

*Lactiplantibacillus plantarum* a montré un excellent potentiel probiotique dans l'aviculture en luttant contre les bactéries pathogènes. Les études ont révélé que les souches de *L. plantarum* possèdent une action antibactérienne contre des pathogènes tels que *Salmonella*, *E. coli*, et *Listeria*, limitant leur prolifération (Igbofe et *al.*, 2020; Akpa et *al.*, 2022). De plus, les isolats de *L. plantarum* ont montré une tolérance aux environnements acides et aux sels biliaires, nécessaires à la survie dans le tractus intestinal des poulets (Wadoun et *al.*, 2019; Ahmad et *al.*, 2022). En outre, les souches de *L. plantarum* ont présenté une activité antibactérienne contre diverses maladies, montrant leur capacité à inhiber les bactéries pathogènes chez les volailles (Tabashsum et *al.*, 2020). Ces résultats indiquent que *L. plantarum*, grâce à ses propriétés probiotiques, peut efficacement concurrencer les bactéries pathogènes chez les poulets, offrant une alternative possible aux antibiotiques pour améliorer la santé aviaire et prévenir la propagation de la résistance aux antibiotiques.

### **I.6.3. Amélioration de la digestion des nutriments**

*Lactiplantibacillus plantarum* a montré des avantages considérables pour améliorer la digestion des nutriments chez les volailles. Les études ont révélé que la supplémentation des poulets de chair avec des souches de *L. plantarum*, telles que GX17 et MB001, ainsi que des postbiotiques tels que RG11 et RS5, améliore les performances de croissance, la digestibilité nutritionnelle et la santé intestinale. Ces probiotiques et postbiotiques ont montré leur capacité à augmenter le ratio hauteur des villosités/profondeur des cryptes, stimuler l'expression des gènes de la barrière intestinale, accroître la production de mucine, et exercer une influence

favorable sur la composition du microbiote intestinal (**Sampath et al., 2021; Chang et al., 2022; Vimont et al., 2023; Yin et al., 2023**). En outre, il a été démontré que *L. plantarum* P-8 influence le microbiome intestinal, améliore l'activité métabolique et optimise l'utilisation des nutriments chez les volailles, ce qui pourrait favoriser une meilleure efficacité de la digestion nutritionnelle (**Gao et al., 2017**). De façon générale, l'emploi de souches de *Lactiplantibacillus plantarum* et de postbiotiques pourrait améliorer l'efficacité de la digestion des nutriments chez les poulets.

#### **I.6.4. Production de métabolites bénéfiques**

*Lactiplantibacillus plantarum* produit divers métabolites bénéfiques pour les volailles. Parmi ceux-ci, les métabolites postbiotiques présentent des effets antiprolifératifs et cytotoxiques sur les cellules cancéreuses, tout en épargnant les cellules normales (**Chuah et al., 2019**). De plus, le jus de ciboule fermenté par *L. plantarum* a montré des activités antimicrobiennes et antivirales accrues contre les pathogènes aviaires (**Kothari et al. 2020**). Les métabolites produits par *L. plantarum* influencent également la croissance, les lipides sanguins et la santé intestinale des poulets, avec des effets sur le contenu en polyamines et la hauteur des villosités (**Hashemi et al., 2018**). En outre, *L. plantarum* MYS6 produit des composés antifongiques qui inhibent la croissance des champignons et réduisent le contenu en fumonisines dans l'aliment, Ce qui en fait un agent potentiel de biocontrôle pour la sécurité alimentaire des volailles. De manière générale, les métabolites produits par *L. plantarum* offrent une gamme de bénéfices pour la santé et les performances des volailles, montrant son potentiel en tant qu'additif précieux en nutrition et gestion de la santé aviaire (**Deepthi et al., 2016**).

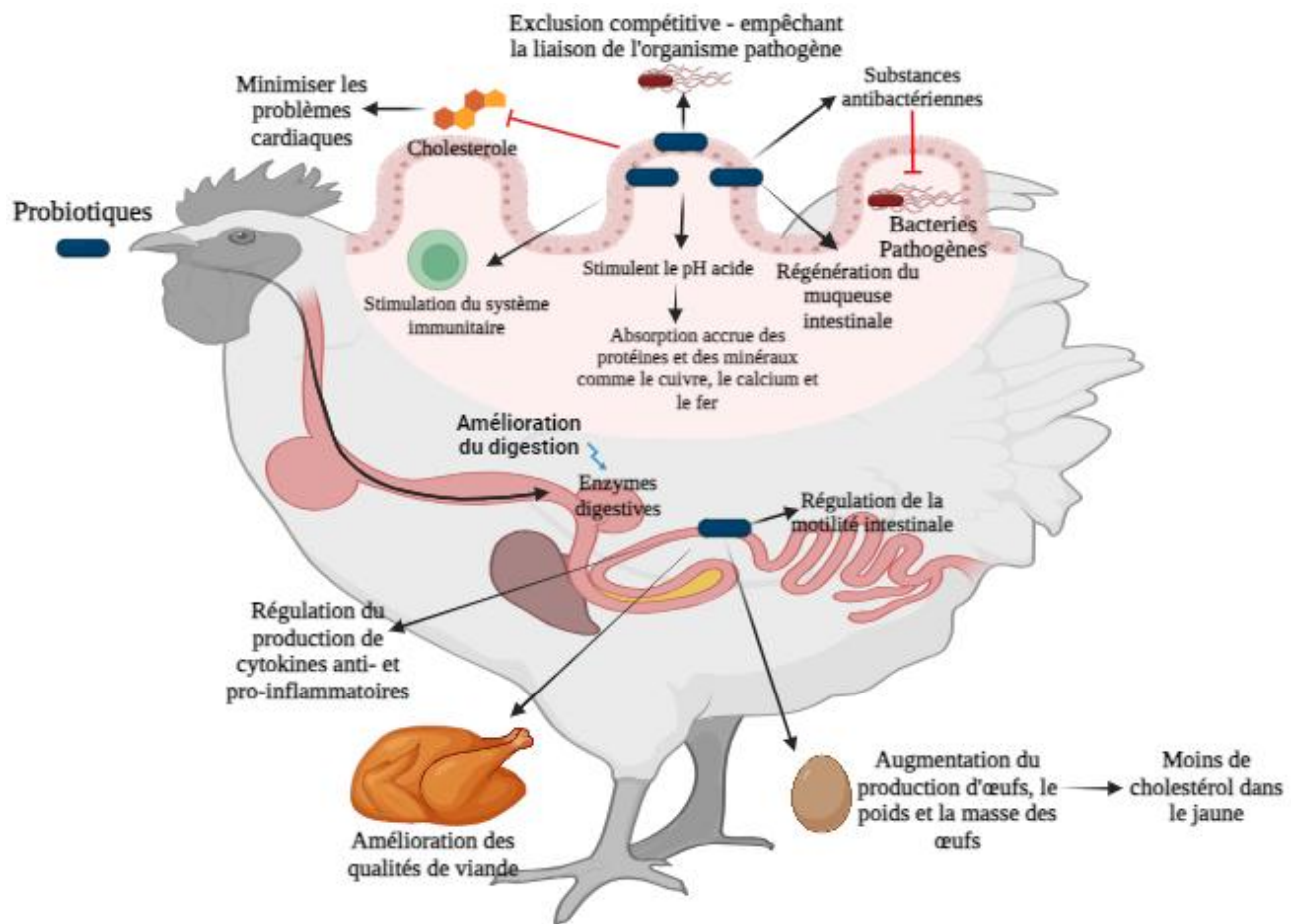
#### **I.6.5. Réduction de l'inflammation intestinale**

*Lactiplantibacillus plantarum* a démontré des effets bénéfiques significatifs dans la réduction de l'inflammation intestinale chez les poulets. Les études ont révélé que *L. plantarum* peut diminuer l'inflammation causée par des infections telles que *Salmonella Typhimurium*

(Peng et al., 2022), *ETEC K88* (Wang et al., 2023), et *Clostridium perfringens*, (Yang et al., 2021) dans divers modèles de poulets. Ces processus impliquent la modulation des cytokines inflammatoires, telles que les interleukines et le facteur de nécrose tumorale, ainsi que des voies de signalisation critiques, notamment MAPK et NF- $\kappa$ B. *L. plantarum* aide également à préserver l'intégrité de la barrière intestinale, réduire l'apoptose, et améliorer l'équilibre du microbiote intestinal, contribuant ainsi à la réduction de l'inflammation intestinale. Ces résultats soulignent le potentiel de *L. plantarum* comme probiotique pour les volailles, renforçant la santé intestinale, les réponses immunologiques et le bien-être général face aux stress inflammatoires.

### **I.7. Probiotique en élevage avicole**

Ces dernières années, l'attention s'est portée sur l'utilisation des probiotiques comme additifs alimentaires, une alternative aux antibiotiques (Liu et al., 2023). Selon les études, il a été prouvé que les probiotiques peuvent favoriser l'équilibre des micro-organismes dans l'intestin et renforcer le système de défense naturel des animaux contre les bactéries pathogènes (Ohashi et Ushida, 2009; Newaj-Fyzul et al., 2014). La **Figure 2** illustre les modes d'action et les activités bénéfiques des probiotiques chez les volailles. Différentes bactéries lactiques s'adaptent naturellement à l'environnement intestinal et produisent des substances antimicrobiennes (bactériocines et acides organiques), ce qui leur donne un avantage considérable par rapport à d'autres micro-organismes pour être utilisées comme additifs probiotiques (Aliakbarpour et al., 2012).



**Figure 2.** Modes d'action et activités bénéfiques des probiotiques chez les volailles (Alagawany et al., 2018).

De nombreuses recherches ont démontré que l'incorporation de probiotiques favorise la croissance, l'efficacité alimentaire et l'utilisation des nutriments, tout en diminuant le taux de mortalité (Silva et al., 2010; Sen et al., 2012). L'efficacité des probiotiques repose principalement sur le choix de souches plus performantes, la manipulation génétique, l'interaction entre plusieurs souches et la combinaison de probiotiques avec des composants agissant de manière synergique (Song et al., 2014).

Les probiotiques présentent plusieurs avantages pour l'hôte, notamment en renforçant le système immunitaire des muqueuses, en améliorant l'environnement intestinal et en optimisant la fonction de la barrière épithéliale et muqueuse (Yosef et al., 2012). Ces additifs peuvent stimuler l'appétit et faciliter la digestion en atténuant les troubles intestinaux, renforcer le

système immunitaire pour promouvoir les réponses immunitaires, et servir de nouveaux adjuvants muqueux pour améliorer les réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques aux vaccins (**Borchers et al., 2009**). Les applications des probiotiques sont très prometteuses grâce à leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-cancéreuses, anti-mutagènes, anti-diabétiques et antivirales contre divers virus aviaires (**Alloui et al., 2013**).

L'intestin joue un rôle crucial dans l'évaluation de l'efficacité d'un probiotique. La croissance des cryptes et l'augmentation de la longueur des villosités intestinales sont parmi les effets les plus recherchés pour améliorer l'absorption des nutriments et favoriser une colonisation bactérienne adéquate (**Awad et al., 2009; Pourakbari et al., 2016**). Outre les éléments évoqués, on a constaté une augmentation de la masse de certaines parties du tractus gastro-intestinal, dont le caecum (**Cean et al., 2015**), ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur de la muqueuse (**Ghasemi-Sadabadi et al., 2019**). En plus de la masse, la longueur de l'intestin a également connu une augmentation importante (**Kasan et al., 2015**).

Les plaques de Peyer, qui jouent un rôle dans la réponse immunitaire du corps, sont également plus nombreuses dans la muqueuse et la sous-muqueuse de l'intestin grêle, ce qui peut être un élément clé dans la lutte contre les pathogènes (**Samli et al., 2007 ; Olnood et al., 2015**). Toutefois, l'épaisseur de la muqueuse et la musculature intestinale n'ont pas changé avec l'administration du probiotique (**Yan et al., 2018**). Les os ont été renforcés grâce à un régime riche en probiotiques qui a augmenté la rétention de calcium et de phosphore. Cette amélioration de la minéralisation osseuse ainsi qu'une augmentation des concentrations sériques de ces éléments ont été observées (**Khan et Naz, 2013**).

Il a aussi influencé positivement l'épaisseur des parois (médiale et latérale), le taux de cendres et l'indice tibial, ainsi que la taille et la masse du tibia et du fémur, ainsi que leur densité (**Yan et al., 2018**). Il est également possible d'utiliser des probiotiques pour prévenir et diminuer

les conséquences des maladies et des pathologies du système osseux, telles que la résorption osseuse. Le télopeptide C-terminal du collagène de type I représente un indicateur de la qualité de la prise en charge des maladies ; l'ajout de ces additifs alimentaires peut aider à prévenir la détérioration osseuse (**Wideman et al., 2012**).

Les poulets de chair qui ont reçu un probiotique immédiatement après l'éclosion présentent une boiterie plus rare, et chez les volailles ayant une chondronécrose bactérienne, on a constaté une amélioration de la marche (**El-Faham et al., 2018**). Les dimensions corporelles et osseuses des poussins étaient également plus grandes que celles de ceux qui ne consommaient pas de probiotique (**Ghasemi-Sadabadi et al., 2019**).

Les probiotiques influencent non seulement les propriétés physiques de la viande, mais aussi ses propriétés chimiques. Cela dépend de la composition et de la concentration du probiotique en question. Les probiotiques ont un effet positif sur le poids global des carcasses, avec une réduction de la graisse abdominale, ce qui conduit à une amélioration de la qualité des carcasses de volaille. Une augmentation du rendement des carcasses a été observée chez les poulets, indépendamment du sexe (**Hidayat et al., 2016**). Cela représente un aspect économique important. La présence d'additifs probiotiques dans l'alimentation entraîne une absorption accrue des nutriments, y compris des acides aminés nécessaires à la construction des tissus, ce qui se traduit par une augmentation du poids des carcasses (**Hidayat et al., 2016 ; Aziz et al., 2020**). La teneur en protéines de la viande de cuisse et de poitrine a été améliorée. Selon la concentration de probiotique administrée, l'effet de l'expérience variait ; la concentration de 0,160 g de probiotique par litre d'eau de boisson a provoqué une augmentation de l'absorption d'eau dans les muscles pectoraux et fémoraux, tandis que la concentration de 0,175 g de probiotique par litre d'eau de boisson a donné l'effet inverse (**El-Faham et al., 2018**). Selon **Duskaev et al. (2020)**, les probiotiques ont également un effet positif sur l'augmentation de la quantité d'éléments chimiques dans le foie (Ca, K, Mg, Mn, Si et Zn) et les muscles de poitrine

de poulet (Ca, Na, Co, Cu, Fe, Mn, Ni et Zn). Les chercheurs ont également montré des effets sur la microstructure de la viande. L'homogénéisation de la viande et la supplémentation en probiotiques ont diminué la destruction des myofibrilles dans les muscles pectoraux (**Hussein et al., 2020**). Les probiotiques ont également un effet modéré sur la cohésion, la fermeté, la mastication et l'élasticité de la viande de poitrine cuite.

On peut également observer les effets bénéfiques de l'administration de probiotiques chez les poulets pondeurs. L'amélioration de la ponte est la première conséquence visible de la supplémentation en probiotiques. Alors que la ponte du groupe témoin diminuait, les résultats du groupe testé étaient plus élevés. En outre, aucune des poulets du groupe étudié n'a pondu d'œufs de moins de 48 g ; la plupart d'entre elles ont pondu des œufs pesant entre 63 et 73 g (**De Mille et al., 2018**). La résistance et l'épaisseur de la coquille ont augmenté pour améliorer la qualité des œufs (**Peralta-Sánchez et al., 2019**). Le probiotique a entraîné une amélioration de la fertilité et de la capacité d'éclosion des œufs dans les troupeaux traités (**Mazanko et al., 2018**). La matière sèche des œufs et le pourcentage de protéines ont augmenté dans les groupes de poulets pondeuses qui ont reçu des probiotiques, ce qui peut entraîner une augmentation du poids des œufs (**Neupane et al., 2019**). Les effets économiques de l'amélioration de la qualité de vie des animaux par le probiotique sont également positifs, car le nombre d'œufs cassés est diminué grâce à une coquille plus solide.

#### **I.8. Amélioration de la santé intestinale par le genre *Lactiplantibacillus plantarum***

*Lactiplantibacillus plantarum* a montré un potentiel significatif pour améliorer la santé intestinale chez les poulets. Selon les études, des souches de *L. plantarum*, telles que GX17 (**Yin et al., 2023**), *L. plantarum* fermenté avec SLBZS (**Lv et al., 2023**) et des postbiotiques de *L. plantarum* (**Chang et al., 2022**) améliorent la performance de croissance des poulets, les réponses immunologiques, la capacité antioxydante et les fonctions de barrière intestinale. Ces

interventions ont été associées à une absorption accrue des nutriments, un ratio hauteur des villosités/profondeur des cryptes plus élevé, et une meilleure expression des protéines des jonctions serrées dans les intestins. De plus, l'ajout de postbiotiques de *L. plantarum* est lié à une capacité antioxydante améliorée, une synthèse accrue de mucine, et une colonisation bénéfique des bactéries dans l'intestin. La microencapsulation de *L. plantarum* a également démontré une amélioration des indices immunologiques et la promotion de bactéries bénéfiques dans le microbiote intestinal ( **Eesha et al., 2023**). Globalement, *L. plantarum* montre un potentiel comme thérapie pour améliorer la santé intestinale des poulets.

## **II. Encapsulation des probiotiques**

### **II.1. Méthodes d'encapsulation**

La technique d'encapsulation de probiotiques, dans une couche extérieure protectrice est appelée "encapsulation des probiotiques." L'objectif de cette approche d'encapsulation est d'améliorer la capacité des probiotiques à survivre, à rester stables et à atteindre leur emplacement prévu dans le corps, généralement le système gastro-intestinal. Les probiotiques ont suscité beaucoup d'intérêt récemment en raison de leurs avantages potentiels pour la santé. Les probiotiques sont des bactéries bénéfiques qui offrent divers bienfaits, tels que la promotion du bien-être général, le soutien de la fonction immunitaire et le soutien de la santé digestive (**Rajam et Subramanian, 2022**).

Les probiotiques sont fragiles et vulnérables aux facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité et le pH. Leur viabilité peut facilement être compromise durant la production, le stockage et le transport. L'encapsulation protège les probiotiques de ces influences externes, leur permettant d'atteindre l'intestin en vie et d'exercer leurs effets thérapeutiques (**Haji et al., 2022**).

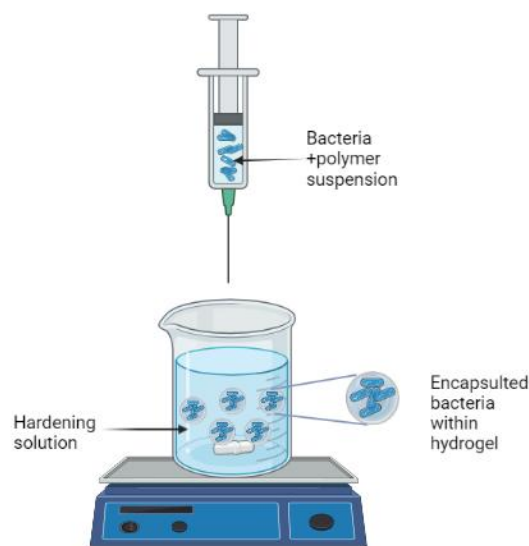
Diverses substances, telles que les polymères, l'alginate ou les lipides, peuvent être utilisées dans les procédés d'encapsulation pour créer une barrière protectrice pour les probiotiques. Cette barrière protège les probiotiques des conditions défavorables dans l'estomac, leur permettant de traverser le tractus digestif et d'atteindre les intestins, où ils peuvent exercer leurs effets bénéfiques (**Rodrigues et al., 2020**).

Pour maximiser la viabilité et la fonctionnalité des probiotiques, les chercheurs ont exploré plusieurs techniques d'encapsulation au fil des années. Ces techniques comprennent la microencapsulation, l'encapsulation par émulsion, la coacervation, le séchage par atomisation et le séchage par congélation (**Vivek et al., 2023**). Des résultats prometteurs en termes de survie accrue, de stabilité améliorée, de libération contrôlée et d'administration ciblée dans l'intestin ont été démontrés avec les probiotiques encapsulés. Ils ont été intégrés dans divers produits, notamment les médicaments, les aliments fonctionnels et les compléments alimentaires (**Reque et Brandelli, 2021**).

### **II.1.1. Extrusion**

Gélification ionotropique est la méthode la plus couramment utilisée en raison de sa facilité d'emploi, de son coût modéré et de ses conditions de formulation qui permettent une bonne viabilité des cellules (**Krasaekoopt et al., 2003**). Une solution d'hydrocolloïdes est préparée, les microorganismes sont ajoutés, et la suspension cellulaire est extrudée à travers une aiguille de seringue sous forme de gouttelettes qui tombent librement dans une solution de durcissement constituée de cations polyvalents, généralement de calcium sous forme de chlorure de calcium. On observe la formation de liaisons transversales entre les molécules d'alginate et de calcium, ce qui entraîne la création de microgels sphériques et non solubles (**Figure 3**) (**Kailasapathy, 2002**). La taille et la forme des perles sont déterminées par la concentration et le type d'alginate (viscosité de la solution), le diamètre de l'aiguille et la longueur de la chute libre (**King, 1995**).

L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait que les microcapsules peuvent être facilement détruites si elles sont exposées à un milieu en phosphates et citrates. De plus, les microbilles produites sont légèrement plus grandes que celles obtenues avec les autres méthodes, ce qui pourrait avoir un impact sur la texture des produits dans lesquels elles seront incorporées (Champagne et Fustier, 2007).



**Figure 3.**Présentation schématique de la procédure d'extrusion (Créé avec BioRender.com).

### II.1.2. Émulsification

L'émulsification est une technique chimique qui utilise des hydrocolloïdes (alginate, carraghénane et pectine) comme matériaux d'encapsulation pour encapsuler des cellules vivantes de probiotiques. Le principe de cette technique repose sur la relation entre les phases discontinue et continue. Un émulsifiant et un tensioactif sont nécessaires pour l'encapsulation dans une émulsion. Les émulsifiants sont utilisés pour rendre l'émulsion plus efficace en réduisant la tension superficielle, ce qui permet d'obtenir des particules plus petites. L'émulsion est ensuite traitée avec un agent de solidification (chlorure de calcium) (Chen et Chen, 2007; Kailasapathy, 2009; De Vos et al., 2010; Martín et al., 2015). La technique de l'émulsion

présente un taux élevé de survie bactérienne et est simple à mettre à l'échelle (**Chen et Chen, 2007**).

### **II.1.3. Coacervation**

La coacervation est une technologie d'émulsification modifiée. Le concept est simple : un complexe se forme lorsqu'une solution de composants bioactifs est combinée avec une molécule matrice de charge opposée. La taille et les caractéristiques de la capsule peuvent être modifiées en variant le pH, la force ionique, le rapport entre la molécule matrice et le composant bioactif, ainsi que le type de matrice. La technique est principalement guidée par des interactions électrostatiques, mais elle implique également des interactions hydrophobes. De plus, étant une technologie d'immobilisation plutôt que d'encapsulation, elle est surtout proposée et utilisée pour les molécules bioactives alimentaires plutôt que pour les cellules vivantes bioactives. La méthode est utilisée pour les arômes, les huiles et certaines molécules bioactives solubles dans l'eau (**De Vos et al., 2010**).

### **II.1.4. Sécheresse par pulvérisation**

La sécheresse par pulvérisation est l'une des techniques d'encapsulation industrielles les plus couramment utilisées, tant pour les probiotiques vivants que pour les molécules bioactives alimentaires. Lorsqu'elle est correctement réalisée, c'est une procédure rapide, relativement peu coûteuse et très reproductible. Le cœur est dissous dans une dispersion de matériau matrice selon le principe de la pulvérisation. Ensuite, la dispersion est atomisée dans de l'air chauffé, ce qui favorise l'élimination rapide du solvant (eau). Les particules en poudre sont ensuite séparées de l'air de séchage à une température plus basse à la sortie. L'utilisation répandue de la sécheresse par pulvérisation dans les environnements industriels est principalement due à sa relative simplicité et à son faible coût. Cependant, cette technologie présente des inconvénients notables. Le premier est sa gamme d'utilisation limitée. Étant une méthode d'immobilisation

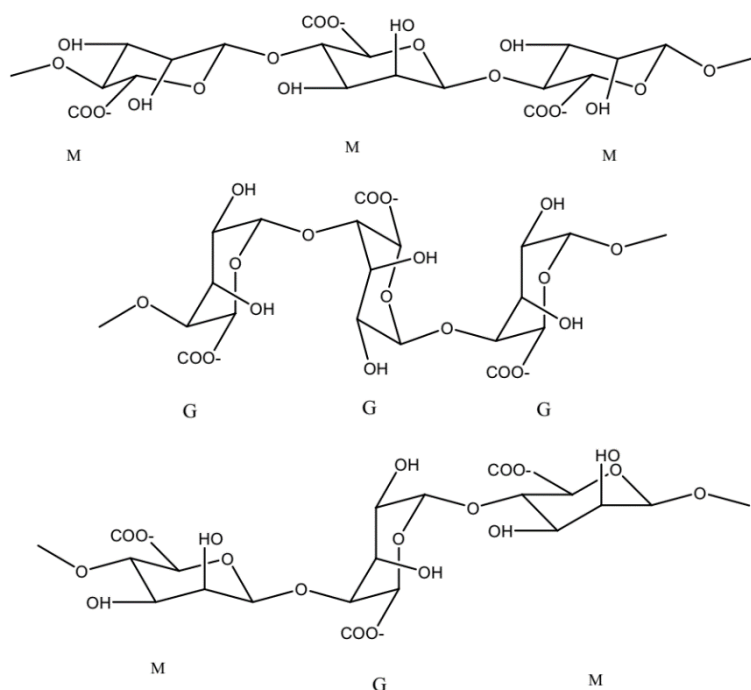
plutôt que d'encapsulation, certains composants biologiques peuvent être exposés, ce qui est particulièrement problématique pour les probiotiques, car les bactéries peuvent s'échapper du produit lors de certaines hydratations. Un autre inconvénient est la température élevée requise pour l'immobilisation, incompatible avec la survie de toutes les espèces probiotiques. Par exemple, il a été constaté que les bifidobactéries étaient extrêmement sensibles aux températures d'entrée élevées (**O'Riordan et al., 2001**).

## **II.2. Polymères pour la microencapsulation des probiotiques**

Les matériaux utilisés pour l'encapsulation comprennent les glucides, la cellulose et ses dérivés, les lipides, les protéines et les gommes (**Bertolini et al., 2001; Baranauskienė et al., 2007**). La sélection du polymère est une étape préliminaire cruciale nécessitant une approche méthodique rigoureuse. Le choix du biomatériau est déterminant pour l'efficacité du système de protection, car le polymère doit être stable et protecteur dans un milieu acide tout en étant instable dans un environnement avec un pH supérieur à 6, qui est le pH minimum observé dans la lumière intestinale, généralement au début du duodénum. Il est également essentiel que le matériau utilisé pour la microencapsulation soit biodégradable, biocompatible, facilement accessible, et résistant pendant la préparation, le stockage et le transport du produit. Les propriétés physico-chimiques des polymères, telles que leur composition chimique, morphologie, résistance mécanique et les tests de toxicité, doivent également être prises en compte, car elles influencent la capacité de formation de gels (**Gbassi et Vandamme, 2012**). Pour être utilisé dans l'industrie alimentaire, un polymère doit être préalablement reconnu comme « GRAS » (Generally Recognized As Safe), garantissant qu'il est sûr et non toxique pour l'homme, et qu'il ne compromet pas l'apparence, le goût, la texture ou la durée de conservation du produit. Plusieurs études ont exploré les polymères pour la microencapsulation des probiotiques, et voici ceux qui sont fréquemment utilisés :

### **II.2.1. Alginate**

L'alginate est un polysaccharide naturel extrait principalement des algues brunes. Il est constitué de deux types d'unités monomériques d'acide D-mannuronique et d'acide L-glucuronique (**Figure 4**), qui sont agencés en régions composées uniquement d'une unité ou de l'autre, appelées blocs M et blocs G, et en régions où les deux unités alternent. La quantité et la distribution séquentielle de la chaîne polymère varient en fonction de la source de l'alginate, ce qui influence les propriétés fonctionnelles de l'alginate en tant que matériau de support (**Homayouni et al., 2007**). Les hydrogels d'alginate de calcium sont largement utilisés dans l'encapsulation des cellules en raison de leur simplicité, de leur non-toxicité, de leur biocompatibilité et de leur faible coût. Un autre avantage est la solubilisation des gels d'alginate dans les intestins humains par piégeage des ions calcium et libération des cellules encapsulées. Les rapports entre l'alginate de sodium et le chlorure de calcium utilisés pour fabriquer les billes varient de 1 à 3 % d'alginate avec des concentrations de  $\text{CaCl}_2$  allant de 0,05 à 1,5 M. (**Rowley et al., 1999 ; Chen et Chen, 2007**). L'avantage de l'alginate réside dans sa capacité à former facilement des matrices gélifiées autour des cellules bactériennes, sa sécurité pour l'organisme, son faible coût, et les conditions de traitement douces (telles que la température) nécessaires à son efficacité. De plus, il peut être facilement préparé, se dissout correctement dans l'intestin et libère les cellules emprisonnées (**Chavarri et al., 2012**). Un autre avantage de l'encapsulation en alginate de calcium est sa réversibilité, qui permet de solubiliser le gel d'alginate en séquestrant les ions calcium et de libérer potentiellement les cellules encapsulées dans le côlon humain ou animal (**Li et al., 2011**). Un inconvénient des microparticules d'alginate est que les microbilles produites sont très poreuses, ce qui complique la protection des cellules contre leur environnement (**Chavarri et al., 2012**).



**Figure 4.** La structure des unités chimiques de l'alginate (M = acide mannuronique et G = acide glucuronique) (Homayouni et al., 2007).

### II.2.2. $\kappa$ -Carrageenan

Le  $\kappa$ -carraghénane est un polymère naturel largement utilisé dans l'industrie alimentaire. Les cellules doivent être ajoutées à la solution de polymère à une température comprise entre 40 et 50 °C, selon la technologie utilisée pour le composé. La gélification se produit lorsque le mélange est refroidi à température ambiante, et les microparticules sont ensuite stabilisées par l'ajout d'ions potassium.

### II.2.3. Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire basé sur la glucosamine, qui peut être extrait des champignons, des cuticules d'insectes et des membranes de crustacés. Il peut se polymériser en formant des ponts croisés lorsque des anions et des poly-anions sont présents. Cet ingrédient n'a pas démontré une forte capacité à augmenter la viabilité cellulaire par encapsulation, et il est préférable de l'utiliser comme revêtement plutôt que comme capsule. Les bactéries probiotiques peuvent être livrées au côlon dans un état viable en étant enfermées dans un

revêtement d'alginate et de chitosane, ce qui offre une protection dans des conditions simulées du tractus gastro-intestinal (**Chávarri et al., 2010; Iravani et al., 2015**).

#### **II.2.4. Gélatine**

La gélatine est une protéine formée par l'hydrolyse partielle du collagène. Elle possède une structure unique et des propriétés fonctionnelles polyvalentes, formant une solution visqueuse dans l'eau qui se solidifie en gel en refroidissant. En raison de sa nature amphotère, elle peut avoir des effets synergiques avec des polysaccharides anioniques tels que la gomme gellan. À un pH supérieur à 6, les deux polymères mentionnés sont miscibles car ils possèdent tous deux des charges nettes négatives et se repoussent. Lorsque le pH est réduit en dessous du point isoélectrique de la gélatine, la charge nette de la gélatine devient positive, ce qui entraîne une interaction avec la gomme gellan chargée négativement. Le mélange de gélatine et de diisocyanate de toluène produit des capsules robustes résistantes aux fissures et aux ruptures, surtout à des concentrations plus élevées, en raison de la formation de ponts croisés entre ces polymères (**Martín et al., 2015**).

#### **II.2.5. Amidon**

L'amidon est un polysaccharide constitué d'unités de D-glucose liées par des liaisons glycosidiques, produit par les plantes vertes. Il se compose de deux molécules identiques constitutionnellement mais distinctes structurellement : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose fait référence aux chaînes linéaires et hélicoïdales du polymère de glucose, tandis que l'amylopectine fait référence aux chaînes fortement ramifiées. La teneur de chaque fraction varie selon l'origine de l'amidon, mais en général, il contient 20-30 % d'amylose et 70-80 % d'amylopectine (**Chavarri et al., 2012**). Le granule d'amidon est une surface idéale pour l'adhésion des cellules probiotiques, et l'amidon résistant, qui ne peut pas être digéré par les enzymes pancréatiques dans l'intestin grêle, peut atteindre le côlon et être fermenté. En

conséquence, l'amidon résistant possède une bonne caractéristique de libération entérique, entraînant une meilleure libération des cellules bactériennes dans le gros intestin. De plus, l'amidon résistant peut être utilisé par les bactéries probiotiques dans le gros intestin en raison de sa fonctionnalité prébiotique. Il a été montré qu'il offre une protection contre le cancer colorectal (Cassidy et al., 1994; Chavarri et al., 2012).

#### **II.2.6. Xanthane**

La xanthane est un hétéropolysaccharide dont la structure primaire est constituée d'unités de pentasaccharides répétées, composées de deux unités de glucose, deux unités de mannose et une unité d'acide glucuronique. Le polysaccharide est fabriqué par fermentation de la bactérie *Xanthomonas campestris*, puis filtré ou centrifugé. Ce polymère est soluble dans l'eau froide et hydrate rapidement. Bien que la xanthane soit principalement non gélifiante, un mélange de xanthane et de gomme gellan a été utilisé pour encapsuler des cellules probiotiques (Sultana et al., 2000; Chen et Chen, 2007).

# **Matériel & méthodes**

## **Matériel et méthodes**

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) à l'Université A. Mira-Bejaia et du Laboratoire de Biochimie Appliquée à l'université de Sétif. la cytotoxicité des souches a été réalisés au niveau du Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine. Pour rappel, notre recherche vise à :

- Étudier l'activité antibactérienne des isolats obtenus à partir des fientes de poulet de chair;
- l'identification moléculaire ;
- Etudier l'innocuité des souches sélectionnées ;
- Encapsuler les souches dans des billes d'alginate.

## **I. Les bactéries lactiques**

### **I.1. Revivification**

Cinq souches de bactéries lactiques isolées par ma codirectrice de thèse Pr. FARADJI HAMMA Samia à partir de fientes de poulets de chair de manière aléatoire dans 2 communes de la wilaya de Bejaïa. Les isolats bactériens ont été caractérisés par une coloration de Gram et un test de production de catalase. Les colonies ont été cultivées individuellement dans du bouillon MRS (Conda, Madrid, Espagne). Avant chaque étude, les cultures de BL ont été cultivées dans du bouillon MRS pendant 24 heures.

### **I.2. Standardisation des inocula**

Afin de tester quelques aptitudes probiotiques des souches de lactobacilles, il est indispensable de connaître la charge de départ pour cela une standardisation des souches est effectué comme suite : L'inoculum des souches de lactobacilles sont revivifiés par ensemencement en stries sur gélose MRS. Après incubation à 37°C pendant 24h, deux à trois colonies bien isolées de chaque souche sont repiquées à chaque fois dans 10 ml du bouillon MRS, puis incubées à 37°C pendant 18 h. Au terme de l'incubation, des dilutions décimales

sont réalisées dans l'eau physiologique stérile ( $10^{-1}$  jusqu'à  $10^{-9}$ ), 1 ml des dilutions ( $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-9}$ ) sont ensemencé en masse dans une gélose MRS. Un dénombrement est effectué après incubation à 37°C pendant 48 h.

### **I.3. Activité antibactérienne des isolats**

L'objectif de cette étape est d'identifier les souches isolées des fientes de poulets de chair les plus efficaces pour inhiber la croissance des pathogènes, ce qui pourrait ouvrir la voie à leur utilisation dans l'alimentation animale. La recherche de substances antimicrobiennes produites par ces souches est réalisée à travers deux méthodes.

#### **I.3.1. Méthode directe (technique des cylindres d'agar)**

Les activités antimicrobiennes extracellulaires des souches ont été évaluées par la méthode des cylindres sur gélose (Eccleston et *al.*, 2008), en utilisant des souches de référence Gram positives (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 et *Bacillus spizizenii* ATCC 6633) ainsi que des souches Gram négatives (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028). Cette méthode consiste à ensemencer les souches en stries serrées sur la gélose MRS de façon à obtenir un tapis. Après 48 heures d'incubation à 37°C, des cylindres d'agar d'environ de 6 mm de diamètre sont prélevés et déposés sur des boîtes de pétri contenant des milieux gélosés (Muller-Hinton) préalablement ensemencés par un écouvillon stérile, selon la technique recommandée par la CLSI (2010), par les suspensions des microorganismes test, ensuite, les boîtes de Pétri sont laissées pendant deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, puis incubées à 37°C pour les bactéries.

### **I.3.2. Méthode indirecte (Test de diffusion en puits)**

Cette méthode, décrite par **Barefoot et Klaenhammer (1983)**, permet d'évaluer l'effet du surnageant de culture de la souche lactique sur les souches pathogènes. Les isolats sélectionnés pour leur production d'agents antimicrobiens ont été utilisés dans ce test. Les isolats ont été cultivés dans du bouillon MRS pendant 18 heures. Après incubation, le milieu a été centrifugé ( $8000 \times g$  / 10 min, 4°C) et les surnageants ont été collectés. Des puits ont été réalisés dans des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé avec les souches de référence utilisées dans le test précédent. Ces puits ont été remplis avec 100 µl de surnageant de la souche lactique à tester, puis les boîtes ont été incubées pendant 24 à 48 heures, après une diffusion initiale de 4 heures à 4°C. Les isolats entourés d'une zone claire ayant un diamètre supérieur à 2 mm dans le milieu de culture des souches pathogènes ont été considérés comme positifs.

En microbiologie, ces techniques sont couramment reconnues et employées afin d'évaluer la capacité antibactérienne des isolats. L'écart entre ces deux techniques est le fait que dans la méthode de cylindre d'agar, la bactérie est utilisée directement pour interagir avec les pathogènes cibles, tandis que, dans la méthode des puits, on ne cherche que les métabolites générés par les bactéries, comme les acides organiques et les peptides antimicrobiens. Ces deux techniques se complètent mutuellement et nous offrent une analyse exhaustive de l'activité antimicrobienne des isolats, un aspect crucial pour choisir les souches les plus efficaces et potentiellement utiles dans différentes applications alimentaires.

### **I.4. Identification moléculaire des isolats**

Pour identifier les cinq isolats sélectionnés de BL, une analyse de séquence partielle du gène 16S rRNA a été réalisée. Ce processus comprenait l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification par PCR avec des amorces soigneusement choisies, le séquençage de l'ADN

amplifié, et l'analyse subséquente des séquences obtenues. Plus précisément, les amorces 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') et 1492R (5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3') ont été utilisées pour le séquençage partiel du ARNr 16S (**Bauer et al., 1966**). L'analyse des séquences obtenues a impliqué leur comparaison avec la base de données NCBI des séquences 16S rDNA, en utilisant les séquences de référence comme modèles via l'outil MegaBLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ensuite, une analyse phylogénétique a été réalisée à l'aide du programme MEGA7 (**Kumar et al., 2016**). Cette analyse incluait les 14 hits les plus proches (taxons non redondants), comprenant des séquences complètes de ARNr 16S des cinq souches, ainsi qu'un groupe externe représenté par *Levilactobacillus cerevisiae* TUM BP 140423000-2250. L'alignement des séquences a été effectué à l'aide de l'algorithme Muscle (**Edgar, 2004**), suivi de la suppression des séquences non pertinentes de l'alignement multiséquence pour préparer l'analyse phylogénétique. La méthode du Maximum de vraisemblance a été appliquée en utilisant le modèle Kimura 2-paramètres (**Kimura, 1980**) pour inférer les relations évolutives. L'arbre avec la valeur de vraisemblance maximale (-2956.2509) a été sélectionné, avec un bootstrap effectué 100 fois pour évaluer les valeurs de support des branches. Les algorithmes Neighbor-Join et BioNJ, basés sur les distances pairwise calculées à l'aide de la technique du Maximum Composite Likelihood (MCL), ont été utilisés pour créer l'arbre initial pour la recherche heuristique. De plus, un modèle de distribution Gamma discret (avec cinq catégories, plus ou moins  $G = 0.8007$ ) a été employé pour tenir compte des variations des taux évolutifs entre différents sites. Ce modèle a permis à certains sites (36.3966%) de rester statiquement évolutifs. Au total, vingt séquences nucléotidiques ont été analysées, et les positions manquantes ou vides ont été correctement complétées. L'analyse évolutive a été réalisée avec MEGA7 (**Edgar, 2004**), et la structure finale de l'arbre a été générée à l'aide de iTOL (**Letunic et Bork, 2019**).

## I.5. Etude de l'innocuité des souches

Pour évaluer l'innocuité des souches, nous avons examiné leur impact cytotoxique sur une Lignée cellulaire du carcinome mammaire EMT6 (ATCC® CRL-2755™) et lignée cellulaire bêta-pancréatique NIT-1, ainsi que leur potentiel hémolytique et leur résistance aux antibiotiques.

### I.5.1. Test de cytotoxicité

Deux lignées cellulaires ATCC, la lignée cellulaire du carcinome mammaire EMT6 (ATCC® CRL-2755™) et la lignée cellulaire bêta-pancréatique NIT-1 (ATCC® CRL-2055™), ont été obtenues auprès de BDcome (Kouba, Algérie). Les cellules EMT6 ont été cultivées dans un milieu modifié d'aigle de Dulbecco (DMEM)/F12, tandis que les cellules NIT-1 ont été cultivées dans un milieu de l'Institut de Mémoires de Paracelsus de Roswell (RPMI) 1640. Les deux lignées cellulaires étaient maintenues dans des milieux de culture contenant 15 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % de solution de pénicilline/streptomycine (5000 U). L'incubation a été effectuée à 37°C dans une atmosphère composée de 95 % d'air et de 5 % de CO<sub>2</sub> (Jost *et al.*, 1992; Derguine *et al.*, 2023). Tous les réactifs utilisés dans cette étude proviennent de Sigma-Aldrich (Burlington, Massachusetts, États-Unis). Le kit XTT (methoxynitrosulfonylphenyl-tetrazolium carboxanilide) de Sigma-Aldrich, Burlington, Massachusetts, USA, a été utilisé pour évaluer la cytotoxicité des surnageants contre les lignées cellulaires EMT6 et NIT-1 (Derguine *et al.*, 2023). Les surnageants des deux souches sélectionnées de LB (AML3F et AML2) ont été obtenus après une période d'incubation de 24 heures dans du bouillon MRS. Les deux souches ont été choisies en raison de leur activité antibactérienne élevée. Les surnageants obtenus ont été lyophilisés (lyophilisateur CHRIST ALPHA 1-2 LD, Allemagne) puis resolubilisés dans du tampon phosphate-saline (PBS, 0,1 M, pH 7,4). Différentes concentrations de surnageant (0, 1.6, 5.4, 16, 27 µg/mL pour les cellules

EMT6 et 3, 10, 30, 60 µg/mL pour les cellules NIT-1) ont été testées. En résumé, les lignées cellulaires EMT6 et NIT-1 ont été cultivées respectivement dans des milieux de culture DMEM et RPMI-1640, supplémentés de 5 % de SVF et de 1 % de pénicilline/streptomycine pour EMT6, et de 10 % de SVF et de 1 % de pénicilline/streptomycine pour NIT-1. Ces lignées cellulaires ont étéensemencées dans une plaque de culture cellulaire à 96 puits à une concentration de  $10^4$  cellules par puits, avec 190 µL de milieu, et incubées pendant 24 heures à 37°C dans un environnement à 5 % de CO<sub>2</sub>, permettant ainsi aux cellules de s'attacher, de se diviser et de se développer dans les puits. Après l'incubation initiale de 24 heures, les cellules ont été délicatement lavées deux fois avec du PBS. Après élimination du PBS, les cellules ont été traitées avec différentes concentrations (comme mentionné précédemment) de solutions de AML3F et AML2 mélangées avec du milieu de culture frais, puis la plaque a été réincubée pendant 72 heures supplémentaires dans les mêmes conditions. Après l'incubation, le milieu de culture a été retiré, les puits ont été lavés avec du PBS, et 200 µL de milieu de culture frais ont été ajoutés. Un mélange des réactifs XTT1 et XTT2 du kit XTT a été préparé, et 50 µL de cette solution ont été ajoutés à chaque puits. Après 4 heures d'incubation à 37°C dans un environnement à 5 % de CO<sub>2</sub>, un lecteur de microplaques automatisé a été utilisé pour mesurer l'absorbance à 450–500 nm. Les cellules traitées avec la doxorubicine ont été considérées comme témoins positifs (100 % de mortalité) (**Rezgui et al., 2013**), et les cellules non traitées ont été utilisées pour établir une viabilité de 100 % (contrôle négatif). Les tests ont été réalisés en triplicata, et les moyennes  $\pm$  déviations standard (SD) ont été calculées. Le pourcentage d'inhibition de la croissance a été calculé et les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type.

### **I.5.2. Activité hémolytique**

Pour évaluer l'activité hémolytique des probiotiques, les bactéries ont été cultivées sur la gélose au sang (TM MEDIA, Delhi, Inde) pendant 48 heures (**Vijayakumar et al., 2015**). Si les bactéries présentaient une activité hémolytique, elles formaient des colonies entourées d'une zone hémolytique distincte et claire ( $\beta$ -hémolyse, hémolyse complète) ou verdâtre ( $\alpha$ -hémolyse, hémolyse partielle).

### **I.5.3. Résistance aux antibiotiques**

La susceptibilité aux antibiotiques des souches sélectionnées en fonction de leurs propriétés antibactériennes, a été évaluée en utilisant la technique de diffusion sur agar, telle que décrite par **Bauer et al. (1966)**. Pour réaliser le test, des suspensions ( $10^8$  UFC/mL) ont été préparées à partir de cultures de 24h des isolats de BL sélectionnés dans une solution saline. Ces suspensions ont été appliquées sur de l'agar MRS en utilisant la méthode d'ensemencement par étalement. Par la suite, des disques d'antibiotiques : ampicilline (10  $\mu$ g), chloramphénicol (30  $\mu$ g), oxytétracycline, érythromycine (15  $\mu$ g), amoxicilline (20  $\mu$ g), tétracycline (30  $\mu$ g) et pénicilline G (10  $\mu$ g) ont été placés à la surface. Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37°C. En tant que témoins, des disques de papier imprégnés de solution saline ont été utilisés. Le diamètre des zones claires entourant les disques d'antibiotiques a été mesuré. Les résultats ont été présentés en termes de résistance (R) ou de sensibilité (S), conformément aux recommandations de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ([http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/)).

## I.6. Propriétés physiologiques

### I.6.1. Autoaggrégation

L'auto-agrégation des souches sélectionnées a été étudiée selon la méthode décrite par **Kos et al. (2003)**, avec quelques modifications. En résumé, les cellules bactériennes jeunes de 24 heures ont été obtenues par centrifugation de la culture en bouillon MRS à 3000 rpm pendant 15 minutes. Les culots obtenus ont été lavés avec du PBS (0,1 M, pH 7,4) puis re-suspendus dans le même tampon pour atteindre une concentration d'environ  $10^8$  UFC/mL. Les suspensions cellulaires (4 mL) ont été mélangées par vortex pendant 10 secondes. Ensuite, 0,1 mL de la suspension supérieure a été mélangé avec 0,9 mL de PBS, et l'absorbance ( $A_0$ ) a été mesurée à 600 nm. En utilisant la même méthode, l'absorbance ( $A_t$ ) a été déterminée après 3 heures d'incubation à température ambiante. Pour calculer le taux d'auto-agrégation, la formule suivante a été appliquée :

$$\% \text{ Auto-agrégation} = 1 - (A_t/A_0) \times 100$$

Où  $A_t$  représente l'absorbance au temps  $t = 3\text{h}$  et  $A_0$  l'absorbance à  $t = 0$ .

### I.6.2. Hydrophobicité de la paroi

L'hydrophobicité de la paroi bactérienne a été évaluée en utilisant la méthode MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbons), conformément au protocole établi par **Rosenberg et al. (1980)**. Pour ce faire, les cultures bactériennes, incubées pendant 24 heures dans du bouillon MRS, ont été centrifugées à 4500 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Les culots obtenus ont été lavés deux fois avec du PBS (10 mM, pH 7,2) puis re-suspendus dans le même tampon pour atteindre une concentration de  $10^8$  UFC/mL. Deux solvants ont été utilisés pour l'étude : l'hexane (solvant apolaire) et le chloroforme (solvant acide monopolaire). Ensuite, 1 mL d'hexane ou de chloroforme a été ajouté à 3 mL de la suspension bactérienne. Après un mélange

par vortex pendant 90 secondes, la solution a été laissée à reposer pendant 15 minutes pour permettre la séparation des phases aqueuse et organique. Un millilitre de la phase aqueuse a été aspiré avec précaution, et l'absorbance a été mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'hydrophobicité a été calculé avec la formule suivante :

$$\% \text{ Hydrophobicité} = (1 - A/A_0) \times 100,$$

où  $A_0$  représente l'absorbance de la suspension avant le mélange avec le solvant et  $A$  l'absorbance de la phase aqueuse après la séparation des deux phases.

### **I.6.3. Adhésion des souches sur des microplaques en polystyrène (MATH)**

La méthode d'adhésion semi-quantitative sur microplaques en polystyrène a été appliquée dans cette étude, suivant le protocole décrit par **Ait Ouali et al. (2014)** avec quelques modifications. En résumé, 100 µl de chaque culture bactérienne ( $10^8$  UFC/mL) en bouillon MRS ont été ajoutés dans les puits de microplaques stériles à 96 puits, préalablement remplis de 100 µl de bouillon MRS stérile. Les microplaques ont été incubées pendant 15 minutes avec agitation douce, puis pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, les cultures ont été éliminées et les puits ont été lavés deux fois avec du tampon PBS (10 mM, pH 7,2) pour enlever les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes ont été fixées avec 200 µl d'éthanol à 96 % et les microplaques ont été laissées à sécher. Ensuite, 200 µl de solution de cristal violet à 0,1 % ont été ajoutés à chaque puits et laissés pendant 30 minutes. Les cellules colorées ont été lavées deux fois avec 200 µl de PBS et le colorant a été extrait avec 200 µl d'éthanol à 96 %. La biomasse a été quantifiée en mesurant l'absorbance à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques EnSpire™ (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Les souches ont été classées en quatre catégories selon la classification de **Stepanović et al. (2000)**. En prenant l'absorbance du bouillon MRS stérile comme témoin (Ac), les interprétations suivantes ont été appliquées :

$A \leq A_c$ , non adhérente (non productrice de biofilm) ;  $2A_c \geq A > A_c$ , faiblement adhérente (productrice de faible biofilm) ;  $4A_c \geq A > 2A_c$ , modérément adhérente (productrice de biofilm modéré) ;  $A > 4A_c$ , fortement adhérente (productrice de biofilm élevé).

#### **I.6.4. Tolérance au phénol**

La capacité des souches lactiques à survivre en présence de phénol est un critère important pour leur sélection en tant que probiotiques, car ce composé toxique est couramment retrouvé dans l'intestin en tant que produit de dégradation des acides aminés aromatiques par la flore intestinale. Pour évaluer cette tolérance, un protocole basé sur celui décrit par **Padmavathi et al. (2018)** a été adopté en raison de sa simplicité, de sa reproductibilité et de sa pertinence pour simuler les conditions intestinales. Plus précisément, 100  $\mu$ L d'une culture bactérienne incubée pendant 24 heures ont été inoculés dans du bouillon MRS contenant 0,2 % et 0,5 % de phénol (v/v), concentrations généralement utilisées dans les études de tolérance et représentant les niveaux physiologiques potentiels retrouvés dans le tractus gastro-intestinal. Après une incubation de 24 heures à 37 °C, la croissance bactérienne a été estimée par mesure de la densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ), ce qui permet d'évaluer la viabilité et la résistance des souches en présence de ce composé toxique.

### **I.7. Propriétés fonctionnelles**

#### **I.7.1. Pouvoir antioxydant**

L'activité antioxydante des souches lactiques sélectionnées a été évaluée à l'aide des tests DPPH et ABTS.

- **Méthode au 2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)**

Le surnageant a été obtenu par centrifugation à 3000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, puis stérilisé par filtration à travers un filtre à seringue de 0,22 µm. Les culots bactériens résultants ont été collectés et lavés avec du PBS stérile à 0,1 M (pH 7,4) pour obtenir une suspension cellulaire bactérienne (SCB). Pour le test, 1 mL du surnageant ou de la SCB a été mélangé avec 2 mL d'une solution d'éthanolique de DPPH à 0,07 mM, puis incubé pendant 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Ensuite, l'absorbance des échantillons (notée  $A_{\text{échantillon}}$ ) a été mesurée à 517 nm. Comme témoins négatifs, de l'eau distillée et une solution de DPPH ont été utilisées ( $A_{\text{Contrôle}}$ ). Pour référence, une combinaison de suspension bactérienne et d'éthanol ( $A_{\text{Blanc}}$ ) a été incluse. La formule utilisée pour calculer le pourcentage d'élimination des radicaux était la suivante (**Kostelac et al., 2021**):

$$\text{Capacité de piégeage du DPPH (\%)} = [1 - (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{Blanc}} / A_{\text{Contrôle}})] \times 100$$

- **Méthode au 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6- sulfonique) (ABTS+)**

Les surnageants de culture ont été obtenus par centrifugation (8000 g/10 min, 4°C) de cultures de souches de *Lactiplantibacillus plantarum* incubées pendant 24 heures. L'activité antioxydante a été déterminée par la méthode ABTS+ (acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)) comme décrit par **Pieniz et al. (2014)**. L'ABTS+ a été produit en réagissant une solution mère d'ABTS (7 mM, Sigma-Aldrich) avec un volume équivalent de persulfate de potassium (concentration finale de 2,45 mM, Sigma-Aldrich) et en laissant le mélange interagir à température ambiante pendant 16 heures avant utilisation. La solution d'ABTS+ a été diluée avec de l'éthanol (96 %) (Sigma-Aldrich), pour obtenir une absorbance de  $0,700 \pm 0,020$  à 734 nm, et l'acide ascorbique à 2 mg/ml a été utilisé comme contrôle positif. Après l'ajout de 500 µl de chaque échantillon dans 3 ml de solution d'ABTS+,

l'absorbance (A) a été mesurée après 6 minutes. D'autre part, le même volume (500 µl) de bouillon MRS stérile ajouté à la solution d'ABTS a été utilisée comme contrôle négatif.

### I.7.2. Activités enzymatiques

- **Activité Protéolytique**

Une colonie de chaque souche bactérienne a été inoculée sur gélose MRS supplémentée avec 10 % (m/v) de lait écrémé stérile et incubée à 37°C pendant 48 heures. L'apparition d'une zone claire autour des colonies était considérée comme un résultat positif pour l'activité protéolytique (De Albuquerque et al., 2018).

- **Activité Amylolytique**

La capacité des isolats à hydrolyser l'amidon a été observée en utilisant de l'agar MRS modifiée supplémentée avec 1 % d'amidon soluble. Après une incubation de 48 heures, les boîtes de pétri ont été recouvertes d'une solution d'iodure de potassium. Les zones claires autour des colonies indiquent une activité amylolytique (Onilude et al., 2017).

- **Activité Lipolytique**

Pour tester l'activité lipolytique, de l'agar MRS avec 0,01 % de rhodamine et 1 % d'huile d'olive ont été utilisées. La méthode de révélation a consisté à observer la fluorescence du complexe entre la rhodamine B (Sigma, USA) et les acides gras libres libérés par l'huile d'olive (Lopes et al., 2002).

- **Activité Cellulolytique**

Les souches de *Lactiplantibacillus* ont étéensemencées sur l'agar MRS contenant le Carboxyméthyl cellulose (CMC). Après 48 heures d'incubation, les boîtes d'agar CMC ont été inondées avec 1 % de rouge Congo et laissées à reposer pendant 15 minutes à température ambiante. Les boîtes ont ensuite été complètement décolorés avec une solution de NaCl.

l'apparition de zones claires autour des colonies bactériennes en développement, indique l'hydrolyse de la cellulose (**Irfan et al., 2012**).

### **I.7.3. Production d'EPS**

La production d'exopolysaccharides (EPS) a été évaluée en cultivant les souches sur de l'agar MRS au Rouge Congo. Le rouge de congo permet la détection de la production d'exopolysaccharides par la variation de la couleur des colonies dans le milieu. Le milieu a été préparé en ajoutant 0,8 g de Rouge Congo (Merck) dans 1 L d'agar MRS complété avec 10 % de saccharose. Les isolats bactériens ont été ensemencés sur des boîtes de pétri contenant l'agar au Rouge Congo et incubés à 37 °C pendant 24 heures (**Hayet et al., 2021**).

## **II. Encapsulation**

### **II.1. Préparation de billes d'alginate contenant les bactéries lactiques**

Les billes d'alginate ont été préparées en utilisant la méthode d'extrusion (**Lotfipour et al., 2012**). Tout d'abord, une solution d'alginate de sodium a été stérilisée à 121°C pendant 15 minutes. Un inoculum bactérien ( $10^8$  UFC/mL) a ensuite été introduit dans la solution d'alginate de sodium pour créer une suspension uniforme, qui a été doucement agitée pour assurer une distribution homogène. La suspension a ensuite été introduite goutte à goutte, à l'aide d'une seringue, dans une solution de durcissement stérile contenant 1,5 % de  $\text{CaCl}_2$ . La distance entre le bout de la seringue et la solution de  $\text{CaCl}_2$  a été maintenue à 3 cm. Des sphères gélifiées instantanées se sont formées lorsque les gouttes sont entrées en contact avec la solution de durcissement. Les billes ont été laissées dans la solution pendant 30 minutes pour permettre leur durcissement. Après, les billes ont été séparées à l'aide d'un filtre Whatman No.1, lavées deux fois avec une solution saline stérile, puis soumises à une lyophilisation à l'aide d'un

lyophilisateur CHRIST ALPHA 1–2 LD plus (Osterode, Allemagne). Pour maintenir la stérilité, les billes séchées ont été stockées dans des flacons stériles jusqu'à utilisation.

## **II.2. Effet de l'encapsulation sur la viabilité**

Après dissolution des billes encapsulées (1 g) dans 9 mL de PBS (pH 7,4) à 37°C pendant 2 heures, le nombre de bactéries vivantes a été déterminée par une dilution en série de dix fois et étalement sur gélose MRS. L'efficacité de l'encapsulation (EE) a été calculée en comparant le nombre de cellules vivantes avant et après le processus d'encapsulation, et en exprimant les résultats en pourcentage d'unités formant des colonies (UFC). La formule pour calculer l'EE est la suivante :

$$EE = (Nt / Ni) \times 100$$

où :

- Nt représente le nombre de cellules dans les particules après la formation des billes d'alginate.
- Ni représente le nombre initial de cellules avant le processus d'encapsulation.

## **II.3. Caractérisation des billes lyophilisées par microscopie électronique à balayage**

Les billes séchées après lyophilisation ont été examinées par microscopie électronique à balayage (MEB). Les images MEB ont été obtenues avec un microscope de paillasse Zeiss EVO, utilisant des grossissements de 100x et 600x, et des tensions allant jusqu'à 10 kV.

#### II.4. Effet de l'encapsulation sur la survie bactérienne dans des conditions simulées du tractus gastro-intestinal

Dans l'expérience, une suspension de cellules bactériennes ( $10^8$  UFC/mL) a été préparée dans 2 mL de jus gastrique simulé stérilisé, constitué d'une solution saline à 0,9 % (p/v) avec un pH de 2, ajusté avec de l'HCl 0,01 M, et de 0,3 % (p/v) de pepsine (Sigma–Aldrich, Bornem, Belgique) (Both et al., 2018). Après un vortexage rapide de 10 secondes, la suspension a été incubée à 37°C pendant 2 heures. Simultanément, pour évaluer la performance des souches encapsulées dans le jus gastrique sur différentes durées, les billes contenant les bactéries, pesant chacune 0,1 g, ont été introduites dans le fluide simulant le milieu gastrique pendant 2 heures à 37°C. De manière similaire, la viabilité des souches libres et encapsulées dans le jus intestinal simulé a été évaluée en utilisant une procédure comparable. Pour cela, les cellules bactériennes ( $10^8$  UFC/mL) ou les billes (0,1 g) ont été suspendues dans une solution imitant le jus intestinal, composée de 0,5 % de NaCl et de 0,5 % de sels biliaires avec un pH de 8. Les mélanges ont ensuite été incubés pendant 2 heures à 37°C. Après incubation, les billes ont été dissoutes dans une solution de dépolymérisation. Cette solution a été préparée en combinant 28 mL d'une solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,2 M avec 72 mL d'une solution de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2 M, en ajustant le volume à 200 mL avec de l'eau distillée, et en maintenant un pH de 7. Le taux de survie (%) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Survie (\%)} = (\text{Nombre de cellules vivantes (UFC/mL)} / \text{Nombre initial de cellules inoculées (UFC/mL)}) \times 100$$

## II.5. Inhibition de *Fusarium graminearum* par les souches de *Lactiplantibacillus* libres et encapsulées

L'efficacité des probiotiques isolés dans l'inhibition de la croissance de la souche de *F. graminearum* a été évaluée à l'aide d'une méthode qualitative de **Deepthi et al. (2016)** avec quelques modifications. La moitié de l'agar PDA a étéensemencée avec des probiotiques libres ou encapsulées (billes d'alginate lyophilisées). Les boîtes ont été incubées à 28 °C dans l'obscurité pendant 7 jours après avoir inséré un morceau d'agar PDA avec *F. graminearum* au centre de la surface libre. À la fin de la période d'incubation, les diamètres de la croissance du champignon sont mesurés, et l'effet antifongique est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité antifongique (\%)} = ((D_c - D_s) / D_c) \times 100$$

Le diamètre de la croissance sur la boîte de contrôle est noté  $D_c$ , tandis que la croissance sur la boîte soumise au test est notée  $D_s$ .

### Analyse statistique

Chaque expérience a été réalisée en triplicata, ce qui a donné lieu à trois séries distinctes pour chaque expérience. Les données ont été soumises à une analyse de variance à un facteur (ANOVA), suivie du test post hoc de Tukey. La signification statistique a été fixée à  $p < 0,05$ . Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad 8.4.2.

## **Résultats & discussion**

## I. Bactéries lactiques

### I.1. Revivification

Cinq isolats de BL se caractérisaient par leurs attributs uniques, tels que la morphologie des colonies petites, bien délimitées et de couleur blanc crémeux, la coloration Gram positive, la nature catalase-négative, l'absence de mobilité, et une combinaison de caractéristiques en coques et en bâtonnets. Les fientes de volaille sont une excellente source de bactéries lactiques probiotiques potentielles. Les principaux genres bactériens isolés des déjections de volaille sont *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Campylobacter*, *Escherichia* et *Clostridium* (**Amit-Romach et al., 2004; Nazef et al., 2008; Asghar et al., 2016**).

### I.2. Activité antibactérienne des isolats

Dans le cadre de cette recherche, afin de choisir des souches destinées à l'utilisation comme additif dans l'alimentation des poulets, nous avons d'abord analysé l'activité antibactérienne des isolats. Selon la méthode de **Eccleston et al. (2008)** et la méthode des puits développée par **Barefoot et Klaenhammer (1983)**, celle-ci a été évaluée dans un milieu solide.

Dans la présente étude, toutes les souches ont été testées vis-à-vis de : *S. aureus* ATCC 6538, *B. spizizenii* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 ont présentées une activité avec des zones d'inhibition claire autour des cylindres. Les résultats du test direct suggèrent que l'ensemble des isolats produisent des substances qui inhibent la croissance de ces pathogènes, ou exerce une inhibition compétitive par rapport aux nutriments.

Similairement à notre étude, **Ahmed et al. (2019)** ont trouvé que 6 isolats lactiques parmi 21 démontrent une efficacité antibactérienne grâce au test des spots. Ces derniers présentent des diamètres d'inhibition contre *E. coli* et *Salmonella typhimurium*, avec des zones

d'inhibition allant de 10,5 à 14,3 mm pour *E. coli* et de 10,2 à 12,8 mm pour *Salmonella*, ce qui indique une efficacité antibactérienne significative.

Les résultats prometteurs, dans le test cylindres d'agar, justifie la poursuite de l'évaluation de l'activité antibactérienne des isolats à travers le test des puits.

Les 5 souches ont été testés vis à vis de 5 souches indicatrices (*S. aureus* ATCC 6538, *B. spizizenii* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) en utilisant l'essai de diffusion en puits sur agar. Les résultats ont indiqué que les 5 isolats de BL (nommément AML3F, AML1, AML2, AML3, et AML5), ont montré des effets inhibiteurs contre presque tous les pathogènes testés (**Tableau II**). Les cinq isolats se sont avérés efficaces pour inhiber la croissance d'*E. coli*, de *P. aeruginosa* et de *B. spizizenii*. AML3F a démontré le plus grand spectre d'activité antibactérienne, incluant les cinq pathogènes et la plus grande efficacité pour inhiber la croissance d'*E. coli* (14,6 mm) et de *S. aureus* (23 mm). Cependant , AML3F était le seul isolat qui a montré une activité antibactérienne à l'égard de *Salmonella typhimurium* (18 mm).

**Tableau II.** Activité antibactérienne des souches de bacilles vis-à-vis de cinq pathogènes.

| Souche       | Zone d'inhibition (mm) |                       |                       |                       |                       |
|--------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|              | <i>E. coli</i>         | <i>P. aeruginosa</i>  | <i>S. aureus</i>      | <i>B. spizizenii</i>  | <i>S. Typhimurium</i> |
| <b>AML3F</b> | 14,6±1,3 <sup>a</sup>  | 10,0±1,0 <sup>a</sup> | 23,0±1,0 <sup>a</sup> | 14,5±0,8 <sup>a</sup> | 18,0±0,0 <sup>a</sup> |
| <b>AML1</b>  | 12,1±1,4 <sup>b</sup>  | 11,0±0,0 <sup>b</sup> | 15,6±1,3 <sup>b</sup> | 15,0±0,0 <sup>a</sup> | 00,0±0,0 <sup>b</sup> |
| <b>AML2</b>  | 12,5±1,1 <sup>b</sup>  | 11,5±0,6 <sup>b</sup> | 13,5±1,4 <sup>c</sup> | 15,5±0,7 <sup>a</sup> | 00,0±0,0 <sup>b</sup> |
| <b>AML3</b>  | 11,0±1,0 <sup>b</sup>  | 10,0±0,0 <sup>a</sup> | 16,6±1,1 <sup>d</sup> | 15,0±1,0 <sup>a</sup> | 00,0±0,0 <sup>b</sup> |
| <b>AML5</b>  | 12,0±0,0 <sup>b</sup>  | 12,0±1,0 <sup>b</sup> | 00,0±0,0 <sup>e</sup> | 17,0±0,0 <sup>b</sup> | 00,0±0,0 <sup>b</sup> |

Les diamètres des zones d'inhibition sont la moyenne de trois mesures indépendantes.

a,b,c Les lettres différentes dans la même colonne indiquent des différences significatives (p<0,05).

Cela s'explique par la capacité des bactéries lactiques à synthétiser des substances antimicrobiennes actives, telles que des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du CO<sub>2</sub>, des bactériocines, de la reutéline et du diacétyle. Ces composés peuvent exercer leur action de manière individuelle ou synergique pour inhiber la croissance des microorganismes pathogènes ou responsables de la détérioration (**Agnelo et al., 2023**).

Chez les bactéries Gram-positives, les composés antimicrobiens traversent la membrane et se fixent sur la couche de peptidoglycane, où ils se lient aux protéines, ce qui peut entraîner la lyse cellulaire. En revanche, chez les bactéries Gram-négatives, ces composés pénètrent par les porines de la membrane externe, accèdent à la couche de peptidoglycane et se lient également aux protéines (**Carcione et al., 2023**).

La capacité des bactéries probiotiques à coloniser la muqueuse intestinale et à inhiber la croissance des pathogènes nuisibles est essentielle. Les souches de BL isolées ont inhibé la croissance d'*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. spizizenii* et *Salmonella Typhimurium*. Il est bien connu que les BL probiotiques peuvent produire diverses substances antimicrobiennes ou métabolites, y compris des acides organiques, des bactériocines, des composants semblables aux bactériocines et du peroxyde d'hydrogène, qui sont souvent responsables de leur activité antagoniste (**Campana et al., 2017**). Par conséquent, l'activité antibactérienne des isolats pourrait être attribuée à différents mécanismes, tels que la production de bactériocines ayant des effets bactéricides ou bactériostatiques et la réduction du pH résultant de la synthèse de l'acide lactique (**Parente et Ricciardi, 1999**).

Nos résultats sont similaires à ceux de **Bakari et al. (2011)** et supérieurs à ceux trouvés par **Dec et al. (2016)**, mais inférieurs à ceux reportés par **Tatsadjieu et al. (2009)**.

### I.3. Identification moléculaire des isolats

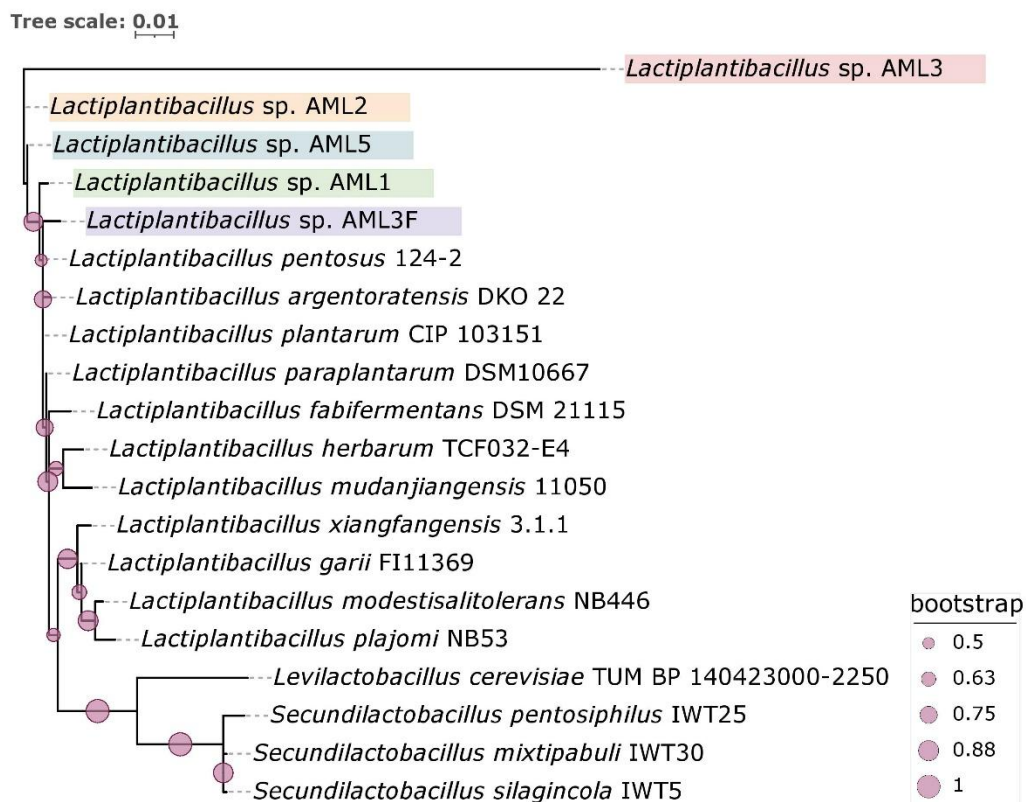
Sur la base de leurs séquences de gènes de l'ARN ribosomique 16S, les cinq souches sélectionnées ont été identifiées comme appartenant au genre *Lactiplantibacillus*. Cependant, il convient de noter que la souche AML3 divergeait significativement des autres souches, avec un pourcentage d'identité BLAST relativement bas de 92,05 % par rapport aux souches types du genre *Lactiplantibacillus* (**Tableau III**).

**Tableau III.** Résultats du BLAST des séquences ARNr 16S des cinq isolats de bacilles.

| Souche | Description                                                                             | couverture de requête | E* | Per. Ident | Acc. Len | Accession   |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----|------------|----------|-------------|
| AML3   |                                                                                         | 78%                   | 0  | 92.05%     |          |             |
| AML5   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CIP 103151 ARN ribosomique 16S, séquence partielle | 88%                   | 0  | 97.96%     | 1527     | NR_104573.1 |
| AML2   |                                                                                         | 89%                   | 0  | 98.10%     |          |             |
| AML1   |                                                                                         | 97%                   | 0  | 99.44%     |          |             |
| AML3F  |                                                                                         | 97%                   | 0  | 98.87%     |          |             |
|        | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149 ARN ribosomique 16S, séquence partielle   | 97%                   | 0  | 98.87%     | 1466     | NR_117813.1 |

En l'absence de désignation taxonomique polyphasique plus précise, les cinq souches ont été placées dans le genre *Lactiplantibacillus*. Après identification, les souches ont reçu les noms suivants (nom, numéro d'accès) : *Lactiplantibacillus* sp. AML1 (ON799438.1) ; *Lactiplantibacillus* sp. AML2 (ON799439.1) ; *Lactiplantibacillus* sp. AML3 (ON799440.1) ; *Lactiplantibacillus* sp. AML3F (ON799437.1) ; et *Lactiplantibacillus* sp. AML5 (**Figure 5**). Les cercles transparents de couleur maron reflètent les valeurs de bootstrap (>50 %) pour les arbres dans lesquels les taxa liés sont regroupés. Le nombre de substitutions par site a été utilisé pour créer une version mise à l'échelle de l'arbre. Les cinq souches utilisées dans cette enquête

sont mises en évidence en couleurs pastel douces. Un groupe externe composé de *Levilactobacillus cerevisiae* TUM BP 140423000–2250 a été utilisé.



**Figure 5.** Analyse phylogénétique moléculaire des cinq souches de bacilles par la méthode du Maximum de Vraisemblance basée sur les séquences du gène ARNr 16S.

Suite à l'analyse phylogénétique, les cinq souches ont été classées dans le genre *Lactiplantibacillus*. Ce genre est connu pour avoir des impacts significatifs sur la santé animale (Gilchrist et al., 2007) et est fréquemment trouvé dans les fèces de poulets de chair (Shazali et al., 2014). Cependant, pour la souche AML3, le faible pourcentage d'identité (92 %) suggère la possibilité qu'il s'agisse d'une espèce nouvelle. Une suggestion similaire pourrait s'appliquer aux souches AML5 et AML2, car leurs pourcentages d'identité (97,96 % et 98,10 %, respectivement) sont inférieurs au seuil actuellement accepté de ARNr 16S pour la délimitation des espèces (98,65 %) (Kim et al., 2014). Pour établir fermement ces souches comme des représentants potentiels de nouvelles espèces au sein du genre *Lactiplantibacillus*, des

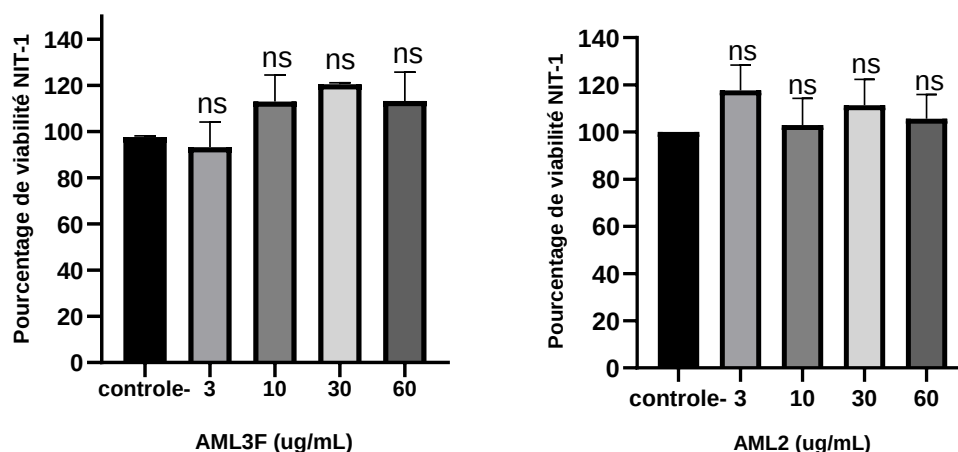
investigations polyphasiques et génomiques approfondies sont nécessaires. Ces investigations devraient inclure des calculs précis de distance génomique, tels que l'hybridation numérique ADN-ADN (dDDH) et l'identité nucléotidique moyenne (ANI)(Meier-Kolthoff et al., 2013).

#### **I.4. Etude de l'innocuité des souches**

Avant d'évaluer le potentiel probiotique des cinq souches de *Lactiplantibacillus* sélectionnées, leur innocuité a été déterminée. Cette évaluation a été démontrée par l'analyse de leur effet cytotoxique sur la lignée cellulaire du carcinome mammaire EMT6 (ATCC® CRL-2755™) et la lignée cellulaire bêta-pancréatique NIT-1, ainsi que par leur activité hémolytique et leur profil de résistance aux antibiotiques.

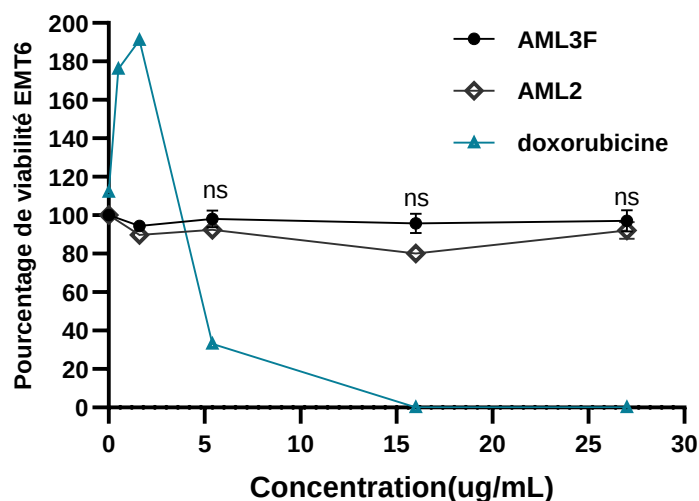
##### **I.4.1. Test de cytotoxicité**

Dans l'évaluation de la cytotoxicité des deux souches sélectionnées *Lactiplantibacillus* sp. AML3F et AML2, leurs surnageants ont été lyophilisés, solubilisé dans du PBS à différentes concentrations, puis testés sur les lignées cellulaires EMT6 et NIT-1. Les résultats obtenus ont indiqué que le surnageant de AML2 ne présentait pas de cytotoxicité significative (**Figure 6**) contre les cellules NIT-1 ( $p > 0,05$ ), même à des concentrations variant de 3 à 60 µg/mL, avec une valeur de IC<sub>50</sub> supérieure à 60 µg/mL. En revanche, des concentrations élevées (30–60 µg/mL) du surnageant de AML3F ont montré une légère augmentation ( $p > 0,05$ ) de la viabilité des cellules NIT-1.



**Figure 6.** Effet du surnageant cellulaire AML3F et AML2 à différentes concentrations sur la viabilité des cellules NIT-1 en utilisant le test XTT. Les résultats présentés sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM et proviennent de trois expériences indépendantes. "ns" indique des résultats non significatifs, selon l'ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey par rapport au contrôle négatif (PBS).

De plus, le surnageant de AML2 n'a entraîné qu'une réduction mineure ( $p > 0,05$ ) de la viabilité des cellules EMT6 dans les conditions testées. Le surnageant de AML3F n'a montré aucune cytotoxicité significative contre EMT6 ( $p > 0,05$ ), même lorsqu'il a été testé à des concentrations allant de 0 à 27  $\mu\text{g/mL}$  (avec une valeur de  $\text{IC}_{50}$  supérieure à 30  $\mu\text{g/mL}$ ). En revanche, la doxorubicine, utilisée comme contrôle positif, a montré un impact cytotoxique élevé contre les cellules EMT6 avec une  $\text{IC}_{50}$  de  $4,885 \pm 0,063 \mu\text{g/mL}$  (**Figure 7**).

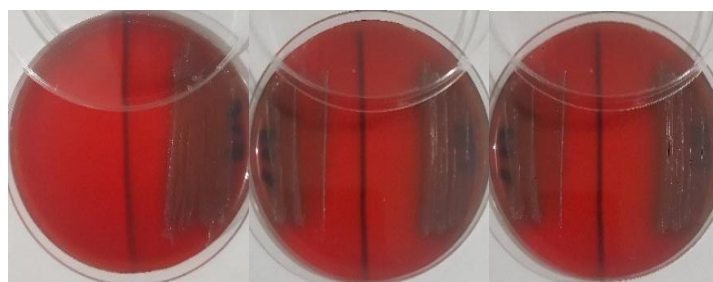


**Figure 7.** Effet du surnageant cellulaire AML3F et AML2 et de la doxorubicine à différentes concentrations sur la viabilité de la lignée cellulaire du cancer du sein EMT6. Les cellules EMT6 ont été prétraitées avec le surnageant à différentes concentrations (0-27 µg/mL). La doxorubicine a été utilisée comme contrôle positif. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (n=3) ; ns : non significatif par rapport au contrôle négatif (ANOVA à un facteur suivie du test post hoc de Tukey).

L'effet cytotoxique des surnageants des deux souches de BL (AML3F et AML2) a été évalué sur deux lignées cellulaires humaines (NIT-1 et EMT6). Le surnageant libre de cellules des souches n'a pas montré d'effet cytotoxique sur les lignées cellulaires bêta-pancréatiques (NIT-1). Ces résultats indiquent que ces souches sont sûres et pourraient être utilisées comme additifs alimentaires. Une étude d'**Arrioja-Bretón et al. (2020)** n'a révélé aucune toxicité pour les macrophages humains à partir du surnageant libre de cellules de *L. plantarum* NRRL B-4496. Une autre étude a trouvé qu'un exopolysaccharide de *L. plantarum* RJF4 n'était pas toxique pour la lignée cellulaire de myoblastes de rat L6 (**Dilna et al., 2015**), suggérant un potentiel d'utilisation de ces souches dans les additifs alimentaires ou thérapeutiques.

#### I.4.2. Activité hémolytique

En ce qui concerne leur activité hémolytique, toutes les souches de *Lactiplantibacillus* sp. se sont avérées dépourvues d'activité hémolytique (**Figure 8**), confirmant leur nature non cytotoxique pour les organismes vivants (**FAO/WHO, 2002**). Ces résultats sont cohérents avec les observations selon lesquelles les souches de *L. plantarum* n'exhibent généralement pas d'activité hémolytique (**Sharma et al., 2021**).



**Figure 8.** Activité non hémolytique des souches de *Lactiplantibacillus* sp.

### 1.4.3. Phénotype de résistance aux antibiotiques

Il est crucial que les cultures probiotiques ne portent pas de gènes transférables conférant une résistance aux antibiotiques. Les cinq souches de *Lactiplantibacillus sp.* ont montré un profil de résistance variable aux sept antibiotiques testés (**Tableau IV**). Toutes les souches étaient sensibles au chloramphénicol (CHL), à l'oxytétracycline (OXY), à l'érythromycine (ERY) et à la tétracycline (TET). Une résistance uniquement à l'amoxicilline (AMX) et à la pénicilline G (PEN) a été détectée chez tous les isolats, et seule AML1 était résistante à l'ampicilline (AMP). Une sensibilité modérée à l'AMP a été détectée chez AML3F.

**Tableau IV.** Résistance aux antibiotiques des cinq souches de *Lactiplantibacillus*.

| Souche       | Resistance aux antibiotiques |     |     |     |          |     |          |
|--------------|------------------------------|-----|-----|-----|----------|-----|----------|
|              | AMP                          | CHL | OXY | ERY | AMX      | TET | PEN      |
| <b>AML3F</b> | MS                           | S   | S   | S   | <b>R</b> | S   | <b>R</b> |
| <b>AML1</b>  | <b>R</b>                     | S   | S   | S   | <b>R</b> | S   | <b>R</b> |
| <b>AML2</b>  | S                            | S   | S   | S   | <b>R</b> | S   | <b>R</b> |
| <b>AML3</b>  | S                            | S   | S   | S   | <b>R</b> | S   | <b>R</b> |
| <b>AML5</b>  | S                            | S   | S   | S   | <b>R</b> | S   | <b>R</b> |

R : résistant ; MS : modérément sensible ; S : sensible ; AMP : ampicilline (10 µg) ; CHL : chloramphénicol (30 µg) ; OXY : oxytétracycline ; ERY : érythromycine (15 µg) ; AMX : amoxicilline (20 µg) ; TET : tétracycline (30 µg) ; PEN : pénicilline G (10 µg).

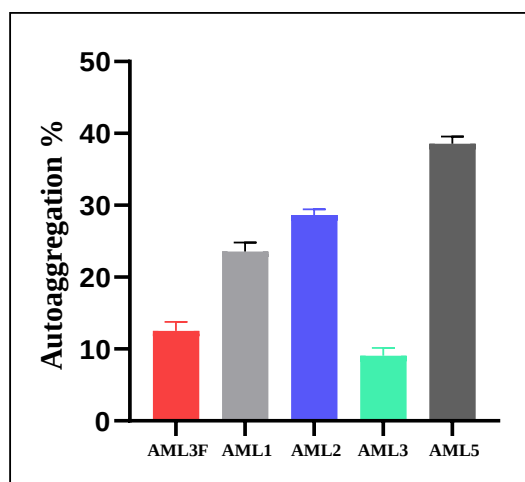
Les souches semblaient être sensibles à presque tous les antibiotiques testés, avec une résistance à la pénicilline et à l'amoxicilline, qui appartiennent toutes deux à la classe des antibiotiques bêta-lactamines. La pression croissante créée par l'utilisation généralisée des antibiotiques dans les soins vétérinaires contribue presque certainement à la propagation de la résistance parmi les bactéries intestinales (**Álvarez-cisneros et Ponce-alquicira, 2019**). Dans leur étude, **Shazali et al. (2014)** ont isolé des souches de *L. plantarum* et de *L. pentosus* à partir de fèces de poulets de chair malaisiennes qui étaient sensibles à l'érythromycine, à la tétracycline

et à l'ampicilline. Cependant, les variations mineures observées dans notre étude peuvent être attribuées aux différences entre les souches et les espèces, ainsi qu'aux antibiotiques utilisés dans les traitements vétérinaires. L'utilisation irresponsable des antibiotiques dans les aliments pour animaux, à des fins thérapeutiques et de promotion de la croissance, a contribué à l'émergence de BL résistants aux antibiotiques. Cette pratique pourrait potentiellement mener à la formation d'un réservoir de bactéries résistantes aux antibiotiques dans le système digestif. Les résultats récents soulignent la nécessité de tester des souches potentielles de BL pour leur résistance aux antibiotiques lorsqu'on les considère comme additifs dans l'alimentation animale (Nikodinoska et al., 2023).

## **I.5. Propriétés physiologiques**

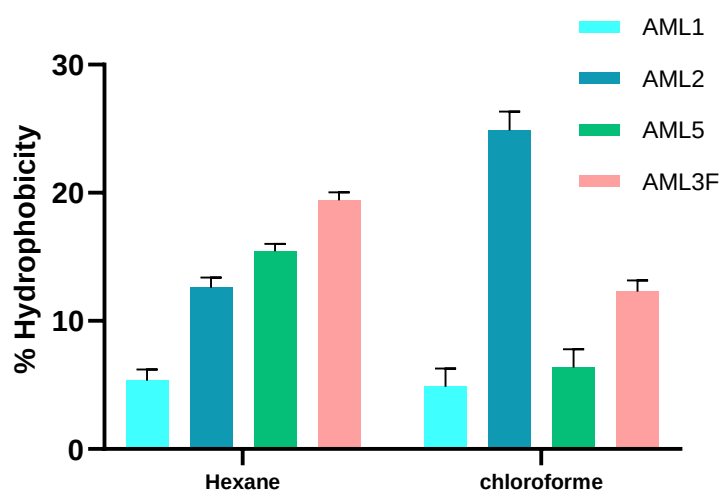
### **I.5.1. Autoaggrégation et hydrophobicité de la surface cellulaire**

Il est supposé que l'adhésion des probiotiques à l'épithélium intestinal est associée à leur capacité d'auto-agrégation. La **Figure 9** illustre les résultats de l'évaluation de la capacité d'auto-agrégation des souches de *Lactiplantibacillus sp.* L'auto-agrégation des souches varient de  $9,00 \pm 1,24$  % à  $38,58 \pm 0,96$  %. Il est à noter qu'il y avait une variation significative ( $p < 0,05$ ) des taux d'auto-agrégation parmi les cinq souches. *Lactiplantibacillus sp.* AML5 a montré le taux d'auto-agrégation le plus élevé (38 %) sur 3 heures, surpassant les autres souches.



**Figure 9.** Auto-aggregation des souches de *Lactiplantibacillus sp.* Les résultats ont été exprimés en tant que moyenne de trois répétitions  $\pm$  écart-type ( $p < 0,01$ ).

Dans cette étude, l'hydrophobicité de la surface cellulaire a été estimée en utilisant l'hexane (un solvant apolaire) et le chloroforme (un solvant acide monopolaire) sur des cellules vivantes intactes (**Figure 10**). Les niveaux d'hydrophobicité cellulaire enregistrés variaient de  $05,33 \pm 0,87$  à  $19,41 \pm 0,61\%$  pour l'hexane et  $04,87 \pm 1,41$  à  $24,86 \pm 1,48 \%$  pour le chloroforme.



**Figure 10.** Proportion d'adhésion bactérienne aux hydrocarbures pour différentes souches de *L. plantarum* utilisant du chloroforme et de l'hexane. Tous les résultats sont représentés comme la moyenne  $\pm$  écart-type.

En général, l'auto-agrégation et l'hydrophobicité de la surface cellulaire servent de critères pour évaluer les souches probiotiques afin de déterminer leur capacité d'adhésion et d'interaction avec les cellules épithéliales (Xu et al., 2009).

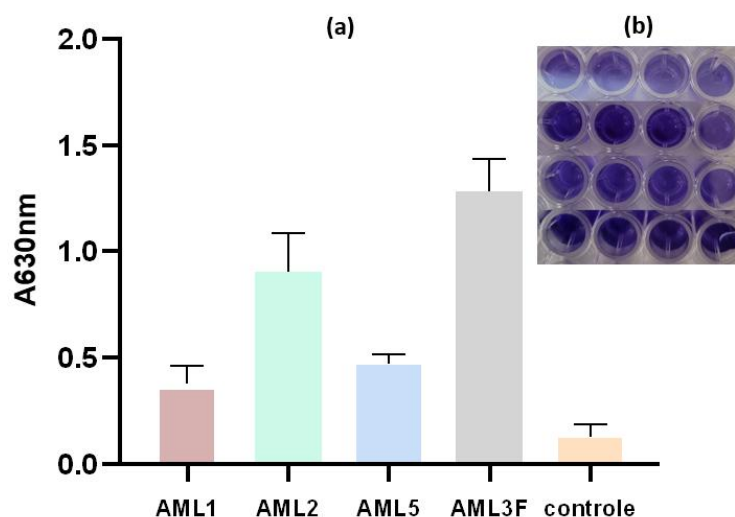
Toutes les souches ont montré une capacité à s'auto-agréger après 3 heures. En comparaison avec les résultats de Campana et al., (2017), qui ont évalué la capacité d'auto-agrégation de sept souches de BL probiotiques isolées de produits probiotiques commerciaux (maximum de 21,37 % après 6 heures), nos souches ont présenté de meilleures propriétés d'auto-agrégation (23–38 %).

L'hydrophobicité de la surface cellulaire d'une souche probiotique indique sa capacité à coloniser l'intestin, ou son adhérence et sa persistance une fois dans la cavité intestinale. Souza et al. (2018) ont montré qu'une hydrophobicité accrue conduisait à une meilleure colonisation. Tyfa et al. (2015) ont classé les souches bactériennes en très hydrophobes (>50%), modérément hydrophobes (20%-50%) et hydrophiles (<20%). Selon ce critère, toutes les quatre souches de *L. plantarum* sont hydrophiles. Nallala et Jeevaratnam (2015) ont également obtenu des résultats similaires ; leur étude a révélé que les souches de *L. plantarum* isolées de poulets étaient hydrophiles, avec des pourcentages d'hydrophobicité variant de 16 % à 33 %.

#### I.5.2. Adhésion des souches sur des microplaques en polystyrène (TCP)

Les résultats montrés dans la Figure 11 ont révélé la capacité des souches de *Lactiplantibacillus* testées à adhérer et à former des biofilms dans les conditions d'étude. Les absorbances enregistrées variaient de 0,37 à 1,28. Les souches AML2 et AML3F possédaient une forte capacité d'adhésion selon la classification de Stepanović et al. (2000), tandis que les autres souches, AML1 et AML5, étaient modérément adhérentes. La souche *Lb. plantarum* (P2F2) isolée des selles d'enfant a montré une forte production de biofilm sur polystyrène,

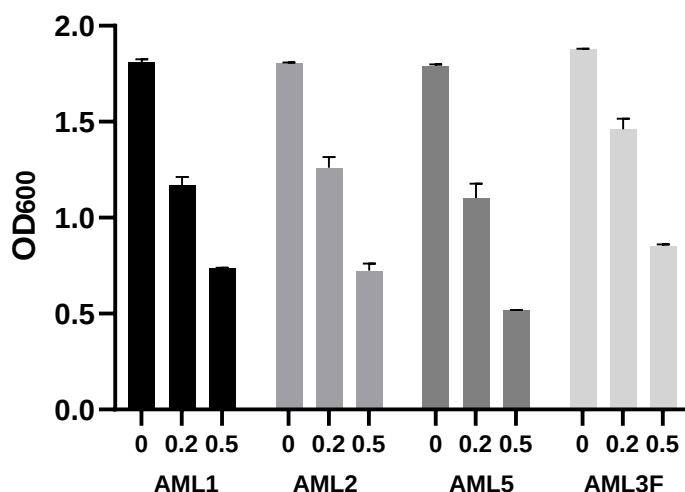
indiquant des capacités d'adhésion potentielles dans le tractus gastro-intestinal (Narayanan, 2024).



**Figure 11.** Formation de biofilm par 4 souches de *Lactopantibacillus plantarum* sur des microplaques en polystyrène à 96 puits à 37°C pendant 24 h. **(a)** : la Densité optique a 630nm. Les barres d'erreur représentent les écarts-types de la moyenne (n = 4). **(b)** : Les photographies des biofilms teintés au violet cristal.

### I.5.3. Tolérance au phénol

Les quatre souches bactériennes étudiées ont montré une croissance réduite à 0,2 % et 0,5 % de phénol. Lors de la comparaison de la tolérance au phénol avec d'autres souches, *L. plantarum* AML3F a démontré le pourcentage de croissance le plus élevé (**Figure 12**). Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par **Sunardi et al. (2023)**, qui ont également constaté que les souches de *L. plantarum* isolées de poulets montraient une sensibilité aux concentrations élevées de phénol, indiquant un manque de résistance au phénol dans l'étude. Les phénols sont des métabolites dangereux produits pendant le processus digestif par les acides aminés aromatiques et les protéines endogènes (**Padmavathi et al., 2018**). Une bactérie probiotique spécifique devrait être capable de gérer les faibles niveaux de phénols présents dans le tractus gastro-intestinal (**Pacheco-Ordaz et al., 2018**).

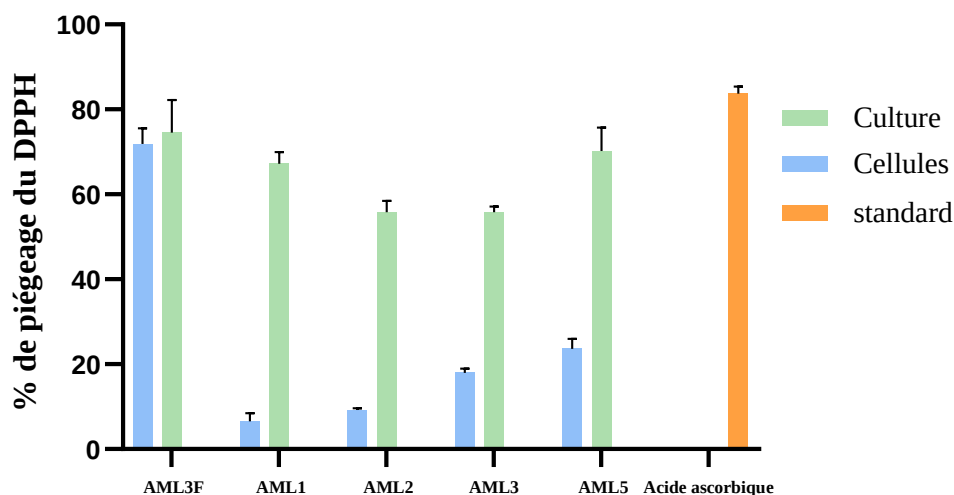


**Figure 12.** Tolérance aux concentrations de 0,2 % et 0,5 % de phénol par les souches de *Lactiplantibacillus plantarum*. Les données sont les moyennes de trois expériences répétées, et les barres d'erreur indiquent les écarts-types.

## I.6. Propriétés fonctionnelles

### I.6.1. Pouvoir antioxydant

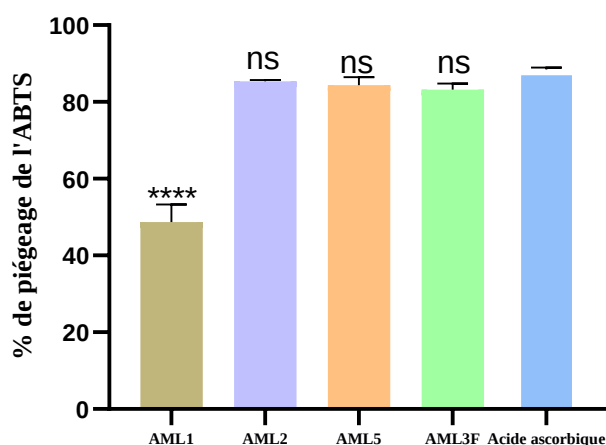
Pour évaluer le potentiel antioxydant des souches et leurs surnageants de culture, une méthode basée sur les radicaux DPPH a été employée, reconnue pour sa sensibilité, sa fiabilité et son utilisation courante (Mishra et al., 2015). Les activités des cellules entières de *Lactiplantibacillus sp.* AML3F, AML1, AML2, AML3 et AML5 étaient respectivement estimées à 71,90 %, 6,10 %, 9,10 %, 17,90 % et 23,61 % (**Figure 13**), en comparaison avec l'acide L-ascorbique (25 mg/L) utilisé comme standard positif. De manière similaire, les surnageants de culture se sont révélés efficaces pour éliminer les radicaux libres, avec des activités d'élimination variant entre 55,75 % et 74,55 %.



**Figure 13.** Capacité de piégeage des radicaux libres DPPH des souches de *Lactiplantibacillus* sp. (exprimée en %  $\pm$  écart-type).

Les surnageants de culture dépourvus de cellules ont démontré une efficacité supérieure dans l'élimination des radicaux par rapport aux cellules entières. Les résultats étaient comparables à ceux obtenus avec l'acide ascorbique. Sur la base de ces observations, il est hypothétiquement suggéré que les métabolites excrétés produits par les souches de *Lactiplantibacillus* sp. sont responsables de leur capacité à éliminer les radicaux DPPH. Lors de l'évaluation primaire de l'activité antioxydante, les cellules bactériennes ont montré une activité limitée dans les conditions de mesure, sans stress oxydatif pour induire des mécanismes de défense antioxydants. Nos résultats suggèrent que leur capacité à éliminer les radicaux DPPH est modeste comparée à celle de l'acide L-ascorbique, un standard antioxydant puissant. Il est à noter qu'en revanche aux souches isolées *L. plantarum* AML1, AML2, AML3 et AML5, la fraction du milieu de *L. plantarum* KO9, isolée du lait d'équidés, a éliminé une quantité équivalente (statistiquement négligeable) de radicaux que les cellules entières (Li et al., 2012). Certaines souches de bactéries lactiques produisent des métabolites présentant d'excellentes capacités d'élimination des radicaux DPPH, comme l'indiquent les travaux de Ji et al. (2015).

Le surnageant de culture de toutes les souches a montré une forte capacité à éliminer le radical ABTS•+. Les taux d'activité d'élimination du radical ABTS varient de  $48,73 \pm 2,626 \%$  (*L. plantarum* AML1) à  $85,38 \pm 0,21 \%$  (*L. plantarum* AML2) (**Figure 14**). Les taux de capture du radical ABTS+ étaient supérieurs à ceux enregistrés avec des lactobacilles isolés de selles canines et félines (**Kim et al., 2021**). L'ABTS est un radical azoté qui peut être neutralisé en une molécule stable et irréversible soit par réduction radicalaire par transfert d'atomes d'hydrogène, soit par réduction directe par transfert d'électrons, et possède une stœchiométrie similaire à celle des antioxydants standards tels que le trolox et l'acide ascorbique (**Prior et al., 2005**).



**Figure 14.** Activité de piégeage de l'ABTS du surnageant des isolats de *Lactiplantibacillus*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne de trois répétitions

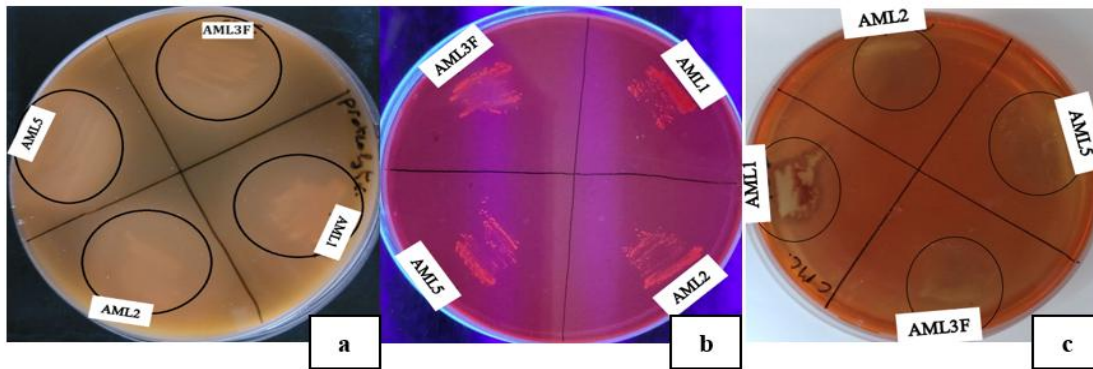
### I.6.2. Activités enzymatiques

La production de protéases est une caractéristique importante des bactéries probiotiques, selon des recherches antérieures (**Khusro et al., 2021**), car elle peut accélérer la dégradation des protéines alimentaires, favorisant ainsi l'absorption des nutriments et la santé globale des volailles. Dans ce travail, les souches de *Lactiplantibacillus* isolées des selles de poulets de chair ont montré une activité protéolytique significative, comme le montrent les zones claires

**(Figure 15.a)** autour des colonies sur le milieu agar utilisé avec du lait écrémé comme substrat. Ces zones distinctes indiquent la présence de protéases extracellulaires capables de dégrader les substrats protéiques dans le milieu. Cette observation est en accord avec des recherches antérieures qui ont trouvé une activité protéolytique dans d'autres souches de *Lactobacillus*, suggérant que *Lactobacillus plantarum* peut aider à la digestion des protéines dans le tractus intestinal des volailles (**Chang et al., 2022; Leal et al., 2023**).

Le système protéolytique des souches probiotiques offre de nouvelles opportunités pour la création d'aliments fonctionnels potentiellement bénéfiques pour la santé (**Sah et al., 2014**). Dans cette étude, toutes les souches de *Lactiplantibacillus* testées sur gélose nutritive contenant 10 % (m/v) de poudre de lait ont montré une activité protéolytique positive. Cette activité est principalement attribuable aux protéases présentes dans la paroi cellulaire (**Qian et al., 2011**). Outre son importance biotechnologique, l'activité protéolytique permet également la libération de composés bioactifs capables d'exercer des effets antioxydants et antimutagènes (**Sah et al., 2014; Elfahri et al., 2016; Mechmeche et al., 2017**).

Toutes les souches de *L. plantarum* ne présentent pas d'activité amylolytique, ce qui peut expliquer l'absence de formation de zones claires autour des colonies. La zone de clairance **(Figure 15.b)** a montré que les souches de *L. plantarum* produisent de la lipase extracellulaire. La formation d'une zone claire autour des colonies sur de l'agar MRS enrichi en CMC démontre que les BL sont cellulolytiques **(Figure 15.c)**.

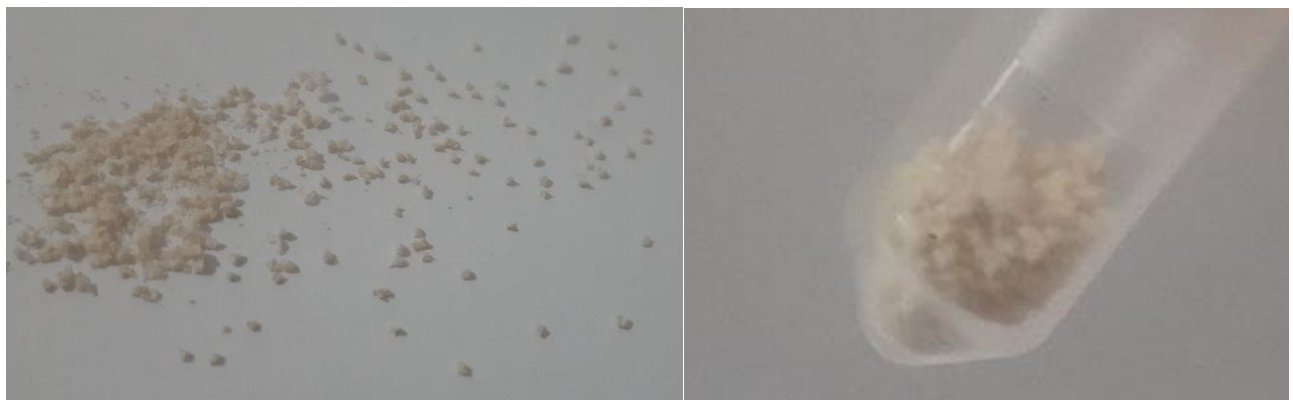


**Figure 15.** Activités enzymatiques des souches de *Lactopantibacillus* sp. a: activité protéolytique ; b : activité lipolytique ; c : activité cellulolytique."

## II. Encapsulation

### II.1. Effet de l'encapsulation sur la viabilité et caractérisation des billes d'alginate par microscopie électronique à balayage

Les billes d'alginate pour la formulation choisie (1,5 % p/v d'alginate et 1,5 % p/v de CaCl<sub>2</sub>) avaient une forme régulière et sphérique (**Figure 16**), et mesuraient entre 1,8 et 2 mm.



**Figure 16.** Microcapsules lyophilisées, montrant la granularité de l'échantillon (à gauche) et l'uniformité à grande échelle du produit (à droite). Les microcapsules ont été séchées à l'aide d'un lyophilisateur (CHRIST ALPHA 1-2 LD plus lyophilisateur (Allemagne)).

Les caractéristiques des billes sont similaires à celles observées par **Lotfipour et al. (2012)** et **Lopes et al. (2017)**, qui ont noté des diamètres de billes d'alginate contenant des lactobacilles variant de 1,59 à 1,67 mm et 1,53 to 1,90 mm respectivement.

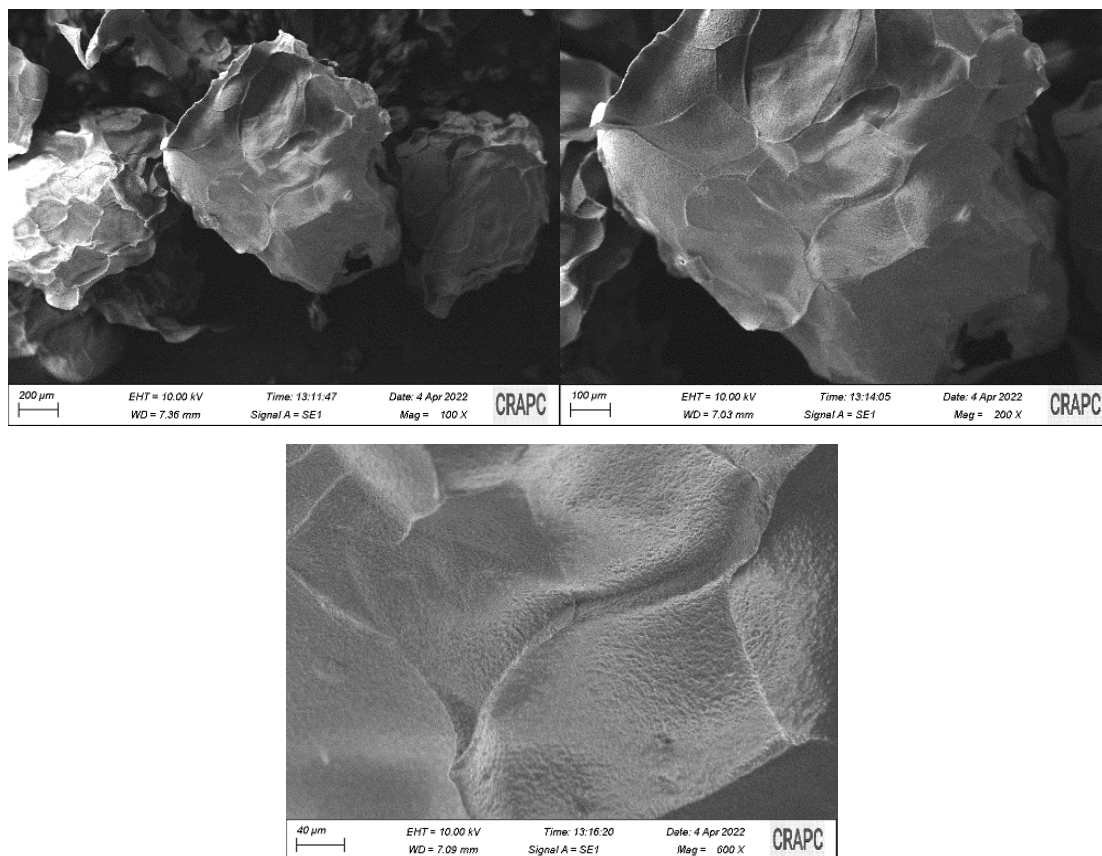
Les résultats concernant l'effet de l'encapsulation sur la viabilité ont montré qu'il n'y avait pas de perte considérable de viabilité pour toutes les souches encapsulées de *Lactiplantibacillus* *sp.*, et plus de 99,9 % des cellules ont été correctement piégées (**Tableau V**). Les résultats d'efficacité d'encapsulation sont comparables à ceux rapportés par **Lotfipour et al. (2012)**, qui ont obtenu des valeurs supérieures à 98 %.

**Tableau V.** Effet de l'encapsulation sur la viabilité des souches de *Lactiplantibacillus* *sp.*

|                                                  | AML3F        | AML1         | AML2         | AML3        | AML5        |
|--------------------------------------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|
| Effet de<br>l'encapsulation sur la<br>viabilité% | 99.98±0.0016 | 99.98±0.0036 | 99.98±0.0087 | 99.99±0.008 | 99.99±0.001 |

Selon **Chandramouli et al. (2004)**, les concentrations d'alginate inférieures à 1 % (p/v) sont difficiles à encapsuler en raison de la viscosité réduite de la solution d'alginate et du nombre limité de sites ioniques pour la réticulation. De plus, les concentrations supérieures à 2 % (p/v) sont trop visqueuses, ce qui complique le processus d'encapsulation. Par ailleurs, la plupart des études précédentes indiquent que l'alginate de sodium est généralement utilisé à des concentrations variant de 0,75 % à 2 % (p/v) (**Lotfipour et al., 2012**).

Les images de microscopie électronique à balayage des capsules préparées après lyophilisation montrent que la plupart des capsules étaient principalement sphériques, bien que certaines aient irrégulières (**Figure 17**). Elles présentaient une surface rugueuse, non homogène, et étaient constituées de particules polyédriques. Ces caractéristiques sont compatibles avec le rétrécissement qui se produit pendant le processus de séchage (**Sriamornsak et al., 2007**).

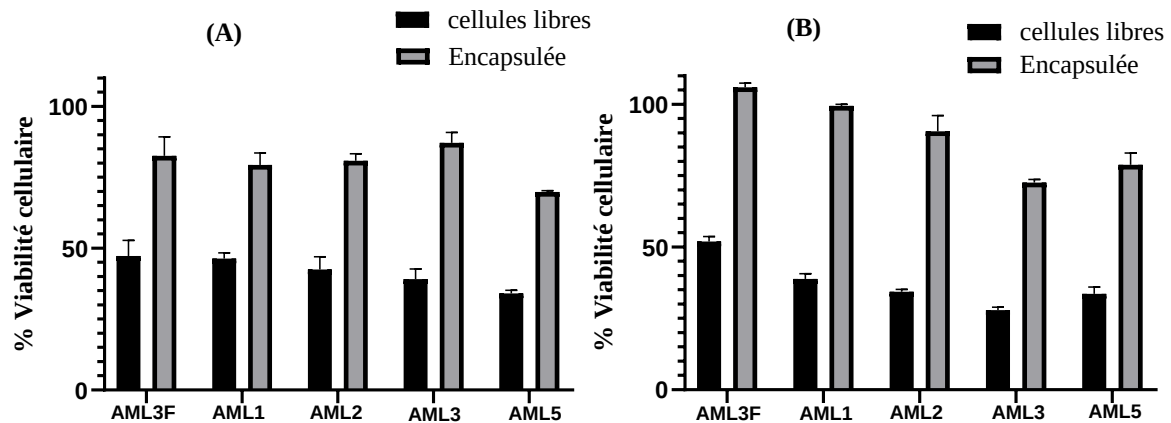


**Figure 17.** Micrographies électroniques à balayage des billes d'alginate lyophilisées contenant des *L.plantarum*. Grossissement X100, X200 et X600, respectivement.

## II.2. Effet de l'encapsulation sur la survie bactérienne dans des conditions simulées du tractus gastro-intestinal

Deux heures après l'exposition aux sucs gastriques et intestinaux simulés, les taux de survie des cellules bactériennes libres et encapsulées ont été examinés, comme illustré à la **Figure 18**. Après 2 heures d'incubation dans les sucs simulés, il a été observé que les cellules encapsulées présentaient des taux de survie significativement plus élevés par rapport aux cellules libres ( $p < 0,01$ ). Le processus d'encapsulation s'est révélé efficace pour protéger les bactéries des conditions acides du suc gastrique simulé et des effets nocifs de la bile. Les cellules encapsulées ont conservé 69–87 % de leur viabilité après 120 minutes d'exposition au suc gastrique, tandis que les cellules libres n'ont conservé que 34–47 % de leur viabilité. Après 120 minutes dans le suc intestinal, les cellules encapsulées ont maintenu 72–100 % de leur

viabilité, alors que les cellules libres n'ont maintenu que 27–51 %. Les cellules encapsulées ont démontré une viabilité significativement plus grande par rapport aux cellules libres lorsqu'elles ont été exposées aux fluides gastriques et intestinaux simulés.



**Figure 18.** Effet des sucs gastriques (A) et intestinaux (B) sur la viabilité des souches de *Lactiplantibacillus sp.* libres et encapsulées, exprimé en %  $\pm$  écart-type (SD) de trois expériences séparées.

Il est bien connu que la tolérance aux acides dans le tractus gastro-intestinal (TGI) est une caractéristique essentielle pour une souche probiotique lorsqu'elle est administrée par voie orale. En effet, pour son application dans l'alimentation des poulets de chair, le probiotique doit survivre au proventricule, au gésier et à l'intestin supérieur avant d'atteindre l'extrémité distale du système gastro-intestinal, où il pourra exercer ses effets probiotiques. Le pH dans le TGI des volailles peut varier de 2,5 à 4,5, et le temps de digestion peut aller de 30 minutes à 3 heures (**Ben Salah et al., 2012**). Bien que la tolérance aux acides dépende de la souche, la viabilité des probiotiques est considérablement affectée par l'environnement acide du suc gastrique (**Hashim et al., 2021**). De plus, le stress thermique et le choc osmotique peuvent endommager l'intégrité des probiotiques pendant le stockage à long terme et le processus de séchage, entraînant la

déshydratation et l'altération des fonctions cellulaires, en particulier lors de processus de fabrication tels que le séchage et la pasteurisation (**Burns et al., 2008**).

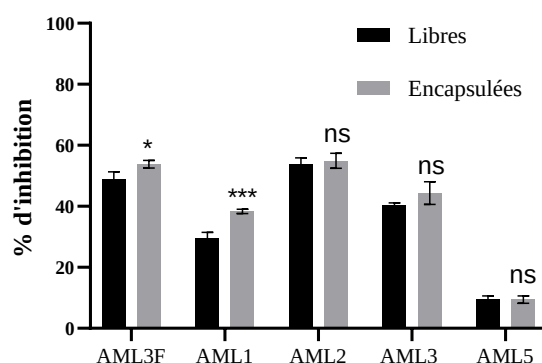
Pour garantir la survie des probiotiques tout au long du processus de fabrication, du stockage et de la digestion, l'encapsulation semble être une solution prometteuse. Comme le rapportent **Ozyurt et O'tles (2014)**, les probiotiques nécessitent une encapsulation car ils sont sensibles et peuvent être détruits par des facteurs tels que l'exposition à l'air, l'humidité, la température, le pH de l'estomac et les solutions de sels biliaires. L'encapsulation dans des billes d'alginate de calcium a souvent été utilisé pour immobiliser les BL (**Lee et Heo, 2000; Garbayo et al., 2004**).

Après une exposition au suc gastrique simulé, les comptages bactériens viables des cellules libres étaient beaucoup plus faibles que ceux des cellules encapsulées. Selon **Mitropoulou et al. (2013)**, cela s'explique par le fait que l'encapsulation offre une protection contre le faible pH de l'estomac. Notre étude confirme l'hypothèse selon laquelle les billes d'alginate peuvent protéger les bactéries des environnements acides (**Sultana et al., 2000; Khosravi Zanjani et al., 2014**). Cependant, il a été rapporté que l'encapsulation des bactéries dans des billes d'alginate pourrait ne pas fournir une protection suffisante contre une acidité extrême (**Papadimitriou et al., 2016**). Le duodénum, l'organe digestif suivant l'estomac, pose un défi supplémentaire en raison de la présence de sels biliaires (**Abedin-Do et al., 2015**). Il est à noter que toutes les cinq souches étudiées ont montré des taux de viabilité 48 % à 70 % à des concentrations de bile de 0,5 %, après 2 heures d'exposition. Les sels biliaires peuvent être nocifs pour les membranes cellulaires probiotiques (**Lai et al., 2020**). Après 2 heures d'incubation dans le suc intestinal simulé, les BL libres se sont révélés moins viables que les encapsulés. L'augmentation de la survie des bactéries encapsulées a révélé l'effet bénéfique de l'encapsulation en alginate sur les sels biliaires. Les résultats sont cohérents avec ceux de

Trabelsi et al. (2013), qui ont trouvé que l'encapsulation de *L. plantarum* TN8 avec de l'alginate de calcium et de la chitosane augmentait considérablement leur survie en conditions de sels biliaires par rapport aux bactéries libres.

### II.3. Inhibition de *Fusarium graminearum* par les souches de *Lactiplantibacillus* libres et encapsulées

Les BL libres et encapsulés ont été testés pour leur capacité à inhiber la croissance de *F. graminearum*. Toutes les souches bactériennes ont montré une activité antifongique contre *F. graminearum*. L'action inhibitrice la plus marquée contre *F. graminearum* a été observée avec AML2 (Figure 19). AML1 encapsulé était plus efficace pour inhiber la croissance fongique que les cellules libres, avec une différence statistiquement significative ( $p < 0,01$ ). AML3F, AML2 et AML5 ne présentaient pas de différences significatives entre elles, qu'elles soient libres ou encapsulées.



**Figure 19.** Inhibition de la croissance de *F. graminearum* par des probiotiques. ns : différence non significative, \*  $p < 0,05$  significatif par rapport aux bactéries non encapsulées (ANOVA à deux voies suivie de comparaisons multiples).

L'alimentation infectée par des champignons ou des mycotoxines est indésirable car elle diminue la qualité de l'aliment, ses caractéristiques organoleptiques et ses valeurs nutritionnelles (Deepthi et al., 2016). L'intérêt croissant pour les BL peut être attribué à la nécessité croissante de souches probiotiques efficaces dans les industries alimentaires et de

l'alimentation animale, ainsi que dans les produits de santé et la lutte contre les maladies humaines et animales. Cette étude s'est concentrée sur la question de savoir si certaines des souches identifiées possédaient une efficacité antifongique contre *Fusarium graminearum*. Les métabolites spécifiques des souches pourraient être responsables de cette suppression. Les BL produisent des acides organiques faibles, tels que l'acide lactique, l'acide acétique et l'acide propionique, en tant que sous-produits de la fermentation. Dans la plupart des cas, l'absence d'un environnement alcalin rend la putréfaction fongique impossible (**Paul Ross et al., 2002**). Comparée à AML3 non encapsulé, la capacité antifongique d'AML3 encapsulé était légèrement supérieure. La différence était statistiquement significative. L'encapsulation de *L. plantarum* peut protéger les bactéries des conditions environnementales sévères, améliorer leur survie pendant le stockage et renforcer leur potentiel antifongique. L'activité antifongique de *L. plantarum* encapsulé contre *F. graminearum* n'a pas été documentée dans des études antérieures.

# Conclusion

## Conclusion

Ce travail de recherche s'est concentré sur une démarche visant à caractériser et encapsuler des souches lactiques pour l'utilisation comme additifs alimentaires pour les poulets de chair. Cette démarche a impliqué plusieurs étapes, notamment le criblage des bactéries lactiques isolées à partir de fientes de poulets, selon leur activité antibactérienne, leur identification moléculaire, et l'évaluation de leurs propriétés probiotiques et leur innocuité.

Dans la présente étude, 5 isolats de bactéries lactiques ont été obtenus, collectés dans 2 communes de la wilaya de Bejaïa et testées pour leur potentiel probiotique. Les isolats lactiques ont été identifiés grâce à l'analyse de l'ARN 16S comme étant *Lactiplantibacillus plantarum*. Malgré leur statut GRAS, ces cinq souches de *Lactiplantibacillus* ont fait l'objet d'une étude de leurs caractères sécuritaires (absence d'activité hémolytique et d'effet cytotoxique sur les cellules NIT-1 et EMT6 et la résistance aux antibiotiques). Aucun isolat n'a présenté d'activité hémolytique, ce qui témoigne de leur innocuité. Toutes les souches étaient inoffensives et ne présente aucun effet cytotoxique sur les cellules NIT-1 et EMT6. La colonisation du colon par les éventuels candidats probiotiques est un critère important. De ce fait, l'auto-agrégation et l'hydrophobicité de la paroi des *Lactiplantibacillus* sélectionnés, la capacité d'adhésion au polystyrène ont été évalués. Toutes les souches de *L. plantarum* sont hydrophiles et présente des taux d'auto-agrégation qui varient de  $9,00 \pm 1,24$  % à  $38,58 \pm 0,96$  %. Ainsi, ces souches ont montré une forte production de biofilm sur polystyrène, indiquant des capacités d'adhésion potentielles dans le tractus gastro-intestinal. Toutes les quatre souches de *L. plantarum* sont hydrophiles. Envisager leur application probiotique suppose qu'elles possèdent des effets bénéfiques sur la santé. De ce fait, leurs effets antioxydant a été exploré. L'effet antioxydant des souches probiotiques joue un rôle majeur dans la diminution du stress oxydatif par le rétablissement de l'équilibre oxydants/antioxydants dans l'hôte et lors de leur incorporation

dans un aliment fonctionnel, les *Lactiplantibacillus* sp. AML3F, AML1, AML2, AML3 et AML5 étudiées ont montré une activité antioxydante très importante qui ont été estimées à 71,90 %, 6,10 %, 9,10 %, 17,90 % et 23,61 %, respectivement contre le DPPH et varient entre  $48,73 \pm 2,626$  % et  $85,38 \pm 0,21$  % contre l'ABTS. Il a été constaté que *L. plantarum* présente des effets inhibiteurs significatifs sur la croissance et le développement de *Fusarium*, un champignon pathogène qui provoque des effets néfastes sur diverses cultures et impacte la production alimentaire. En outre, L'encapsulation de ces souches dans des billes d'alginate a amélioré leur survie par rapport aux cellules libres, dans les sucs gastriques (69–87 % contre 34–47 %) et intestinaux (72–100 % contre 27–51 %), après 120 minutes d'exposition, ce qui en fait une méthode précieuse pour la fabrication d'additifs pour l'alimentation des volailles.

### **Perspectives**

Malgré l'obtention d'une quantité considérable de résultats à la fin de cette étude et la mise en place d'une collection de souches d'intérêt, il est essentiel de mener d'autres travaux afin de répondre à certaines questions qui restent encore sans réponse et d'appliquer réellement les souches obtenues. Ainsi, il serait avisé, entre autres, de :

- Examiner d'autres aspects de l'activité antioxydante des souches en utilisant un modèle cellulaire *in vitro*.
- Réaliser une étude *in vivo* sur des poulets de chair pour vérifier certaines propriétés probiotiques, telles que l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire.
- Améliorer les techniques d'encapsulation et évaluer leur efficacité dans différentes formulations d'aliments pour maximiser la survie des souches dans le tractus digestif des poulets.

- Investiguer les mécanismes moléculaires par lesquels ces souches exercent leurs effets probiotiques, antioxydants et antifongiques pour mieux comprendre leur mode d'action et optimiser leur utilisation.
- Tester l'intégration des souches sélectionnées dans des régimes alimentaires pour volailles et évaluer leur impact sur la productivité et la qualité des produits avicoles.

# **Références**

## **bibliographiques**

## Références bibliographiques

- Abbas, A. (2022). Immuno-Modulatory Effects of *Lactobacillus* in *Salmonella Gallinarum* Infected Broiler Chicks. *Pakistan Journal of Science*, 73(1), 77–87. <https://doi.org/10.57041/pjs.v73i1.645>
- Abdelazez, A., Heba, A., Zhu, Z., & Sami, R. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Advances in Environmental Biology*, 12(1). <https://doi.org/10.22587/aeb.2018.12.1.4>
- Abedin-Do, A., Taherian-Esfahani, Z., Ghafouri-Fard, S., Ghafouri-Fard, S., & Motevaseli, E. (2015). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* strains: Emphasis on their effects on cancer cells. *Immunotherapy*, 7(12), 1307–1329. <https://doi.org/10.2217/imt.15.92>
- Agnelo, P. C., Subhashini, R., Kumutha, K., Subbiah, A., & Ilamaran, M. (2023). Exploring Lactic Acid Bacterial Metabolites for Antimicrobial Activity Against Spoilage Organisms of Grapes and Potato. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(19), 1803–1811. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i193731>
- Ahmad, P. R., Rather, M. A., Nabi, B., Sofi, O. M. U. D., Hafiz, M., Fayaz, I. B., & Zehgeer, M. M. (2022). Evaluation of Efficiency and Extent of Inhibitory Characteristics of *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus plantarum*) against Selected Pathogenic Bacteria. *Asian Journal of Dairy and Food Research*, Of. <https://doi.org/10.18805/ajdfr.dr-1970>
- Ahmed, Z., Vohra, M. S., Khan, M. N., Ahmed, A., & Khan, T. A. (2019). Antimicrobial role of *Lactobacillus* species as potential probiotics against enteropathogenic bacteria in chickens. *Journal of Infection in Developing Countries*, 13(2), 130–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.10542>
- Ait Ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., Chihib, N. E., & Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>
- Akpa, E. E., Djoman, C. S., Goualié, B. G., Djeneba, O. H., Samagassi, L., & N'Guessan, D. Y. (2022). Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from Cocoa and Cassava Fermentation as Potential Probiotic for Pathogenic Microorganisms Control in Poultry Farming. *Annual Research & Review in Biology*, 37(3), 31–40. <https://doi.org/10.9734/arrb/2022/v37i330495>
- Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Sachan, S., Karthik, K., & Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10611–10618. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1687-x>
- Aliakbarpour, H. R., Chamani, M., Rahimi, G., Sadeghi, A. A., & Qujeq, D. (2012). The *Bacillus subtilis* and lactic acid bacteria probiotics influences intestinal mucin gene expression, histomorphology and growth performance in broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(9), 1285–1293. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12110>
- Aljumaah, M. R., Alkhulaifi, M. M., Abudabos, A. M., Alabdullatifb, A., El-Mubarak, A. H.,

- Al Suliman, A. R., & Stanley, D. (2020). Organic acid blend supplementation increases butyrate and acetate production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium challenged broilers. *PLoS ONE*, 15(6), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232831>
- Alloui, M. N., Szczurek, W., & Świątkiewicz, S. (2013). The usefulness of prebiotics and probiotics in modern poultry nutrition: A review. *Annals of Animal Science*, 13(1), 17–32. <https://doi.org/10.2478/v10220-012-0055-x>
- Álvarez-cisneros, Y. M., & Ponce-alquicira, E. (2019). Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria (Antimicrob). *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80624>
- Amit-Romach, E., Sklan, D., & Uni, Z. (2004). Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. *Poultry Science*, 83(7), 1093–1098. <https://doi.org/10.1093/ps/83.7.1093>
- Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00464>
- Arriola-Bretón, D., Mani-López, E., Bach, H., & López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity of protein-containing fractions isolated from *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(3), 1289–1296. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00266-5>
- Asghar, S., Arif, M., Nawaz, M., Muhammad, K., Ali, M. A., Ahmad, M. D., Iqbal, S., Anjum, A. A., Khan, M., & Nazir, J. (2016). Selection, characterisation and evaluation of potential probiotic *Lactobacillus* spp. isolated from poultry droppings. *Beneficial Microbes*, 7(1), 35–44. <https://doi.org/10.3920/BM2015.0020>
- Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1), 49–55. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00244>
- Aziz, N., Khidhir, Z., Hama, Z., & Mustafa, N. (2020). Influence of Probiotic (Miaclost) Supplementation on Carcass Yield, Chemical Composition and Meat Quality of Broiler Chick. *Journal of Animal and Poultry Production*, 11(1), 9–12. <https://doi.org/10.21608/jappmu.2020.77767>
- Baillo, A., Villena, J., Albarracín, L., Tomokiyo, M., Elean, M., Fukuyama, K., Quilodrán-Vega, S., Fadda, S., & Kitazawa, H. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum* Strains Modulate Intestinal Innate Immune Response and Increase Resistance to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection. *Microorganisms*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010063>
- Bakari, D., Tatsadjieu, N. L., Mbawala, A., & Mbofung, C. M. (2011). Assessment of Physiological Properties of Some Lactic Acid Bacteria Isolated From the Intestine of Chickens Use As Probiotics and Antimicrobial Agents Against Enteropathogenic Bacteria. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 8, 33–40.
- Baranauskienė, R., Bylaitė, E., Juratė, Ž., & Venskutonis, R. P. (2007). Flavor retention of

- peppermint (*Mentha piperita* L.) essential oil spray-dried in modified starches during encapsulation and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8), 3027–3036. <https://doi.org/10.1021/jf062508c>
- Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1808–1815. <https://doi.org/10.1128/aem.45.6.1808-1815.1983>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493–496. [https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4\\_ts.493](https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493)
- Ben Salah, R., Trabelsi, I., Ben Mansour, R., Lassoued, S., Chouayekh, H., & Bejar, S. (2012). A new *Lactobacillus plantarum* strain, TN8, from the gastro intestinal tract of poultry induces high cytokine production. *Anaerobe*, 18(4), 436–444. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.05.001>
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015>
- Bertolini, A. C., Siani, A. G., & Grosso, C. R. F. (2001). Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 780–785. <https://doi.org/10.1021/jf000436y>
- Bidra, A. S., Pelletier, J. S., Westover, J. B., Frank, S., Brown, S. M., & Tessema, B. (2020). Comparison of In Vitro Inactivation of SARS CoV-2 with Hydrogen Peroxide and Povidone-Iodine Oral Antiseptic Rinses. *Journal of Prosthodontics*, 29(7), 599–603. <https://doi.org/10.1111/jopr.13220>
- Boonaert, C. J. P., & Rouxhet, P. G. (2000). Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2548–2554. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2548-2554.2000>
- Borchers, A. T., Selmi, C., Meyers, F. J., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2009). Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44(1), 26–46. <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2296-0>
- Both, E., Bodor, Z., & Albert, B. (2018). Effect of Microencapsulation on Viability and Survival in Simulated Gut Conditions of Probiotic Bacteria. *Romanian Biotechnological Letters*, 23(6), 14140–14145. <https://doi.org/10.26327/RBL2018.227>
- Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, 7(3), 216–234. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>
- Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G. C., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2008). Probiotic crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 500–512. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0516>

- Campana, R., Van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>
- Carcione, D., Intra, J., Andriani, L., Campanile, F., Gona, F., Carletti, S., Mancini, N., Brigante, G., Cattaneo, D., Baldelli, S., Chisari, M., Piccirilli, A., Di Bella, S., & Principe, L. (2023). New Antimicrobials for Gram-Positive Sustained Infections: A Comprehensive Guide for Clinicians. *Pharmaceuticals*, 16(9). <https://doi.org/10.3390/ph16091304>
- Cassidy, A., Bingham, S. A., & Cummings, J. H. (1994). Starch intake and colorectal cancer risk: An international comparison. *British Journal of Cancer*, 69(5), 937–942. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.181>
- Cean, A., Stef, L., Simiz, E., Julean, C., Dumitrescu, G., Vasile, A., Pet, E., Drinceanu, D., & Corcionivoschi, N. (2015). Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(2), 122–130. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1849>
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.09.002>
- Chandran, A., Duary, R. K., Grover, S., & Batish, V. K. (2013). Relative expression of bacterial and host specific genes associated with probiotic survival and viability in the mice gut fed with *Lactobacillus plantarum* Lp91. *Microbiological Research*, 168(9), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.04.010>
- Chang, H. M., Loh, T. C., Foo, H. L., & Lim, E. T. C. (2022). *Lactiplantibacillus plantarum* Postbiotics: Alternative of Antibiotic Growth Promoter to Ameliorate Gut Health in Broiler Chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(July), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.883324>
- Chaubey, A., Pande, K. K., Singh, V. S., & Malhotra, B. D. (2000). Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films. 407, 97–103.
- Chaucheyras-Durand, F., & Durand, H. (2010). Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes*, 1(1), 3–9. <https://doi.org/10.3920/BM2008.1002>
- Chavarri, M., Maranon, I., & Carmen, M. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. *Probiotics*, October. <https://doi.org/10.5772/50046>
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. del C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022>
- Chen, M. J., & Chen, K. N. (2007). Applications of Probiotic Encapsulation in Dairy Products.

Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems, 83–112.  
<https://doi.org/10.1002/9780470277881.ch4>

- Chuah, L., Foo, H. L., Loh, T. C., Banu, N., Alitheen, M., Yeap, S. K., Elina, N., Mutalib, A., Rahim, R. A., & Yusoff, K. (2019). Postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* strains exert selective cytotoxicity effects on cancer cells. 2, 1–12.
- Churchward, C. P., Alany, R. G., & Snyder, L. A. S. (2018). Alternative antimicrobials: the properties of fatty acids and monoglycerides. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5), 561–570. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2018.1467875>
- Claesson, M. J., Van Sinderen, D., & O'Toole, P. W. (2007). The genus *Lactobacillus* - A genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters*, 269(1), 22–28. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00596.x>
- Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2018). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, 97(3), 1006–1021. <https://doi.org/10.3382/ps/pex359>
- Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M., & Wallbanks, S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 77(1), 5–12. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04313.x>
- Comunian, R., Daga, E., Dupré, I., Paba, A., Devirgiliis, C., Piccioni, V., Perozzi, G., Zonenschain, D., Rebecchi, A., Morelli, L., De Lorentiis, A., & Giraffa, G. (2010). Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.018>
- Damayanti, A., Kumoro, A. C., & Bahlawan, Z. A. S. (2021). Review Calcium Alginate Beads as Immobilizing Matrix of Functional Cells: Extrusion Dripping Method, Characteristics, and Application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1053(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1053/1/012017>
- Danielsen, M. (2002). Characterization of the tetracycline resistance plasmid pMD5057 from *Lactobacillus plantarum* 5057 reveals a composite structure. *Plasmid*, 48(2), 98–103. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00118-X](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00118-X)
- De Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., De Oliveira Araújo, A., Magnani, M., Saarela, M., & De Souza, E. L. (2018). In Vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 704–716. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9318-2>
- De Mille, C. M., Curry, S. M., Gabler, N. K., & Kerr, B. J. (2018). 291 Effect of Prebiotic, Fatty Acid and Copper and Zinc Ingredients on Nursery Pig Performance. *Journal of Animal Science*, 96(suppl\_2), 156–157. <https://doi.org/10.1093/jas/sky073.288>
- De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>

- Dec, M., Puchalski, A., Nowaczek, A., & Wernicki, A. (2016). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains of chicken origin against bacterial pathogens. *International Microbiology*, 19(1), 57–67. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.264>
- Deepthi, B. V, Rao, K. P., Chennapa, G., Naik, M. K., & Chandrashekara, K. T. (2016). Antifungal Attributes of *Lactobacillus plantarum* MYS6 against Fumonisin Producing *Fusarium proliferatum* Associated with Poultry Feeds. 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155122>
- Deepthi, B. V., Rao, K. P., Chennapa, G., Naik, M. K., Chandrashekara, K. T., & Sreenivasa, M. Y. (2016). Antifungal attributes of *Lactobacillus plantarum* MYS6 against fumonisin producing *Fusarium proliferatum* associated with poultry feeds. *PLoS ONE*, 11(6), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155122>
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
- Derguine, R., Rezgui, A., Tachour, R. A., Khenchouche, A., Cherif, D., Rym, A., ... & Sobhi, W. (2023). New insights of the pharmacological properties of curcumin: cytotoxicity and immuno-modulation study.
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *Lwt*, 64(2), 1179–1186. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>
- Doski, J. M. M., & Yaseen, karwan K. (2023). The effects of different levels of postbiotic and phytobiotic combination as feed additives on carcass, lipid profile, meat quality, and tibia bone in broiler chickens. *Kirkuk University Journal For Agricultural Sciences*, 14(3), 227–241. <https://doi.org/10.58928/ku23.14324>
- Douillard, F. P., & de Vos, W. M. (2019). Biotechnology of health-promoting bacteria. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107369. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.008>
- Duar, R. M., Lin, X. B., Zheng, J., Martino, M. E., Grenier, T., Pérez-Muñoz, M. E., Leulier, F., Gänzle, M., & Walter, J. (2017). Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(February), S27–S48. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX030>
- Duary, R. K., Rajput, Y. S., Batish, V. K., & Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian Journal of Medical Research*, 134(11), 664–671. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.90992>
- Duskaev, G., Rakhmatullin, S., & Kvan, O. (2020). Effects of *Bacillus cereus* and coumarin on growth performance, blood biochemical parameters, and meat quality in broilers. *Veterinary World*, 13(11), 2484–2492. <https://doi.org/10.14202/VETWORLD.2020.2484-2492>
- Eccleston, G. P. (2008). The Occurrence of Bioactive Micromonosporae in Aquatic Habitats of the Sunshine Coast in Australia. *Marine Drugs*, 6(2), 243–261.

<https://doi.org/10.3390/md20080012>

- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eesha Sabnis, Khushi Dutt Vatsa, Nikita Bagade, Yeshaswini Radhakrishnan, D. N. K. S. (2023). Lactobacillus plantarum: A Potential Health Booster- A Comprehensive Review. *Interantional Journal of Scientific Research in Engineering and Management*, 07(07), 1–6. <https://doi.org/10.55041/ijrsrem24679>
- El-Faham, I., Nematallah G.M., Ali, N., & Abdelaziz, M. (2018). Effect of Feed Restriction With Supplementation of Probiotic With Enzymes Preparation on Performance, Carcass Characteristics and Economic Traits of Broiler Chickens During Finisher Period. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 21(1), 243–254. <https://doi.org/10.21608/ejnf.2018.75460>
- Elfahri, K. R., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2016). Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 31–40. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10160>
- Emeric Guetiya Wadoun, R., Anyangwe Florence, F., Pierre Marie, K., Landry Bemmo Kamdem, U., Hector Momo Kenfack, C., Kouam Edith-Marius, F., Nzekwa, N., Horpa, E., Colizzi, V., & Zambou Ngoufack, F. (2019). <i>In Vitro</i> Antimicrobial Characterization of <i>Lactobacillus</i> Isolates Towards Their Use as Probiotic Alternatives to Antibiotic Growth Promoters. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(3), 72. <https://doi.org/10.11648/j.ijmb.20190403.13>
- Falsen, E., Pascual, C., Sjöden, B., Ohlén, M., & Collins, M. D. (1999). Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: Description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(1), 217–221. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-217>
- Fao, J., Working, W. H. O., Report, G., Guidelines, D., & London, F. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1–11.
- Feld, L., Schjørring, S., Hammer, K., Licht, T. R., Danielsen, M., Krogfelt, K., & Wilcks, A. (2008). Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4), 845–852. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn033>
- Felis, G. E., Dellaglio, F., Scientifico, D., & Scienze, F. (2015). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria Further Reading. 44–61.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), 365–378.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Omar, N. Ben. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1–2), 51–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>
- Gao, P., Hou, Q., Kwok, L. Y., Huo, D., Feng, S., & Zhang, H. (2017). Effect of feeding *Lactobacillus plantarum* P-8 on the faecal microbiota of broiler chickens exposed to

- lincomycin. *Science Bulletin*, 62(2), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.01.001>
- Garbayo, I., Vílchez, C., Vega, J. M., Nava-Saucedo, J. E., & Barbotin, J. N. (2004). Influence of immobilization parameters on growth and lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* co-immobilized in calcium alginate gel beads. *Biotechnology Letters*, 26(23), 1825–1827. <https://doi.org/10.1007/s10529-004-5134-3>
- Gbassi, G. K., & Vandamme, T. (2012). Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, 4(1), 149–163. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics4010149>
- Ghasemi-Sadabadi, M., Ebrahimnezhad, Y., Shaddel-Tili, A., Bannapour-Ghaffari, V., Kozehgari, H., & Didehvar, M. (2019). The effects of fermented milk products (kefir and yogurt) and probiotic on performance, carcass characteristics, blood parameters, and gut microbial population in broiler chickens. *Archives Animal Breeding*, 62(1), 361–374. <https://doi.org/10.5194/aab-62-361-2019>
- Gilchrist, M. J., Greko, C., Wallinga, D. B., Beran, G. W., Riley, D. G., & Thorne, P. S. (2007). The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives*, 115(2), 313–316. <https://doi.org/10.1289/ehp.8837>
- Gueimonde, M., & Salminen, S. (2006). New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*, 38(SUPPL. 2), 242–247. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60003-6](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60003-6)
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 4(JUL), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00202>
- Guo, Y., Pan, D., Li, H., Sun, Y., Zeng, X., & Yan, B. (2013). Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Food Chemistry*, 138(1), 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.029>
- Gurung, A. B., Ali, M. A., Lee, J., Farah, M. A., & Al-Anazi, K. M. (2020). Unravelling lead antiviral phytochemicals for the inhibition of SARS-CoV-2 Mpro enzyme through in silico approach. *Life Sciences*, 255, 117831. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117831>
- Haji, F., Cheon, J., Baek, J., Wang, Q., & Tam, K. C. (2022). Application of Pickering emulsions in probiotic encapsulation- A review. *Current Research in Food Science*, 5(June), 1603–1615. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.09.013>
- Halder, N., Sunder, J., De, A. K., Bhattacharya, D., & Joardar, S. N. (2024). Probiotics in poultry: a comprehensive review. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 85(1). <https://doi.org/10.1186/s41936-024-00379-5>
- Hashemi, S. M., Loh, T. C., & Foo, H. L. (2018). Liquid Metabolite of *Lactobacillus plantarum* and Putrescine Effects on Growth , Tissue Polyamine , Blood Lipids and Intestine Morphology of Broiler Chickens. 8, 333–342.
- Hashim, Z., Dailin, D. J., Zaidel, D. N. A., Yusof, A. H. M., Salleh, E., Jusoh, Y. M. M., Pa'e,

- N., Muhamad, I. I., Selvamani, S., Ho, T., & El Enshasy, H. (2021). Probiotics Application in Poultry Industry: From Feed to Meat. *Bioscience Research*, 18(1), 496–514.
- Hayet, S., Sujan, K. M., Mustari, A., & Miah, M. A. (2021). Hemato-biochemical profile of turkey birds selected from Sherpur district of Bangladesh. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 8(6), 1-5.
- Hidayat, M. N., Malaka, R., Agustina, L., & Pakiding, W. (2016). Abdominal Fat Percentage and Carcass Quality of Broiler Given Probiotics *Bacillus* spp. *Scientific Research Journal*, IV(X).
- Homayouni, A., Ehsani, M. R., Azizi, A., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2007). Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*, 16(9), 597–606.
- Hsu, C. Y., Khachatryan, L. G., Younis, N. K., Mustafa, M. A., Ahmad, N., Athab, Z. H., Polyanskaya, A. V., Kasanave, E. V., Mirzaei, R., & Karampoor, S. (2024). Microbiota-derived short chain fatty acids in pediatric health and diseases: from gut development to neuroprotection. *Frontiers in Microbiology*, 15(October). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1456793>
- Hussein, E. O. S., , Shamseldeen H. Ahmed 2, A. M. A. 1, 1, G. M. S., 3, M. E. A. E.-H., & , Ayman A. Swelum 1, 4 and Abdullah N. Alowaimer. (2020). *animals* Clostridium perfringens -Infected Broilers. <https://consensus.app/papers/effects-antibiotic-probiotic-phytobioticsupplemented-h>
- Igbafe, J., Kilonzo-Nthenge, A., Nahashon, S. N., Mafiz, A. I., & Nzomo, M. (2020). Probiotics and antimicrobial effect of lactiplantibacillus plantarum, saccharomyces cerevisiae, and bifidobacterium longum against common foodborne pathogens in poultry. *Agriculture (Switzerland)*, 10(9), 1–13. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090368>
- Iravani, S., Korbekandi, H., & Mirmohammadi, S. V. (2015). Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *Journal of Food Science and Technology*, 52(8), 4679–4696. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1516-2>
- Irfan, M., Safdar, A., Syed, Q., & Nadeem, M. (2012). Selülaz aktivitesine sahip bakterilerin topraktan izolasyonu, değerlendirilmesi ve selülaz üretim ve aktivitesinin optimizasyonu. *Turkish Journal of Biochemistry*, 37(3), 287–293. <https://doi.org/10.5505/tjb.2012.09709>
- Jacobsen, L., Wilcks, A., Hammer, K., Huys, G., Gevers, D., & Andersen, S. R. (2007). Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(1), 158–166. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00212.x>
- Ji, K., Jang, N. Y., & Kim, Y. T. (2015). Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1568–1577. <https://doi.org/10.4014/jmb.1501.01077>
- Jose, N. M., Bunt, C. R., & Hussain, M. A. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3(2), 198–212.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198>

- Jost, L. M., Kirkwood, J. M., & Whiteside, T. L. (1992). Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells. *Journal of Immunological Methods*, 147(2), 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(12\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(12)80003-2)
- Kabir, S. M. L. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(8), 3531–3546. <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>
- Kailasapathy, K. (2002). Current issues in intestinal microbiology\_2002\_Kailasapathy\_Microencapsulation of probiotic bacteria technology and potential appli.pdf. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, 3(1), 39–48.
- Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4(033). <https://doi.org/10.1079/PAVSNR20094033>
- Kasan, N. A., Said, S. M., & Ghazali, N. A. (2015). Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas. April, 220. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23183-9>
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.5402/2013/481651>
- Khan, R. U., & Naz, S. (2013). The applications of probiotics in poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 69(3), 621–632. <https://doi.org/10.1017/S0043933913000627>
- Khosravi Zanjani, M. A., Tarzi, B. G., Sharifan, A., & Mohammadi, N. (2014). Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 843–852.
- Khusro, A., Arasu, M. V., Sahibzada, M. U. K., Salem, A. Z. M., Al-Dhabi, N. A., Rivas-Caceres, R. R., Seidel, V., & Choi, K. C. (2021). Assessment on In Vitro Probiotic Attributes of *Lactobacillus plantarum* Isolated From Horse Feces. *Journal of Equine Veterinary Science*, 107, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2021.103769>
- Kim, K. T., Kim, J. W., Kim, S. Il, Kim, S., Nguyen, T. H., & Kang, C. H. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory effect and probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from canine and feline feces. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091971>
- Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C., & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 2), 346–351. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.059774-0>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>

- King, A. H. (1995). Encapsulation of Food Ingredients. 26–39. <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0590.ch003>
- Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of applied microbiology*, 94(6), 981-987.
- Kostelac, D., Gerić, M., Gajski, G., Markov, K., Domijan, A. M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Svetec, I. K., Žunar, B., & Frece, J. (2021). Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential. *International Dairy Journal*, 112, 104828. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104828>
- Kothari, D., Lee, W., Jung, E. S., Niu, K., & Lee, C. H. (n.d.). Controlled Fermentation Using Autochthonous *Lactobacillus plantarum* Improves Antimicrobial Potential of Chinese Chives against Poultry Pathogens.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054>
- Lai, J. T., Lai, K. W., Zhu, L. Y., Nyam, K. L., & Pui, L. P. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 299v and its storage in kuini juice. *Malaysian Journal of Microbiology*, 16(4), 235–244. <https://doi.org/10.21161/mjm.190398>
- Leal, K., Truong, L., Maga, E., & King, A. (2023). *Lactobacillus* (*L. plantarum* & *L. rhamnosus*) and *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*): effects on performance, biochemical parameters, ammonium ion in manure, and digestibility of broiler chickens. *Poultry Science*, 102(4), 102525. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102525>
- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 869–873. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.869-873.2000>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), 256–259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Li, S., Zhao, Y., Zhang, L., Zhang, X., Huang, L., Li, D., Niu, C., Yang, Z., & Wang, Q. (2012). Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods. *Food Chemistry*, 135(3), 1914–1919. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.048>
- Li, X. Y., Chen, X. G., Sun, Z. W., Park, H. J., & Cha, D. S. (2011). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83(4), 1479–1485. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.053>

- Liu, H., Xie, M., & Nie, S. (2020). Recent trends and applications of polysaccharides for microencapsulation of probiotics. *Food Frontiers*, 1(1), 45–59. <https://doi.org/10.1002/fft2.11>
- Liu, L., Li, L., Li, C., Wang, H., Zhang, X., Ren, Q., Zhang, H., Jin, N., Li, C., & Zhao, C. (2023). Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* LPJZ-658 Supplementation on the Production, Meat Quality, Intestinal Morphology, and Cecal Microbiota of Broilers Chickens. *Microorganisms*, 11(6), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061549>
- Lopes, M. de F. S., Leitão, A. L., Regalla, M., Figueiredo Marques, J. J., Carrondo, M. J. T., & Crespo, M. T. B. (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1–2), 107–115. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00013-2)
- Lopes, S., Bueno, L., De Aguiar Júnior, F., & Finkler, C. L. L. (2017). Preparation and characterization of alginate and gelatin microcapsules containing *Lactobacillus Rhamnosus*. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(3), 1601–1613. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170071>
- Lotfipour, F., Mirzaeei, S., & Maghsoodi, M. (2012). Evaluation of the effect of CaCl<sub>2</sub> and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. 2(1), 71–78. <https://doi.org/10.5681/apb.2012.010>
- Lv, W., Ma, Y., Zhang, Y., Wang, T., Huang, J., He, S., Du, H., & Guo, S. (2023). Effects of *Lactobacillus plantarum* fermented Shenling Baizhu San on gut microbiota, antioxidant capacity, and intestinal barrier function of yellow-plumed broilers. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1103023>
- Mali, J. K., Sutar, Y. B., Pahelkar, A. R., Verma, P. M., & Telvekar, V. N. (2020). Novel fatty acid-thiadiazole derivatives as potential antimycobacterial agents. *Chemical Biology and Drug Design*, 95(1), 174–181. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13634>
- Mani-López, E., García, H. S., & López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*, 45(2), 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- Martino, M. E., Bayjanov, J. R., Caffrey, B. E., Wels, M., Joncour, P., Hughes, S., Gillet, B., Kleerebezem, M., van Hijum, S. A. F. T., & Leulier, F. (2016). Nomadic lifestyle of *Lactobacillus plantarum* revealed by comparative genomics of 54 strains isolated from different habitats. *Environmental Microbiology*, 18(12), 4974–4989. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13455>
- Mazanko, M. S., Gorlov, I. F., Prazdnova, E. V., Makarenko, M. S., Usatov, A. V., Bren, A. B., Chistyakov, V. A., Tutelyan, A. V., Komarova, Z. B., Mosolova, N. I., Pilipenko, D. N., Krotova, O. E., Struk, A. N., Lin, A., & Chikindas, M. L. (2018). *Bacillus Probiotic*

Supplementations Improve Laying Performance, Egg Quality, Hatching of Laying Hens, and Sperm Quality of Roosters. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(2), 367–373. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9369-4>

Mechmeche, M., Kachouri, F., Ksontini, H., & Hamdi, M. (2017). Production of bioactive peptides from tomato seed isolate by *Lactobacillus plantarum* fermentation and enhancement of antioxidant activity. *Food Biotechnology*, 31(2), 94–113. <https://doi.org/10.1080/08905436.2017.1302888>

Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>

Mishra, V., Shah, C., Mokashe, N., Chavan, R., Yadav, H., & Prajapati, J. (2015). Probiotics as potential antioxidants : A Systematic Review. <https://doi.org/10.1021/jf506326t>

Mitropoulou, G., Nedovic, V., Goyal, A., & Kourkoutas, Y. (2013). Immobilization technologies in probiotic food production. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/716861>

Naeem, M. (2018). Importance and Promotion of Gut Health in Broilers through Dietary Interventions. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 3(1). <https://doi.org/10.31031/apdv.2018.03.000552>

Nallala, V., & Jeevaratnam, K. (2015). Molecular Characterization of Bacteriocinogenic, Antifungal and Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Chicken Gastrointestinal Tract. *Advances in Microbiology*, 05(09), 644–660. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.59067>

Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. (2014). Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL. *Microbiology and Immunology*, 58(9), 492–502. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12175>

Narayanan, R. (2024). In vitro analysis on the adhesion potential of *Lactiplantibacillus plantarum* from infant faeces and its gastrointestinal localization, growth promotion, and immunomodulation in Wistar rats: a preliminary study. *Letters in Applied Microbiology*, 77(4). <https://doi.org/10.1039/c4tb02020k>

Nazef, L., Belguesmia, Y., Tani, A., Prévost, H., & Drider, D. (2008). Identification of lactic acid bacteria from poultry feces: Evidence on anti-*Campylobacter* and anti-*Listeria* activities. *Poultry Science*, 87(2), 329–334. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00282>

Neupane, D., Nepali, D., Devkota, N., Sharma, M., & Kadaria, I. (2019). Effect of Probiotics on production and egg quality of dual purpose chicken at Kathmundu in Nepal. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 48(1), 29–35. <https://doi.org/10.3329/bjas.v48i1.44556>

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A. H., & Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>

Nikodinoska, I., Heikkinen, J., & Moran, C. A. (2023). Antimicrobial Susceptibility Data for

- Six Lactic Acid Bacteria Tested against Fifteen Antimicrobials. *Data*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.3390/data8010010>
- O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.023>
- O'Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., & Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1059–1066. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01472.x>
- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I., & Agrawal, R. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797–808. <https://doi.org/10.1111/jam.12875>
- Ohashi, Y., & Ushida, K. (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*, 80(4), 361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2009.00645.x>
- Olhood, C. G., Beski, S. S. M., Iji, P. A., & Choct, M. (2015). Delivery routes for probiotics: Effects on broiler performance, intestinal morphology and gut microflora. *Animal Nutrition*, 1(3), 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.07.002>
- Onilude, A., Ayinla, G., & Eluehike, C. (2017). Properties of Alpha-amylase of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Cassava Waste Samples. *Biotechnology Journal International*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.9734/bji/2017/33985>
- Ozyurt, V. H., & Ötles, S. (2014). in food Properties of probiotics and encapsulated probiotics. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria*, 13(4), 413–424. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.4.8>
- Pacheco-Ordaz, R., Wall-Medrano, A., Goñi, M. G., Ramos-Clamont-Montfort, G., Ayala-Zavala, J. F., & González-Aguilar, G. A. (2018). Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 66(1), 25–31. <https://doi.org/10.1111/lam.12814>
- Padmavathi, T., Bhargavi, R., Priyanka, P. R., Niranjana, N. R., & Pavitra, P. V. (2018). Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2), 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>
- Palareti, G., Legnani, C., Cosmi, B., Antonucci, E., Erba, N., Poli, D., Testa, S., & Tosi, A. (2016). Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *International Journal of Laboratory Hematology*, 38(1), 42–49. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J. A., Linares, D. M., Ross, P., Stanton, C., Turróni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., & Kok, J. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3),

837–890. <https://doi.org/10.1128/membr.00076-15>

- Parente, E., & Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 628–638. <https://doi.org/10.1007/s002530051570>
- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. (2010). Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.005>
- Parichat, P., & Pongsak, R. (2023). Probiotics: Sources, selection and health benefits. *Research Journal of Biotechnology*, 18(5), 102–113. <https://doi.org/10.25303/1805rjbt1020113>
- Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A., & Kim, H.-Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>
- Paul Ross, R., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: Past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1–2), 3–16. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00174-5)
- Peng, X., Ed-Dra, A., Song, Y., Elbediwi, M., Nambiar, R. B., Zhou, X., & Yue, M. (2022). *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal inflammation and promotes microbiota-mediated protection against *Salmonella* fatal infections. *Frontiers in Immunology*, 13(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.973224>
- Peralta-Sánchez, J. M., Martín-Platero, A. M., Ariza-Romero, J. J., Rabelo-Ruiz, M., Zurita-González, M. J., Baños, A., Rodríguez-Ruano, S. M., Maqueda, M., Valdivia, E., & Martínez-Bueno, M. (2019). Egg production in poultry farming is improved by probiotic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAY), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01042>
- Pérez, P. F., Minnaard, Y., Disalvo, E. A., & De Antoni, G. L. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 21–26. <https://doi.org/10.1128/aem.64.1.21-26.1998>
- Pieniz, S., Andreazza, R., Anghinoni, T., Camargo, F., & Brandelli, A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control*, 37(1), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.055>
- Pourakbari, M., Seidavi, A., Asadpour, L., & Martínez, A. (2016). Probiotic level effects on growth performance, carcass traits, blood parameters, cecal microbiota, and immune response of broilers. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 88(2), 1011–1021. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150071>
- Pradhan, D., Mallappa, R. H., & Grover, S. (2020). Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. *Food Control*, 108(July 2019), 106872. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106872>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

- Qasim, D. A., Lafta, I. J., & Iyiola, O. A. (2023). Antibacterial Activity of *Lactiplantibacillus plantarum* from Dairy Products Against Some Foodborne Bacteria. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*, 47(1), 44-51.
- Qian, B., Xing, M., Cui, L., Deng, Y., Xu, Y., Huang, M., & Zhang, S. (2011). Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LB340. *Journal of Dairy Research*, 78(1), 72–79. <https://doi.org/10.1017/S0022029910000889>
- Rajam, R., & Subramanian, P. (2022). Encapsulation of probiotics: past, present and future. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-022-00228-w>
- Ramos, C. L., Thorsen, L., Schwan, R. F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.010>
- Rao, A. V., Shiwnarain, N., & Maharaj, I. (1989). Survival of Microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in Simulated Gastric and Intestinal Juices. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 22(4), 345–349. [https://doi.org/10.1016/s0315-5463\(89\)70426-0](https://doi.org/10.1016/s0315-5463(89)70426-0)
- Reque, P. M., & Brandelli, A. (2021). Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 114(December 2020), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>
- Reuben, R. C., Roy, P. C., Sarkar, S. L., Alam, R. U., & Jahid, I. K. (2019). Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1626-0>
- Rezgui, A., Mitaine-Offer, A. C., Pertuit, D., Miyamoto, T., Tanaka, C., Delemasure, S., Dutartre, P., & Lacaille-Dubois, M. A. (2013). Steroidal saponins from *Dracaena marginata*. *Natural Product Communications*, 8(2), 157–160. <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800205>
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. *Food Research International*, 137, 109682. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett*, 9(1), 29–33.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., & Mooney, D. J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1), 45–53. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00107-0)
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. de L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., ...

- Galobart, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16(3), 1–24. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., & Donkor, O. N. (2014). Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food Chemistry*, 156, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.105>
- Salminen, S., Ouwehand, A. C., & Isolauri, E. (1998). Clinical applications of probiotic bacteria - Salminen et al (1998).pdf. *International Dairy Journal*, 8(98), 563–572.
- Salvetti, E., Harris, H. M. B., Felis, G. E., & O'Toole, P. W. (2018). Comparative genomics of the genus *Lactobacillus* reveals robust phylogroups that provide the basis for reclassification. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(17), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00993-18>
- Samli, H. E., Senkoylu, N., Koc, F., Kanter, M., & Agma, A. (2007). Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition*, 61(1), 42–49. <https://doi.org/10.1080/17450390601106655>
- Sampath, V., Koo, D. H., Lim, C. B., & Kim, I. H. (2021). Supplemental effect of *Lactobacillus plantarum* on the growth performance, nutrient digestibility, gas emission, excreta microbiota, and meat quality in broilers. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola / Brazilian Journal of Poultry Science*, 23(4). <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1514>
- Schleifer, K. H. (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 46(3), 201–203. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90107-8](https://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90107-8)
- Schleifer, K. H., & Ludwig, W. (1995). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, 7–18. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_2)
- Seddik, H. A., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). *Lactobacillus plantarum* and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>
- Sen, S., Ingale, S. L., Kim, Y. W., Kim, J. S., Kim, K. H., Lohakare, J. D., Kim, E. K., Kim, H. S., Ryu, M. H., Kwon, I. K., & Chae, B. J. (2012). Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 264–268. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.021>
- Sharma, A., Lavania, M., Singh, R., & Lal, B. (2021). Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1622–1632. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.062>
- Shazali, N., Foo, H. L., Loh, T. C., Choe, D. W., & Rahim, R. A. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in

Malaysia. 1–7.

- Siezen, R. J., Tzeneva, V. A., Castioni, A., Wels, M., Phan, H. T. K., Rademaker, J. L. W., Starrenburg, M. J. C., Kleerebezem, M., & van Hylckama Vlieg, J. E. T. (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology*, 12(3), 758–773. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02119.x>
- Silva, V. K., da Silva, J. D. T., Gravena, R. A., Marques, R. H., Hada, F. H., & de Moraes, V. M. B. (2010). Yeast extract and prebiotic in pre-initial phase diet for broiler chickens raised under different temperatures. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39(1), 165–174. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982010000100022>
- Sirisopapong, M., Shimosato, T., Okrathok, S., & Khempaka, S. (2023). Assessment of lactic acid bacteria isolated from the chicken digestive tract for potential use as poultry probiotics. *Animal Bioscience*, 36(8), 1209–1220. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0455>
- Slover, C. M. (2008). *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*, 30(4), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2008.01.006>
- Song, J., Xiao, K., Ke, Y. L., Jiao, L. F., Hu, C. H., Diao, Q. Y., Shi, B., & Zou, X. T. (2014). Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry Science*, 93(3), 581–588. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03455>
- Souza, C. S., Vieites, F. M., Justino, L. R., Lima, M. F. de, Chaves, A. S., Cardoso, V. da S., Sousa, F. D. de R., Costa, T. F., Minafra, C. S., & Lima, C. A. R. de. (2020). Importância da saúde intestinal em frangos de corte. *Research, Society and Development*, 9(3), e86932475. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i3.2475>
- Souza, M. B. S. De, Borgonovi, T. F., Casarotti, S. N., Todorov, S. D., Lúcia, A., & Penna, B. (2018). *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* strains isolated from mozzarella cheese : probiotic potential , safety , acidifying kinetic parameters and viability under gastrointestinal tract conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11, 382–326.
- Sriamornsak, P., Sungthongjeen, S., & Puttipipatkachorn, S. (2007). Use of pectin as a carrier for intragastric floating drug delivery: Carbonate salt contained beads. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 436–445. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.06.013>
- Staniszewski, A., & Kordowska-Wiater, M. (2021). Probiotic and potentially probiotic yeasts—characteristics and food application. *Foods*, 10(6), 1–13. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., & Kailasapathy, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1–2), 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9)

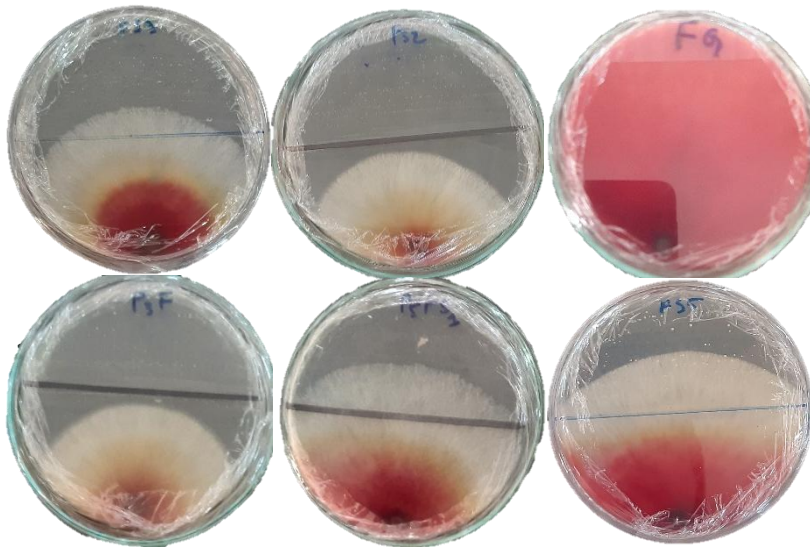
- Sunardi, J., Purnama, E. T., Sugata, M., Victor, H., Jan, T. T., & Jo, J. (2023). A comparative assessment of *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from chicken and humans as candidates for probiotics. *Biodiversitas*, 24(9), 5198–5206. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240964>
- Sungur, T., Aslim, B., Karaaslan, C., & Aktas, B. (2017). Impact of Exopolysaccharides (EPSs) of *Lactobacillus gasseri* strains isolated from human vagina on cervical tumor cells (HeLa). *Anaerobe*, 47, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.05.013>
- Tabashsum, Z., Peng, M., Alvarado-Martinez, Z., Aditya, A., Bhatti, J., Romo, P. B., Young, A., & Biswas, D. (2020). Competitive reduction of poultry-borne enteric bacterial pathogens in chicken gut with bioactive *Lactobacillus casei*. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73316-5>
- Tatsadjieu, N. (2009). Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *African Journal of ...*, 3(5), 220–227. <http://www.academicjournals.org/journal/AJMR/article-abstract/A3EF19112381>
- Terpou, A., Papadaki, A., Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Bosnea, L. A., & Kopsahelis, N. (2019). Nutrients-11-01591 (1).Pdf. *Nutrients*, 11(7), 32. <https://www.mdpi.com/2072-6643/11/7/1591>
- Toomey, N., Monaghan, Á., Fanning, S., & Bolton, D. (2009). Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(10), 3146–3152. <https://doi.org/10.1128/AEM.02471-08>
- Trabelsi, I., Bejar, W., Ayadi, D., Chouayekh, H., Kammoun, R., Bejar, S., & Ben Salah, R. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.035>
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96(7), 4252–4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
- Tyfa, A., Kunicka-Styczyńska, A., & Zabielska, J. (2015). Evaluation of hydrophobicity and quantitative analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus* sp. *Acta Biochimica Polonica*, 62(4), 785–790. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1133](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1133)
- Valan Arasu, M., Jung, M. W., Ilavenil, S., Jane, M., Kim, D. H., Lee, K. D., Park, H. S., Hur, T. Y., Choi, G. J., Lim, Y. C., Al-Dhabi, N. A., & Choi, K. C. (2013). Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. *Journal of Applied Microbiology*, 115(5), 1172–1185. <https://doi.org/10.1111/jam.12319>
- Vijayakumar, M., Ilavenil, S., Kim, D. H., Arasu, M. V., Priya, K., & Choi, K. C. (2015). In-vitro assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian rye-grass (*Lolium multiflorum*) forage. *Anaerobe*, 32(January), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.01.003>
- Vimon, S., Angkanaporn, K., & Nuengjamnong, C. (2023). Microencapsulation of

- Lactobacillus plantarum* MB001 and its probiotic effect on growth performance, cecal microbiome and gut integrity of broiler chickens in a tropical climate. *Animal Bioscience*, 36(8), 1252–1262. <https://doi.org/10.5713/ab.22.0426>
- Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., Manvi, D., & Gowda, N. N. (2023). A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. *Applied Food Research*, 3(1), 100248. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>
- Wang, Y., Takano, T., Zhou, Y., Wang, R., Toshimitsu, T., Sashihara, T., Tanokura, M., Miyakawa, T., Nakajima-Adachi, H., & Hachimura, S. (2023). Orally administered *Lactiplantibacillus plantarum* OLL2712 decreased intestinal permeability, especially in the ileum: Ingested lactic acid bacteria alleviated obesity-induced inflammation by collaborating with gut microbiota. *Frontiers in Immunology*, 14(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1123052>
- Wideman, R. F., Hamal, K. R., Stark, J. M., Blankenship, J., Lester, H., Mitchell, K. N., Lorenzoni, G., & Pevzner, I. (2012). A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: Evaluation of probiotics as a prophylactic treatment. *Poultry Science*, 91(4), 870–883. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01907>
- Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., & Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology*, 49(4), 434–442. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02684.x>
- Yan, F. F., Wang, W. C., & Cheng, H. W. (2018). *Bacillus subtilis* based probiotic improved bone mass and altered brain serotonergic and dopaminergic systems in broiler chickens. *Journal of Functional Foods*, 49(May), 501–509. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.017>
- Yang, J., Qiu, Y., Hu, S., Zhu, C., Wang, L., Wen, X., Yang, X., & Jiang, Z. (2021). *Lactobacillus plantarum* inhibited the inflammatory response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 via modulating MAPK and NF- $\kappa$ B signalling in intestinal porcine epithelial cells. *Journal of Applied Microbiology*, 130(5), 1684–1694. <https://doi.org/10.1111/jam.14835>
- Yang, S., Wei, S., Wu, Y., Fang, Y., Deng, Z., Xu, J., & Zhang, H. (2024). Encapsulation techniques, action mechanisms, and evaluation models of probiotics: Recent advances and future prospects. *Food Frontiers*, 5(3), 1212–1239. <https://doi.org/10.1002/fft2.374>
- Yin, Y., Liao, Y., Li, J., Pei, Z., Wang, L., Shi, Y., Peng, H., Tan, Y., Li, C., Bai, H., Ma, C., Gong, Y., Wei, T., & Peng, H. (2023). *Lactobacillus plantarum* GX17 benefits growth performance and improves functions of intestinal barrier/intestinal flora among yellow-feathered broilers. *Frontiers in Immunology*, 14(July), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1195382>
- Yosef, T.A., Al-Julaifi, M.Z. and Kandeel, M. (2012). The Effects of Green Tea (*Camellia Sinensis*) Probiotics on Broilers Exposed to Lead-Induced Oxidative Stress. *Journal of American Science*, 8(4), 2–9.

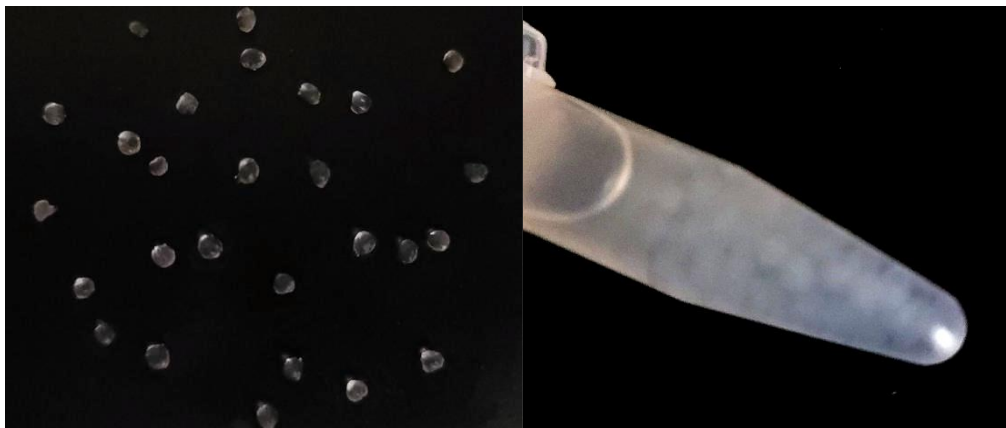
# **Annexe**

**Tableau I.** les différentes étapes et fonctions du processus digestif des poulets (*Clavijo et Flórez, 2018*).

| <b>Organe/Structure</b>                    | <b>Fonction</b>                                                                                                                        |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Bec</b>                                 | Recueille la nourriture.                                                                                                               |
| <b>Langue</b>                              | Bifurquée, utilisée pour boire et humidifier les aliments ingérés                                                                      |
| <b>Œsophage</b>                            | Transporte les aliments et l'eau vers le jabot. Contient des glandes muqueuses pour lubrifier le passage des aliments.                 |
| <b>Jabot</b>                               | Stocke temporairement les aliments. Permet la pré-digestion avec les enzymes (comme la ptyaline).                                      |
| <b>Proventricule (estomac glandulaire)</b> | Début de la digestion chimique avec des sucs gastriques, de l'acide chlorhydrique et des enzymes digestives. Forme le bol alimentaire. |
| <b>Gésier</b>                              | Organe masticatoire. Broie les grains en petites particules et les mélange avec les sucs digestifs du proventricule.                   |
| <b>Intestin grêle</b>                      | Achève la digestion des protéines et absorbe les nutriments. Contient trois sections : duodénum, jéjunum, iléon.                       |
| <b>Pancréas</b>                            | Sécrète des sucs contenant des amylases, trypsine, lipases et carboxypeptidases pour aider à la digestion.                             |
| <b>Foie</b>                                | Produit de la bile, qui est stockée dans la vésicule biliaire et sécrétée dans le duodénum pour décomposer les graisses.               |
| <b>Caeca</b>                               | Où les aliments non digérés sont fermentés. Se vident toutes les 24 heures.                                                            |
| <b>Gros intestin</b>                       | Absorbe l'eau et les aliments non digérés (comme les polysaccharides non amylacés). Passe les matériaux non digérés vers le cloaque.   |
| <b>Cloaque</b>                             | Ouverture externe par laquelle les déchets sont éliminés.                                                                              |



**Figure 1.** Inhibition de la croissance de *F. graminearum* par des probiotiques.



**Figure 2 :** *Lactiplantibacillus plantarum* encapsulé dans des billes d'alginate, montrant la forme des capsules.

## **Composition des milieux de culture (Ingrédients par litre d'eau distillée)**

### **MRS (Man-Rogosa-Sharp)**

**Peptone** : 10g ; **Acétate de sodium** : 5g ; **Extrait de viande** : 10g ; **Sulfate de magnésium** : 0,1g ; **Extrait de levure** : 5g ; **Sulfate de manganèse** : 0,05g ; **Glucose** : 20g ; **Phosphate disodique** : 2g ; **Tween 80** : 1g ; **Agar** : 15g ; **Citrate d'ammonium** : 2g. pH final à 25°C : 6.5 ± 0,2.

### **Mueller-Hinton**

**Hydrolysate acide de caséine** : 17,5 g ; **Extrait de viande** : 2,0 g ; **Amidon soluble** : 1,5 g ; **Agar** : 17 g. pH du milieu à 25 °C : 7,3 ± 0,2.

### **Gélose nutritive**

**Peptone** : 5g ; **Extrait de viande de bœuf** : 3g ; **Chlorure de sodium** : 5g ; **Agar** : 15g. pH final à 25°C : 7,3.

### **PDA agar**

**Pommes de terre** : infusion à partir de 200g ; **Dextrose (Glucose)** : 20g ; **Agar** : 15g. pH final (à 25°C).

**Production scientifique**

## **Production Scientifique**

### **Publications internationales**

Sebouai, M., Hamma-Faradji, S., Rezgui, A., Sobhi, W., Belaouni, H. A., Salah, R. B., ... & Bendali, F. (2024). Encapsulated probiotic *Lactiplantibacillus* strains with promising applications as feed additives for broiler chickens. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 102213. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102213>.

### **Communications internationales**

Sebouai M. Conservation of bacteria by encapsulation in PEG and silica gel. 20-23 July 2022: ICAENS 2022 CONFERENCE CHAIRMAN. Konya (Turkey).

Sebouai M, Sobhi W, Aksas A. Decolorization of methylene blue dye by free and immobilized bacteria. 19-20 Février 2021: SEMINAIRE INTERNATIONAL SUR LES SCIENCES NATURELLES ET DE LA VIE (Webinaire). Oran (Algerie).

Sebouai M. Antioxydant properties of five *Lactiplantibacillus plantarum* strains as probiotics. 12-13 June 2023: 2<sup>nd</sup> International congress on innovative technologies and engineering. Izmir (Turkey).

### **Communications nationales**

Sebouai M, Faradji Hamma S, Aksas A. Production des protéases par des actinomycètes isolées à partir du sol. 30 Mars 2022 : La valorisation des ressources naturelles et de l'environnement. Sétif (Algerie).

Sebouai M. Caractérisation de nouvelles souches probiotiques de *Lactiplantibacillus* pour un usage en alimentation de poulet de chair. 26 Juin 2024 : workshop «Application des souches probiotiques encapsulées comme additifs en alimentation animale et étude de leurs effets». Sfax-Tunisie.



Contents lists available at ScienceDirect

## Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cimid](http://www.elsevier.com/locate/cimid)

Full length article

Encapsulated probiotic *Lactiplantibacillus* strains with promising applications as feed additives for broiler chickensManel Sebouai<sup>a</sup>, Samia Hamma-Faradji<sup>b</sup>, Abdelmalek Rezgui<sup>c</sup>, Widad Sobhi<sup>c</sup>,  
Hadj Ahmed Belaouni<sup>d</sup>, Riadh Ben Salah<sup>e</sup>, Ali Aksas<sup>a</sup>, Farida Bendali<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Université de Bejaia, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Laboratoire de Biotechnologie végétale et ethnobotanique, Bejaia 06000, Algeria<sup>b</sup> Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Algeria<sup>c</sup> Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBT), Ali Mendjli, Constantine, Algeria<sup>d</sup> Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens, ENS Kouba, Alger, Algeria<sup>e</sup> Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et d'Ingénierie enzymatique (LBMIE), Centre de Biotechnologie de Sfax, B.P 1177, Sfax 3018, Tunisia

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Probiotics

*Lactiplantibacillus* sp.

Poultry feed

Antibacterial activity

Antioxidant properties

Encapsulation

## ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB), particularly Lactobacilli strains, represent a widely studied and promising group of probiotics with numerous potential health benefits. In this study, we isolated LAB strains from fecal samples of healthy broiler chickens and characterized their probiotic properties. Out of 62 initial isolates, five strains were selected for further investigations based on their antibacterial activity against pathogenic bacteria. These selected strains were identified as *Lactiplantibacillus* species. They exhibited desirable probiotic traits, including non-hemolysis, non-cytotoxicity, lack of antibiotic resistance, acid tolerance, auto-aggregation, and antioxidative potential. Encapsulation of these strains in alginate beads enhanced their survival compared to free cells, in stomach (69–87 % vs. 34–47 %) and intestinal (72–100 % vs. 27–51 %) juices, after 120 min exposure. These findings suggest that encapsulated *Lactiplantibacillus* strains could be used as feed additives for broiler chickens. Nevertheless, further studies are needed to set on their probiotic potential *in vivo*.

## 1. Introduction

In recent years, extensive research has delved into the health-promoting attributes of microorganisms, leading to the identification of a growing array of applications [1,2]. Notably, the utilization of *Lactiplantibacillus* species as an alternative to antibiotics in animal husbandry has gained considerable attention [3]. This shift in focus is primarily driven by concerns over antibiotic-resistant bacteria and the potential transmission of diseases to humans, which led to the prohibition of antimicrobial agents previously used to promote animal growth in some regions [4,5]. Consequently, the exploration of innovative nutritional and health supplements for animals has become increasingly popular [6]. The management of animals in controlled environments necessitates the dual objectives of rapid weight gain and disease prevention [7]. *Lactiplantibacillus* is widely distributed in various environments, such as the gastrointestinal and urogenital tracts of humans and animals. This versatile bacterium exhibits diverse physiological, biochemical, and genetic characteristics, including the production of antimicrobial substances like peptides, exo-polysaccharides, secondary

metabolites, and organic acids [8]. *Lactiplantibacillus plantarum* is widely used as probiotic [9]. Probiotics possess attributes such as pH regulation, production of vitamins, enzymes, antibacterial compounds, and other unidentified bioactive substances. They are also known for their ability to restore healthy intestinal microflora following disruptions caused by diseases [10,11]. *Lactiplantibacillus* has been shown to enhance the growth and quality products of animals without having a negative impact [12]. Many studies have reported the beneficial effects of *Lactiplantibacillus* on human and animal health [3,13,14]. However, their use in human and animal feed is challenging due to the unfavorable conditions in the gastro-intestinal tract (GIT) and food manufacturing process. Indeed, probiotic bacteria are susceptible to environmental factors such as acidity, high temperatures, and oxygen exposure during food manufacture. To counter these vulnerabilities, encapsulation technology, often using hydrocolloid beads, is frequently employed to enhance their survivability in harsh conditions and functionality within the GIT [15, 16]. The primary objectives of this study were the isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) strains from broiler feces with probiotic potential for the prevention and treatment of infectious

\* Corresponding author.

E-mail address: [farida.bendali@univ-bejaia.dz](mailto:farida.bendali@univ-bejaia.dz) (F. Bendali).<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2024.102213>

Received 26 January 2024; Received in revised form 6 June 2024; Accepted 14 June 2024

Available online 18 June 2024

0147-9571/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

diseases that can lead to high mortality and economic losses in broiler farms and that could be transmitted to humans. Additionally, the study aimed to assess the impact of alginate encapsulation on the survivability of the isolated strains under simulated GIT conditions, in the perspective to use encapsulated cells, as growth promoters, in broiler feed, to enhance their growth and performances.

## 2. Materials and methods

### 2.1. LAB strains isolation

Ten broiler fecal samples were randomly gathered from three farms in Bejaia. Each sample, weighing one gram, was blended with 9 mL of sterile saline solution (9 g NaCl/L) in a blender. Subsequently, the mixtures were serially ten-fold diluted and then cultured on MRS agar (Conda, Madrid, Spain) plates, followed by an incubation period of 48 h at 37°C [17]. To identify LAB strains, colonies were picked from MRS agar plates and isolates subjected to Gram staining and catalase production test. Only isolates that exhibited a Gram-positive stain and were negative for catalase production were retained. For further analysis, individual colonies were cultivated in MRS broth (Conda, Madrid, Spain). Prior to each study, LAB cultures were incubated in MRS broth for 24 h at 37°C to have fresh cultures.

### 2.2. Antibacterial activity of the isolates

The antibacterial activity of the isolates was determined using the well diffusion method as described by Saracino et al. [18] with some modifications. The indicator bacteria used in these experiments included Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Bacillus spizizenii* ATCC 6633), as well as Gram-negative (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, and *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028) reference strains. Each bacterial strain was suspended in Luria Bertani (LB) broth (Conda, Madrid, Spain) to achieve a concentration of  $10^8$  CFU/mL. These bacterial suspensions were then evenly spread onto Muller Hinton (MH) agar (HiMedia, Mumbai, India) plates using sterile swabs. Following agar solidification, wells with a 8 mm diameter were created using a sterile cork borer. Subsequently, 100 µL of each overnight culture of the LAB isolates ( $10^7$  CFU/mL), in MRS broth, was added to each well, and as controls, 100 µL of sterile LB broth and 100 µL of gentamicin were placed respectively in separate wells. After an incubation period of 24 h at 37°C, the diameter of the inhibitory zone surrounding each well was measured. The test was performed in triplicate using independent experiments.

### 2.3. Molecular identification of the LAB isolates

To identify the five selected LAB isolates, a partial sequence analysis of the 16 S rRNA gene was conducted. This process involved the extraction of genomic DNA, PCR amplification with carefully chosen primers, sequencing of the amplified DNA, and subsequent analysis of the acquired sequences. Specifically, the primer sets 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1492 R (5'-CCGTCAATTCCTTGAAGTTT-3') were employed for the partial sequencing of the 16 S rRNA gene (Bauer et al., 1966). The analysis of the gathered sequences involved comparing them to the NCBI 16 S rRNA gene sequences database, using the reference sequences as templates through the MegaBLAST tool (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Subsequently, a phylogenetic analysis was performed using the MEGA7 program [19]. This analysis included the 14 closest (non-redundant taxa) hits, comprising complete 16 S rRNA gene sequences from the five strains, and an outgroup represented by *Levilactobacillus cerevisiae* TUM BP 140423000–2250. Sequence alignment was carried out using the Muscle algorithm [20], followed by the removal of flag sequences from the resulting multisequence alignment bloc to prepare the phylogenetic analysis. The Maximum Likelihood method was applied,

utilizing the Kimura 2-parameter model [21] to infer the evolutionary relationships. The tree with the highest log likelihood value (-2956.2509) was chosen, with bootstrapping performed 100 times to assess branch support values. The Neighbor-Join and BioNJ algorithms, based on pairwise distances calculated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) technique, were used to create the initial tree(s) for the heuristic search. Additionally, a discrete Gamma distribution model (with five categories, plus or minus  $G = 0.8007$ ) was employed to account for variations in evolutionary rates across different sites. This model allowed some sites (36.3966 %) to remain evolutionarily static. In total, twenty nucleotide sequences were analyzed, and missing or empty positions were appropriately filled in. The final dataset included 1108 unique locations. The evolutionary analysis was conducted using MEGA7 [20], and the final tree structure was generated using iTOL [22].

### 2.4. Hemolytic activity and antibiotic susceptibility of the selected strains

To evaluate the hemolytic activity of probiotics, bacteria were cultured on blood agar plates (TM MEDIA, Delhi, India) for 48 h [8]. If the bacteria exhibited hemolytic activity, they would form colonies surrounded by a distinct and clear ( $\beta$ -hemolysis, complete hemolysis) or greenish ( $\alpha$ -hemolysis, partial hemolysis) hemolytic zone. The susceptibility to antibiotics of five strains, selected based on their antibacterial properties, was assessed using the agar diffusion technique, as described by Bauer et al. [23]. To perform the tests, suspensions ( $10^8$  CFU/mL) were prepared from overnight cultures of the selected LAB isolates in a saline solution. These suspensions were applied to MRS agar using the flood method. Subsequently, antibiotic discs: ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), oxytetracycline, erythromycin (15 µg), amoxicillin (20 µg), tetracycline (30 µg) and penicillin G (10 µg) were placed on the surface. The plates were incubated for 24 h at 37°C. As controls, paper discs soaked in saline solution were used. The diameter of the clear zones surrounding the antibiotic discs was measured in millimeters (mm).

### 2.5. Evaluation of the cytotoxicity of two selected strains

#### 2.5.1. Cell lines and culture conditions

Two ATCC cell lines, EMT6 mammary carcinoma cell line (ATCC® CRL-2755™) and NIT-1 pancreatic beta-cell line (ATCC® CRL-2055™) were procured from BDcome (Kouba, Algeria). EMT6 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F12, while NIT-1 cells were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium. Both cell lines were maintained in the culture media containing 15 % fetal bovine serum (FBS) and 1 % Penicillin/Streptomycin (5000 U) solution. Incubation was carried out at 37°C in an atmosphere comprising 95 % air and 5 % CO<sub>2</sub> [24,25]. All the reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Burlington, Massachusetts, USA).

The XTT (methoxynitrosulfonylphenyl-tetrazolium carboxanilide) kit (Sigma-Aldrich, Burlington, Massachusetts, USA) was employed to evaluate the cytotoxicity of the CFSs against the EMT6 and NIT-1 cell lines [24]. The CFSs were obtained after a 24-h incubation period of two selected LAB strains (AML3F and AML2) in MRS broth. The two strains were selected based on their high anti-bacterial activities. The obtained CFSs were lyophilized (LCFSs; CHRIST ALPHA 1–2 LD plus freeze-drier, Germany) and then resolubilized in phosphate-buffered saline (PBS, 0.1 M, pH 7.4). Different concentrations of LCFSs (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 60 µg/mL) for EMT6 and 3, 10, 30 and 60 µg/mL for NIT-1 cells were tested. In summary, the EMT6 and NIT-1 cell lines were cultivated in DMEM and RPMI-1640 culture media, respectively, supplemented with 5 % FBS and 1 % penicillin/streptomycin for EMT6, and 10 % FBS and 1 % Penicillin/Streptomycin for NIT-1. These cell lines were seeded in a 96-well cell culture plate at a concentration of  $10^4$  cells per well, with 190 µL of the medium, and incubated for 24 h at 37°C in a 5 % CO<sub>2</sub> environment, which made the cells attach, divide and grown in the wells. After the initial 24-h incubation, the cells were gently washed

twice with PBS. After discarding PBS, cells were treated with various concentrations (as mentioned above) of AML3F and AML2 LCFs solutions mixed with fresh culture medium and the plate was then reincubated for an additional 72 h under the same conditions. After incubation, the culture medium was removed, the wells were washed with PBS, and 200  $\mu$ L of fresh culture medium was added. A mixture of XTT1 and XTT2 reagents from the XTT Kit was prepared, and 50  $\mu$ L of this solution was added to each well. Subsequently, after 4 h of incubation at 37°C in a 5 % CO<sub>2</sub> environment, an automated microplate reader was used to measure the absorbance at 450–500 nm. Cells treated with doxorubicin were considered positive controls (100 % mortality) [26] and untreated cells were used to establish 100 % viability (negative control). The assays were carried out in triplicate, and the means  $\pm$  standard deviations (SD) were calculated. The growth inhibition percentage was calculated and the results are presented as mean  $\pm$  standard deviation.

## 2.6. Auto-aggregation ability of the selected strains

Autoaggregation of the selected strains was investigated according to the method described by Kos et al. [27] with some modifications. Briefly, bacterial cells were obtained by centrifuging the MRS broth culture at 3000 rpm for 15 min after incubation for 24 h. The resulting pellets were washed with PBS (0.1 M, pH 7.4) and then resuspended in the same buffer to achieve a concentration of approximately 10<sup>8</sup> CFU/mL. The cell suspensions (4 mL) were mixed by vortexing for 10 sec. Then 0.1 mL of the upper suspension was mixed with 0.9 mL PBS and absorbance (A<sub>0</sub>) was measured at 600 nm. Using the same method, the absorbance (A<sub>1</sub>) was determined after 3 h of incubation at room temperature. To calculate the auto-aggregation rate, the following formula was applied:

$$\text{Auto-aggregation(\%)} = 1 - (A_t/A_0) \times 100 \quad (1)$$

A<sub>t</sub> represents the absorbance after 3 h and A<sub>0</sub> absorbance at t = 0.

## 2.7. DPPH free radical scavenging ability of the selected strains

The ability of the strains to scavenge free radicals was assessed by preparing portions of the cell free culture supernatant of the MRS broth in which they were cultured overnight. Cell-free supernatant (CFS) was obtained by centrifugation at 3000 rpm/15 min at 4°C and sterilized by filtration through a 0.22  $\mu$ m syringe- filter. The resulting bacterial pellets were collected and washed with sterile 0.1 M PBS (pH 7.4) to obtain a bacterial cell suspension (BCS). For the test, 1 mL of the CFS or the BCS was mixed with 2 mL of a 0.07 mM ethanolic DPPH solution and then incubated for 30 min at room temperature in darkness. Subsequently, the absorbance of the samples (denoted as A<sub>Sample</sub>) was measured at 517 nm. As negative controls, distilled water and DPPH solution were used (A<sub>Control</sub>). For reference, a combination of bacterial suspension and ethanol (A<sub>Blank</sub>) was included. The formula used to calculate the scavenging ability percentage was as follows [28]:

$$\text{DPPH scavenging ability (\%)} = [1 - (A_{\text{Sample}} - A_{\text{Blank}}/A_{\text{Control}})] \times 100(2)$$

## 2.8. Encapsulation assay of the selected strains

### 2.8.1. Preparation of bacterial encased beads

The alginate beads were prepared using the extrusion method [29]. First, a sodium alginate solution was sterilized at 121°C for 15 min. Bacterial inoculum (10<sup>8</sup> CFU/mL) was then introduced into the alginate solution to create a uniform suspension, which was gently swirled for even distribution. The suspension was subsequently introduced drop by drop, using a syringe, into a sterile hardening solution, containing 1.5 % CaCl<sub>2</sub>. Notably, the distance between the syringe's tip and the CaCl<sub>2</sub> solution was maintained at 3 cm. Instantaneous gel spheres were formed

as the drops came into contact with the hardening solution. The beads were left in the solution for 30 min to allow them to harden. Following this hardening period, the beads were separated using a Whatman No.1 filter, washed twice with sterile saline solution, and then subjected to lyophilization using a CHRIST ALPHA 1–2 LD plus freeze-drier (Osterode, Germany). To maintain sterility, the dried beads were stored in sterile vials until use.

### 2.8.2. Encapsulation efficiency (EE)

After dissolving the encapsulated beads (1 g) in 9 mL of PBS (pH 7.4) at 37°C/2 h, the quantity of live bacteria was determined through a serial ten-fold dilution and plating on MRS agar. The encapsulation efficiency (EE) was calculated by comparing the number of live cells before and after the encapsulation process and expressing the results as a percentage of colony-forming units (CFU). The formula for calculating EE is as follows [30]:

$$EE = (N_t / N_i) \times 100 \quad (3)$$

Where:

- N<sub>t</sub> represents the cell number in particles after alginate beads formation.
- N<sub>i</sub> represents the initial cell number before the encapsulation process.

### 2.8.3. Characterization of freeze-dried beads by scanning electron microscopy

The dried beads after lyophilisation were examined by scanning electron microscopy (SEM). The SEM images were obtained with a Zeiss EVO benchtop microscope, employing magnifications of 100x and 600x, and voltages reaching up to 10 kV.

### 2.8.4. Effect of encapsulation on bacterial survival under simulated GIT conditions

In the experiment, bacterial cell suspension (10<sup>8</sup> CFU/mL) was prepared in 2- mL sterilized simulated gastric juice, consisting on 0.9 % (w/v) saline solution pH=2, adjusted using 0.01 M HCl, and 0.3 % (w/v) pepsin (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium)[31]. After a brief 10-sec vortex, the suspension was incubated at 37°C for 2 h. Simultaneously, to assess how well the encapsulated strains fared in gastric juice over different durations, the bacteria-encased beads, each weighing 0.1 g, were introduced into the gastric-like fluid for 2 h at 37°C. Similarly, the viability of the free and encapsulated strains in simulated intestinal juice was evaluated using a similar procedure. For this, bacterial cells (10<sup>8</sup> CFU/mL) or beads (0.1 g) were suspended in a solution designed to mimic the intestinal juice, which consisted of 0.5 % NaCl and 0.5 % bile salts with a pH of 8. The mixtures were then incubated for 2 h at 37°C. Following incubation, the beads were dissolved in a depolymerization solution. This solution was prepared by combining 28 mL of a 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution with 72 mL of a 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> solution, adjusting the volume to 200 mL with distilled water, and maintaining a pH of 7. The liberated cells were subsequently enumerated by plating serially ten-fold diluted samples into MRS agar. The survival rate (%) was calculated following the formula 4.

$$\text{Survival(\%)} = \frac{\text{Number of survived cells(CFU/mL)}}{\text{Initial number of inoculated cells(CFU/mL)}} \times 100 \quad (4)$$

## 2.9. Statistical analysis

Each experiment was conducted in triplicate, resulting in three separate runs for each experiment. Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . All analyses were performed using GraphPad 8.4.2 software.

### 3. Results

#### 3.1. LAB isolates gathered from chicken's feces and their antibacterial activity

Out of the 62 isolates derived from fecal samples of healthy broiler chickens, only 33 were positively identified as LAB. These LAB isolates were characterized by their unique attributes, such as small pinpointed and creamy white colony morphology, Gram-positive staining, catalase-negative nature, non-motility, and a combination of coccus and rod-shaped characteristics. Among these isolates, only 5 (15 %) displayed bacilli forms and the rest was cocci (85 %). The 33 presumptive LAB isolates were tested against 5 indicator strains (*S. aureus* ATCC 6538, *B. spizizenii* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028) using the agar well diffusion assay. The results indicated that 5 LAB isolates, corresponding to the bacilli (namely AML3F, AML1, AML2, AML3, and AML5), exhibited inhibitory effects against almost all the tested pathogens (Table 1). All five isolates were effective in slowing the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *B. spizizenii*. AML3F demonstrated the largest antibacterial activity spectrum including the five pathogens and the highest efficacy in inhibiting *E. coli* growth (14.6 mm) and *S. aureus* (23 mm). Notably, AML3F was the unique strain exhibiting an antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium (18 mm). On the other hand, AML3 displayed the least antibacterial activity against *E. coli* (11 mm) and *P. aeruginosa* (10 mm), and AML5 showed non antibacterial activity against *S. aureus*.

#### 3.2. Molecular identity of the five bacilli isolates

Based on their 16 S rRNA gene sequences, the five selected strains were identified belonging to *Lactiplantibacillus* genus. However, it's worth noting that strain AML3 diverged significantly from the other strains, with a relatively low blast identity percentage of 92.05 % when compared to the type strains of the *Lactiplantibacillus* genus (Table 2). Without a more precise polyphasic taxonomic designation, the five strains were placed in the *Lactiplantibacillus* genus. Following identification, the strains were given the following names (name, accession number): *Lactiplantibacillus* sp. AML1 (ON799438.1); *Lactiplantibacillus* sp. AML2 (ON799439.1); *Lactiplantibacillus* sp. AML3 (ON799440.1); *Lactiplantibacillus* sp. AML3F (ON799437.1); and *Lactiplantibacillus* sp. AML5 (Fig. S1, supplementary material). Transparent maroon circles reflect bootstrap values (>50 %) for trees in which the linked taxa are grouped. The number of substitutions per site was used to create a scaled version of the tree. The five strains used in this investigation were highlighted in soft pastels. An outgroup consisting of *Levilactobacillus cerevisiae* TUM BP 140423000–2250 was used.

**Table 1**  
Antibacterial activity of the bacilli strains against five pathogens.

| Strain | Inhibition zone diameter (mm) |                       |                           |                       |                       |
|--------|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|
|        | <i>E. coli</i>                | <i>P. aeruginosa</i>  | <i>S. aureus</i>          | <i>B. spizizenii</i>  | <i>S. Typhimurium</i> |
| AML3F  | 14.6<br>±1.3 <sup>a</sup>     | 10.0±1.0 <sup>a</sup> | 23.0<br>±1.0 <sup>a</sup> | 14.5±0.8 <sup>a</sup> | 18.0±0.0 <sup>a</sup> |
| AML1   | 12.1<br>±1.4 <sup>b</sup>     | 11.0±0.0 <sup>b</sup> | 15.6<br>±1.3 <sup>b</sup> | 15.0±0.0 <sup>a</sup> | 00.0±00 <sup>b</sup>  |
| AML2   | 12.5<br>±1.1 <sup>b</sup>     | 11.5±0.6 <sup>b</sup> | 13.5<br>±1.4 <sup>c</sup> | 15.5±0.7 <sup>a</sup> | 00.0±0.0 <sup>b</sup> |
| AML3   | 11.0<br>±1.0 <sup>b</sup>     | 10.0±0.0 <sup>a</sup> | 16.6<br>±1.1 <sup>d</sup> | 15.0±1.0 <sup>a</sup> | 00.0±0.0 <sup>b</sup> |
| AML5   | 12.0<br>±0.0 <sup>b</sup>     | 12.0±1.0 <sup>b</sup> | 00.0<br>±0.0 <sup>e</sup> | 17.0±0.0 <sup>b</sup> | 00.0±0.0 <sup>b</sup> |

The inhibitory zones diameters are the average of three independent measurements.

<sup>a,b,c</sup> Different letters in the same column indicate significant differences ( $p < 0.05$ )

#### 3.3. *Lactiplantibacillus* sp. strains were non-hemolytic and susceptible to antibiotics

In terms of their potential toxicity, the five selected strains were revealed  $\gamma$ -hemolytic (non-hemolytic). This classification was based on the absence of any visible transparent or greenish zones around their colonies on the blood agar plates (Fig.S2, supplementary material). Crucially, probiotic cultures mustn't carry transferable genes that confer resistance to antibiotics. The five *Lactiplantibacillus* sp. strains displayed variable resistance profile to the seven different antibiotics tested (Table 3). All the strains were susceptible to chloramphenicol (CHL), oxytetracycline (OXY), erythromycin (ERY), and tetracycline (TET). Only resistance to amoxicillin (AMX) and penicillin G (PEN) was detected in all the isolates and only AML1 was resistant to ampicillin (AMP). A moderate susceptibility to AMP was detected in AML3F.

#### 3.4. Cytotoxicity of *Lactiplantibacillus* sp. AML3F and AML2 (XTT assay)

In the assessment of cytotoxicity of two selected *Lactiplantibacillus* sp. AML3F and AML2, their CFSs were lyophilized, resolubilized in PBS at different concentrations and tested on EMT6 and NIT-1 cell lines. Our findings indicated that AML2 LCFS exhibited no significant cytotoxicity (Fig. 1) against NIT-1 cells ( $p > 0.05$ ), even at concentrations ranging from 3 to 60  $\mu\text{g/mL}$ , with an IC50 value greater than 60  $\mu\text{g/mL}$ . On the other hand, high concentrations (30–60  $\mu\text{g/mL}$ ) of AML3F LCFS showed a slight increase ( $p > 0.05$ ) in the viability of NIT-1 cells. Additionally, AML2 LCFS only resulted in a minor reduction ( $p > 0.05$ ) in EMT6 cell viability under the tested conditions. AML3F LCFS displayed no significant cytotoxicity against EMT6 ( $p > 0.05$ ), even when tested at concentrations graded from 0 to 27  $\mu\text{g/mL}$  (with an IC50 value higher than 30  $\mu\text{g/mL}$ ). In contrast, doxorubicin, used as a positive control, exhibited a high cytotoxic impact against EMT6 cells with an IC50 of  $4.885 \pm 0.063 \mu\text{g/mL}$  (Fig. 2).

#### 3.5. *Lactiplantibacillus* sp. strains were auto-aggregatives

It is assumed that the adhesion of probiotics to the intestinal epithelium is associated with their auto-aggregation capacity. Fig. 3 illustrates the results of assessment of the auto-aggregation capacity of the *Lactiplantibacillus* sp. strains. The auto-aggregation of the strains ranged from  $9.00 \pm 1.24 \%$  to  $38.58 \pm 0.96 \%$ . Notably, there was a significant variation ( $p < 0.05$ ) in the auto-aggregation rates among all the five strains. *Lactiplantibacillus* sp. AML5 displayed the highest auto-aggregation rate (38 %) over 3 h, surpassing the other strains.

#### 3.6. *Lactiplantibacillus* sp. strains displayed a potent antioxidant capacity

In terms of scavenging DPPH free radicals, the activities of the whole cells of *Lactiplantibacillus* sp. AML3F, AML1, AML2, AML3, and AML5 were estimated at 71.90 %, 6.10 %, 9.10 %, 17.90 %, and 23.61 %, respectively (Fig. 4). When compared to L-ascorbic acid (25 mg/L) used as a positive standard. Similarly, CFSs were effective in eliminating free radicals, with scavenging activities between 55.75 % and 74.55 %.

#### 3.7. Efficiency of the alginate encapsulation method

The results related to the encapsulation efficiency (EE) showed that there was no considerable loss of viability for all encapsulated *Lactiplantibacillus* sp. strains and more than 99.9 % of cells were successfully entrapped (Table S1, supplementary material).

#### 3.8. Characterization of alginate beads with scanning electron microscopy

Following the lyophilization process, the originally spherical structure of the alginate beads was disrupted, and they adopted irregular

**Table 2**

Blast results of the five bacilli isolates 16 S rDNA sequences.

| Strain | Description                                                                 | Query cover | E* | Per. Ident | Acc. Len | Accession   |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|----|------------|----------|-------------|
| AML3   | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CIP 103151 16 S rRNA, partial sequence | 78 %        | 0  | 92.05 %    | 1527     | NR_104573.1 |
| AML5   |                                                                             | 88 %        | 0  | 97.96 %    |          |             |
| AML2   |                                                                             | 89 %        | 0  | 98.10 %    |          |             |
| AML1   |                                                                             | 97 %        | 0  | 99.44 %    |          |             |
| AML3F  | <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> JCM 1149 16 S rRNA, partial sequence   | 97 %        | 0  | 98.87 %    | 1466     | NR_117813.1 |

\* : E- value

**Table 3**Antibiotic-resistance of the five *Lactiplantibacillus* strains.

| Strain | Antibiotic resistance |     |     |     |     |     |     |
|--------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | AMP                   | CHL | OXY | ERY | AMX | TET | PEN |
| AML3F  | MS                    | S   | S   | S   | R   | S   | R   |
| AML1   | R                     | S   | S   | S   | R   | S   | R   |
| AML2   | S                     | S   | S   | S   | R   | S   | R   |
| AML3   | S                     | S   | S   | S   | R   | S   | R   |
| AML5   | S                     | S   | S   | S   | R   | S   | R   |

R: resistant; MS: moderately susceptible; S: sensitive; AMP: ampicillin (10 µg); CHL: chloramphenicol (30 µg); OXY: oxytetracyclin; ERY: erythromycin (15 µg); AMX: amoxicillin (20 µg); TET: tetracyclin (30 µg); PEN: penicillin G (10 µg).

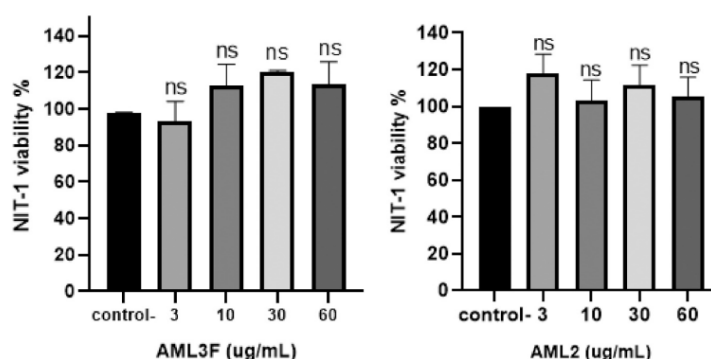
shapes with noticeable wrinkles and folds (Fig. 5).

### 3.9. Survival of free and encapsulated strains under simulated GIT conditions

Two hs following exposure to both stomach and intestinal simulated juices, the survival rates of both free and encapsulated bacterial cells were examined, as depicted in Fig. 6. After 4 h of incubation in the simulated juices, it was observed that encapsulated cells exhibited significantly higher survival rates compared to free cells ( $p < 0.01$ ). The cell encapsulation process proved to be effective in protecting the bacteria from the acidic conditions of the simulated gastric juice and the bile adverse effects. Encapsulated cells retained 69–87 % of their viability over 120 min of exposure to stomach juice, while free cells retained only 34–47 % of their viability. After 120 min in intestinal juice, encapsulated cells maintained 72–100 % of their viability, whereas free cells only maintained 27–51 %. Encapsulated cells demonstrated significantly greater viability compared to free cells when exposed to simulated gastric and intestinal fluids.

## 4. Discussion

The most prevalent and extensively studied group of probiotics are lactic acid bacteria (LAB). Their positive influence is associated with their ability to inhibit the growth of pathogens, modulate the balance of the gut microbiota, and enhance the immune system [31,32]. Despite the extensive research on probiotics, there remains a need to explore new strains, as the probiotic properties are specific to each strain. Many experts suggest aligning the strain's origin with its intended application [33]. It's important to isolate adapted strains to a niche with view to their reintroduction in the same environment [34–36]. In this study, we evaluated the safety and functional characteristics of LAB strains isolated from broiler chicken's feces since our ultimate goal is their use in chicken's feed. Based on the fact that the effectiveness of potential probiotic strains in combatting infections is a crucial consideration for maintaining a healthy gut microbial balance, we focused our primarily screening on the antimicrobial property of the isolates. Out of the initial pool of 62 isolates, we selected five strains (AML1, AML2, AML3, AML5 and AML3F) that exhibited the most potent antibacterial activity against pathogenic bacterial strains, commonly affecting chickens and contaminating meat. The ability of probiotic bacteria to colonize the gut mucosa and inhibit the growth of harmful pathogens is crucial [1]. The isolated LAB strains inhibited the growth of *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. spizizenii*, and *Salmonella* Typhimurium. It's well known that probiotic LAB could produce various antimicrobial substances or metabolites, including organic acids, bacteriocins, bacteriocin-like components, and hydrogen peroxide, which are often responsible for their antagonistic activity [33]. Consequently, the antibacterial activity of the isolates could be attributed to different mechanisms such as the production of bacteriocins with bactericidal or bacteriostatic effects and the reduction in pH resulting from lactic acid synthesis [37]. Following the phylogenetic analysis, all five strains have been classified within the genus *Lactiplantibacillus*. This genus has been known to have significant impacts on animal health [38] and is frequently found in broiler feces [39]. However, for the AML3 strain, the low identity percentage



**Fig. 1.** Effect of AML3F and AML2 cell-free supernatant (CFS) at different concentrations on NIT-1 viability using XTT assay. The presented results are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are derived from three independent experiments. "ns" indicates results that are not statistically significant, as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test when compared to the negative control (PBS).

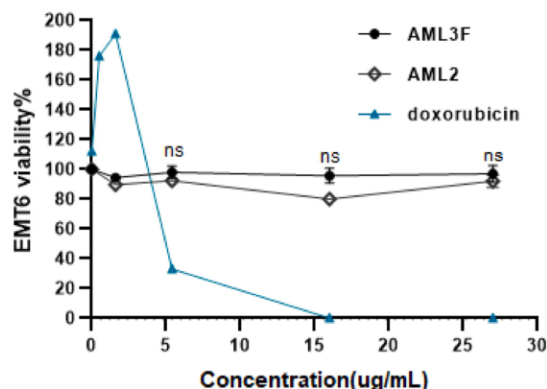


Fig. 2. Effect of AML3F and AML2 cell-free supernatant (CFS) and doxorubicin at different concentrations on EMT6 viability using XTT assay. The EMT6 cells were pretreated with CFS at different concentrations (0–27 µg/mL). Doxorubicin was used as a positive control. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM, (n=3) ns: not significant versus negative control (one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test).

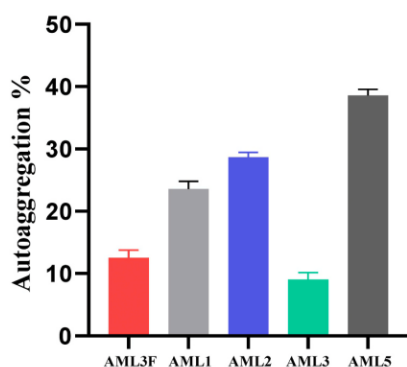


Fig. 3. Ability of *Lactiplantibacillus* sp. strains to auto-aggregation. The results were expressed as a mean of three replicates  $\pm$  SD ( $p < 0.01$ ).

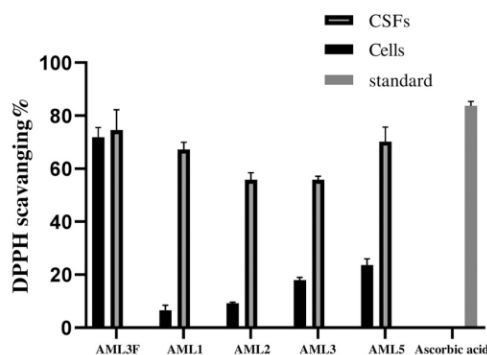


Fig. 4. DPPH free radical scavenging capacity of the *Lactiplantibacillus* sp. strains (expressed as a %  $\pm$  SD). CFSs: Cell-free supernatants.

(<92 %) suggests the possibility to be a novel species. A similar scenario could apply to AML5 and AML2 since their identity percentages (97.96 % and 98.10 %, respectively) fall below the currently accepted 16 S rRNA gene threshold for species delineation (98.65 %) [40]. To firmly establish these strains as potential representatives of new species within the *Lactiplantibacillus* genus, comprehensive polyphasic and genomic investigations are required. These investigations should involve precise genome-to-genome distance calculations, such as digital DNA-DNA hybridization (dDDH) and average nucleotide identity (ANI) [41]. For a strain to be accepted as a probiotic it must fulfill some criteria and the most important ones that related to its safety. For this, hemolysis, antibiotic resistance and cytotoxicity were investigated. Regarding their hemolytic activity, all *Lactiplantibacillus* sp. strains were found to lack hemolytic activity, confirming their non-hazardous nature in living organisms [42]. These findings are consistent with observations that *L. plantarum* strains generally do not exhibit hemolytic activity [43]. Similarly, the cytotoxicity effect of two LAB strains (AML3F and AML2) supernatant was assessed on two human cell lines (NIT-1 and EMT6). The cell-free supernatant of the strains did not exhibit cytotoxic effect on pancreatic beta-cell lines (NIT-1). These findings indicate that these strains are safe and could be employed as food and feed additives. A study by Arrijo-Bretón et al. [44] found no toxicity to human macrophages from *L. plantarum* cell-free supernatant (CFS) of NRRL B-4496 cell line. Another study found an exopolysaccharide from *L. plantarum* RJF4 that was found to be non-toxic to the rat myoblast L6 cell line [45], suggesting potential use of these strains in food additives or therapeutics. Since it is also crucial that probiotic strains do not possess any transferable forms of antibiotic resistance, we tested the five strains to assess their antibiotic susceptibility profiles. The strains seemed to be sensitive to almost all tested antibiotics with resistance to penicillin and amoxicillin, the two of them belongs to beta-lactam antibiotic class. Because of the lack of peptidoglycan in LAB cells [39], these findings indicate that LAB is not sensitive to the beta-lactam antibiotic class. The rising pressure created by the widespread use of antibiotics in veterinary care is almost probably contributing to the spread of resistance into gut bacteria [46]. In their study, Shazali et al. [39], isolated *L. plantarum* and *L. pentosus* strains, from Malaysian broiler chicken feces, and found them to be susceptible to erythromycin, tetracyclin, and ampicillin. However, the minor variations observed in our study may be attributed to differences in strains and species and the antibiotics used in the veterinary treatments. The irresponsible use of antibiotics in animal feed, for both therapeutic and growth-promoting purposes, has contributed to the emergence of antibiotic-resistant LAB. This practice could potentially lead to the development of a reservoir of antibiotic-resistant bacteria within the digestive system. Recent findings underscore the necessity of testing potential LAB strains for antibiotic resistance when considering them as additives in animal feed [39]. Once their safety established, their functional attributes were determined. As an indirect screening method to evaluate and select probiotic bacteria with high adhesion capacity to the human intestinal mucosa, an auto-aggregation assay was employed. All of the strains demonstrated the ability to self-aggregate after 3 h. When compared to the findings of Compana et al. [33], who assessed the auto-aggregation ability of seven probiotic LAB strains isolated from commercial probiotic products (maximum 21.37 % after 6 h), our strains displayed better auto-aggregative properties (23–38 %). To assess the antioxidant activity of the strains, the hydrogen ion donation method is commonly employed [47]. The cell-free culture supernatants demonstrated superior radical scavenging efficacy compared to the cells. The results were comparable to using ascorbic acid. Based on these findings, it is hypothesized that excreted metabolites produced by *Lactiplantibacillus* sp. strains are responsible for their ability to scavenge DPPH radicals. In the primary antioxidative screening, the bacterial cells showed limited activity under measurement settings, without oxidative stress to induce antioxidative defense mechanisms. Our results suggest that their DPPH scavenging capacity is modest compared to L-ascorbic acid, a potent antioxidant standard.

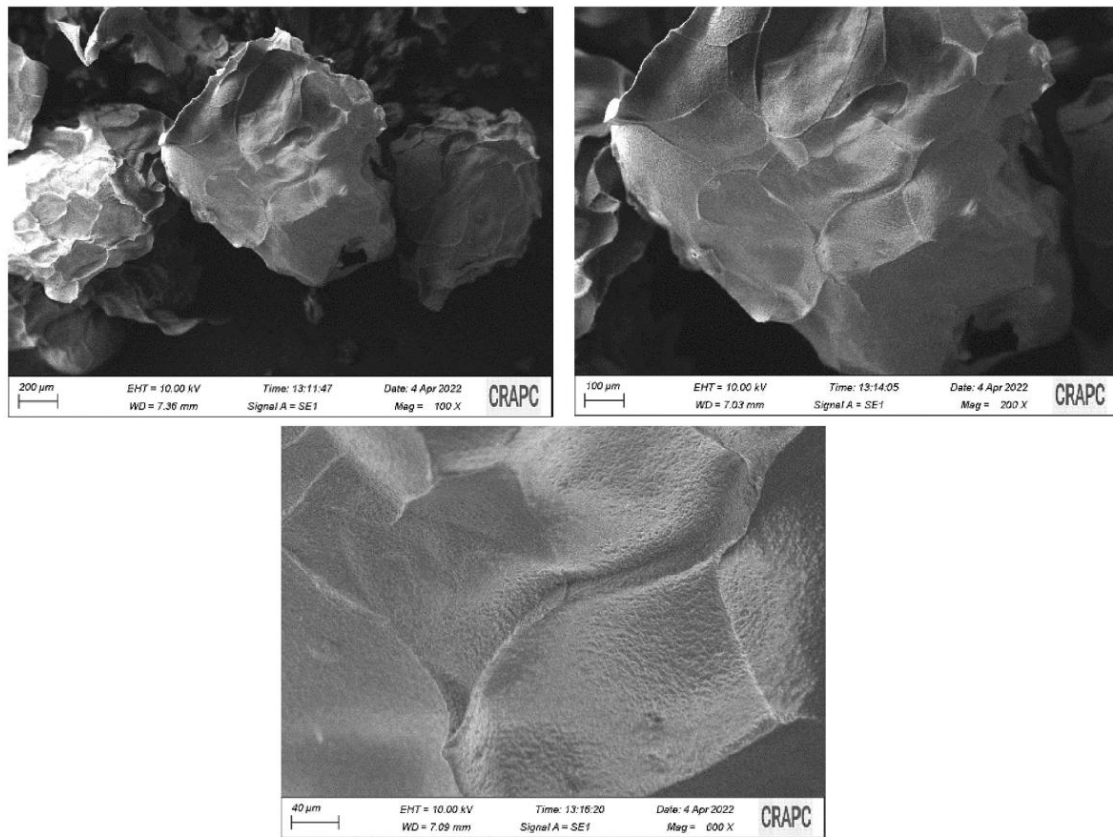


Fig. 5. Scanning electron micrographs of the cell-containing lyophilized calcium alginate beads. Magnification X100, X200, and X600 respectively.

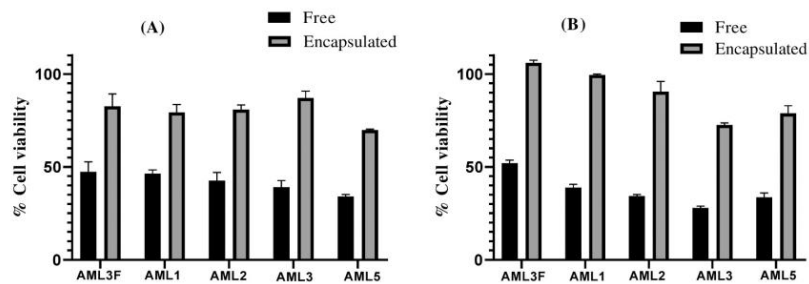


Fig. 6. Effect of gastric (A) and intestinal (B) juices on the viability of free and encapsulated *Lactiplantibacillus* sp. strains expressed as a  $\pm$  SD of three separate experiments.

Notably, unlike isolated *L. plantarum* AML1, AML2, AML3, AML5, the medium fraction of *L. plantarum* KO9 isolated from equid milk removed the same (statistically negligible) amount of radicals as whole cells [48]. Some LAB strains produce metabolites with excellent DPPH radical scavenging capabilities, as shown by Ji et al. [49]. It is well known that acid tolerance in the GIT is a fundamental trait for a probiotic strain when delivered orally. Indeed, for its application in broiler chicken feed, the probiotic must survive the proventriculus, gizzard, and upper intestine before reaching the distal end of the gastrointestinal system, where it may exert its probiotic effects. The pH in the GIT of poultry can

range from 2.5 to 4.5, and the time spent in digestion can vary from half an h to three hs [50]. Although acid tolerance is strain dependent, probiotics' viability is significantly hindered by the acidic environment in gastric juice [51]. Moreover, thermal stress and osmotic shock can damage probiotics' integrity during long-term storage and the drying process, causing dehydration and impaired cell functions, particularly in manufacturing processes like drying and pasteurization [52]. So, to ensure the probiotics' survival through manufacture process, storage and the digestion, encapsulation seem to be a promising solution. As reported by Ozyurt and Otles [53], probiotics require encapsulation

because they are sensitive and can be destroyed by factors such as exposure to air, moisture, temperature, stomach pH, and bile salt solutions. In this study, in order to improve the survival of isolated strains during passage through GIT and in perspective to include them in animal feed, encapsulation in calcium alginate by extrusion was performed. Entrapment in calcium alginate beads has frequently been utilized to immobilize LAB [54, 55]. Alginate has the advantage of being non-toxic, recognized as food additive and used in biomedical applications [56]. Another advantage of calcium alginate encapsulation is its reversibility, which involves solubilizing alginate gel by sequestering calcium ions and potentially releasing encapsulated cells in the human or animal colon [57]. Scanning electron micrographs of the obtained alginate beads showed a wrinkly appearance, which could be explained by the water vaporizing from the hydrogel matrix, as reported by Yeung et al. [58]. Following exposure to simulated gastric juice, the viable bacterial counts of the free cells were much lower than those of the encapsulated ones. According to Mitropoulou et al. [59], this is because encapsulation provides protection against the stomach's low pH. Our study supported the hypothesis that alginate beads can protect bacteria from acidic environments [60,61]. However, it was reported that enclosing bacteria in alginate beads may not provide sufficient protection from extreme acidity [62]. The duodenum, the digestive organ following the stomach, presents an additional challenge due to the presence of bile salts [63]. Notably, all the five studied strains were resistant to bile concentrations of 0.5 %, with losses ranging from 48 % to 70 % after 2 h of exposure. Bile salt may be harmful to probiotic cell membranes [64]. After 2 h of simulated intestinal juice incubation, free LAB were shown to be less viable than encapsulated ones. The increased survivability of encapsulated bacteria has revealed the beneficial effect of alginate encapsulation on bile salt. The results are consistent with Trabelsi et al. [65], who found that encapsulating *L. plantarum* TN8 with calcium alginate and chitosan increased their survivability in bile salt conditions significantly more than free bacteria.

## 5. Conclusions

The isolated *Lactiplantibacillus* strains from broiler chicken's feces demonstrated promising probiotic characteristics, making them potential candidates for improving the health and well-being of broiler chickens. Their non-hemolytic activity, non-cytotoxicity, lack of antibiotic resistance, acid and bile tolerance, auto-aggregation, antibacterial activity, and ability to scavenge free radicals suggest their suitability as probiotics. Additionally, their encapsulation in alginate beads was efficient in enhancing their survival in the GIT, making it a valuable method to formulate additives for poultry feed. However, further research, including genomic and polyphasic analyses, is warranted to confirm their taxonomic status and novel species potential. These findings contribute to the growing body of knowledge regarding probiotic LAB and their applications in poultry nutrition and health management.

## Funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## CRediT authorship contribution statement

**Farida Bendali:** Writing – review & editing, Validation, Project administration, Data curation, Conceptualization. **Ali Aksas:** Visualization, Validation, Supervision. **Riadh Ben Salah:** Project administration, Conceptualization. **Hadj Ahmed Belaouni:** Methodology, Formal analysis, Data curation. **Widad Sobhi:** Writing – review & editing, Methodology. **Abdelmalek Rezgui:** Methodology. **Samia Hamma-Faradji:** Validation, Supervision, Resources, Project administration, Conceptualization. **Manel Seboui:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest

## Acknowledgements

We are grateful for the support from: Direction Générale de la Recherche Scientifique et du Développement Technologique (DGRSDT), Algeria and CRBT-Constantine staff, particularly those in the cell culture laboratory. We would like to also acknowledge the farmers who helped us in chicken's feces sampling.

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.cimid.2024.102213.

## References

- [1] A. Braune, M. Blaut, Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut, *Gut Microbes* 7 (2016) 216–234, <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>.
- [2] F.P. Douillard, W.M. de Vos, Biotechnology of health-promoting bacteria, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 107369 <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.008>.
- [3] L. Liu, L. Li, C. Li, H. Wang, X. Zhang, Q. Ren, H. Zhang, N. Jin, C. Li, C. Zhao, Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* LPJZ-658 supplementation on the production, meat quality, intestinal morphology, and cecal microbiota of broilers chickens, *Microorganisms* 11 (2023) 1–16, <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061549>.
- [4] L. Serwecinska, Antimicrobials and antibiotic-resistant bacteria: a risk to the environment and to public health, *Water* 12 (2020) 3313–3330, <https://doi.org/10.3390/w12123313>.
- [5] C. Manyi-Loh, S. Mamphweli, E. Meyer, A. Okoh, Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: potential public health implications, *Molecules* 23 (2018) 795, <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>.
- [6] M. Kechagia, D. Basoulis, S. Konstantopoulou, D. Dimitriadi, K. Gyftopoulou, N. Skarmoutsou, E.M. Fakiri, Health benefits of probiotics: a review, *ISRN Nutr.* (2013) 481651, <https://doi.org/10.5402/2013/481651>.
- [7] G. Cheng, H. Hao, S. Xie, X. Wang, M. Dai, L. Huang, Z. Yuan, Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5 (2014) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217>.
- [8] M. Vijayakumar, S. Ilavenil, D.H. Kim, M.V. Arasu, K. Priya, K.C. Choi, *In-vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian rye-grass (*Lolium multiflorum*) forage, *Anaerobe* 32 (2015) 90–97, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.01.003>.
- [9] A. Abdelazez, H. Abdelmotaal, Z.-T. Zhu, J. Fang-Fang, R. Sami, L.-J. Zhang, Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review, *Adv. Environ. Biol.* 12 (2018), <https://doi.org/10.22587/aeb.2018.12.1.4>.
- [10] A. Chaubey, K.K. Pande, V.S. Singh, B.D. Malhotra, Co-immobilization of lactate oxidase and lactate dehydrogenase on conducting polyaniline films, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 97–103, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00797-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00797-7).
- [11] Y. Nami, N. Abdullah, B. Haghsheenas, D. Radiah, R. Rosli, A.Y. Khosroushahi, Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL, *Microbiol. Immunol.* 58 (2014) 492–502, <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12175>.
- [12] A.C. Ouwehand, P.V. Kirjavainen, C. Shortt, S. Salminen, Probiotics: mechanisms and established effects, *Int. Dairy J.* 9 (1999) 43–52, [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(99\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00043-6).
- [13] H.Ait Seddik, F. Bendali, F. Gancel, I. Fliss, G. Spano, D. Drider, *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities, *Probiotics Antimicro. Prot.* (2017) <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9264-z>.
- [14] D.A. Qasim, I.J. Lafta, O.A. Lyiola, Antibacterial activity of *Lactiplantibacillus plantarum* from dairy products against some foodborne bacteria, *Iraqi J. Vet. Med.* 47 (2023) 44–51, <https://doi.org/10.30539/ijvm.v47i1.1500>.
- [15] H. Liu, M. Xie, S. Nie, Recent trends and applications of polysaccharides for microencapsulation of probiotics, *Food Front* 1 (2020) 45–59, <https://doi.org/10.1002/fft2.11>.
- [16] A.V. Rao, N. Shivanarain, I. Maharaj, Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices, *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 22 (1989) 345–349, [https://doi.org/10.1016/s0315-5463\(89\)70426-0](https://doi.org/10.1016/s0315-5463(89)70426-0).
- [17] K. Marchwińska, D. Gwiazdowska, Isolation and probiotic potential of lactic acid bacteria from swine feces for feed additive composition, *Arch. Microbiol.* 204 (2022) 1–21, <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02700-0>.
- [18] I.M. Saracino, M. Pavoni, L. Saccomanno, G. Fiorini, V. Pesci, C. Foschi, G. Piccirilli, G. Bernardini, J. Holton, N. Figura, T. Lazzarotto, C. Borghi, B. Vaira, Antimicrobial efficacy of five probiotic strains against *Helicobacter pylori*, *Antibiotics* 9 (2020) 1–10, <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050244>.

- [19] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol. Biol. Evol.* 33 (2016) 1870–1874, <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSW054>.
- [20] R.C. Edgar, MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 1792–1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- [21] M.A. Kimura, A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Evol.* 16 (1980) 111–120, <https://doi.org/10.1007/BF01731581>.
- [22] I. Letunic, P. Bork, Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments, *Nucleic Acids Res* 47 (2019) 256–259, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- [23] A.W. Bauer, W.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Pathol.* 45 (1966) 493–496, <https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4.ts.493>.
- [24] E. Kiray, S.Y. Azarkan, E. Kariptas, Antiproliferative effect of *Lactobacillus plantarum* L4 strain isolated from cervicovaginal microflora on the HeLa cancer cell line, *J. Ist. Fac. Med.* 85 (2022) 67–76, <https://doi.org/10.26650/IUITFD.915299>.
- [25] L.M. Jost, J.M. Kirkwood, T.L. Whiteside, Improved short- and long-term XTT-based colorimetric cellular cytotoxicity assay for melanoma and other tumor cells, *J. Immunol. Methods* 147 (1992) 153–165, [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(12\)80003-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(12)80003-2).
- [26] A. Rezgoui, A.C. Mitaine-Offier, D. Pertuit, T. Miyamoto, C. Tanaka, S. Delemasure, P. Dutartre, M.A. Lacaille-Dubois, Steroidal saponins from *Dracaena marginata*, *Nat. Prod. Commun.* 8 (2013) 157–160, <https://doi.org/10.1177/1934578x1300800205>.
- [27] B. Kos, J. Susković, S. Vuković, M. Simpraga, J. Frece, S. Matosić, Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92, *J. Appl. Microbiol.* 94 (2003) 981–987, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01915.x>.
- [28] D. Kostelac, M. Gerić, G. Gajski, K. Markov, A.M. Domijan, I. Čanak, Z. Jakopović, I.K. Svetec, B. Zunar, J. Frece, Lactic acid bacteria isolated from equid milk and their extracellular metabolites show great probiotic properties and anti-inflammatory potential, *Int. Dairy J.* 112 (2021) 104828, <https://doi.org/10.1016/j.idairy.2020.104828>.
- [29] F. Lotfipour, S. Mirzaei, M. Maghsoudi, Evaluation of the effect of CaCl<sub>2</sub> and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis, *Adv. Pharm. Bull.* 2 (2012) 71–78, <https://doi.org/10.5681/apb.2012.010>.
- [30] R.R. da Silva, Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 183 (2017) 1–19, <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2427-2>.
- [31] E. Both, Z. Bodor, B. Albert, Effect of microencapsulation on viability and survival in simulated gut conditions of probiotic bacteria, *Rom. Biotechnol. Lett.* 23 (2018) 14140–14145, <https://doi.org/10.26327/RBL2018.227>.
- [32] M. Scillato, A. Spitalé, G. Mongelli, G.F. Privitera, K. Mangano, A. Cianci, S. Stefani, M. Santagati, Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens, *MicrobiologyOpen* 10 (2021) 1–16, <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>.
- [33] R. Campana, S. Van Hemert, W. Baffone, Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion, *Gut Pathog.* 9 (1) (2017) 12, <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>.
- [34] I. Al Kassaa, S. Mechemchani, M. Zaylaa, M.B. Ismail, K. El Omari, F. Dabboussi, M. Hamze, Characterization of lactobacilli strains from baby's feces for their potential immunobiotic application, *Iran. J. Microbiol.* 11 (2019) 379–388.
- [35] C. Ghezzi, P. Russo, M.P. Arena, G. Spano, H.I. Ozari, O. Kheroua, D. Saidi, D. Fiocco, H. Kaddouri, V. Capozzi, Evaluating the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains from Algerian infant feces: towards the design of probiotic strater cultures tailored for developing countries, *Probiotics Antimicrob. Proteins* 11 (2019) 113–123, <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9396-9>.
- [36] N. Jomehzadeh, H. Javaherizadeh, M. Amin, M. Rashno, A. Teimoori, Quantification of intestinal *Lactobacillus* species in children with functional constipation by quantitative real-time PCR, *Clin. Exp. Gastroenterol.* 13 (2020) 141–150, <https://doi.org/10.2147/CEG.S250755>.
- [37] E. Parente, A. Ricciardi, Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999) 628–638, <https://doi.org/10.1007/s002530051570>.
- [38] M.J. Gilchrist, C. Greko, D.B. Wallinga, G.W. Beran, D.G. Riley, P.S. Thorne, The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance, *EHP* 115 (2007) 313–316, <https://doi.org/10.1289/ehp.8837>.
- [39] N. Shazali, H.L. Foo, T.C. Loh, D.W. Choe, R. Abdul Rahim, Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia, *Gut Pathog.* 6 (2014) 1–7, <https://doi.org/10.1186/1757-4749-6-1>.
- [40] M. Kim, H. Oh, S.C. Park, J. Chun, Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64 (2014) 346–351, <https://doi.org/10.1099/ijs.0.059774-0>.
- [41] J.P. Meier-Kolthoff, A.F. Auch, H.P. Klenk, M. Göker, Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions, *BMC Bioinf.* 14 (2013) 60, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>.
- [42] FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines in the Evaluation of Probiotics in Food, London Ontario, Canada. (2002) 35–45. [www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotics\\_guidelines](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotics_guidelines) (accessed 06/06/2024).
- [43] A. Sharma, M. Lavania, R. Singh, B. Lal, Identification and probiotic potential of lactic acid bacteria from camel milk, *Saudi J. Biol. Sci.* 28 (2021) 1622–1632, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.062>.
- [44] D. Arrijoja-Bretón, E. Mani-López, H. Bach, A. López-Malo, Antimicrobial activity of protein-containing fractions isolated from *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 culture, *Braz. J. Microbiol.* 51 (2020) 1289–1296, <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00266-5>.
- [45] S.V. Dilna, H. Surya, R.G. Aswathy, K.K. Varsha, D.N. Sakthikumar, A. Pandey, K. M. Nampoothiri, Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4, *LWT* 64 (2015) 1179–1186, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>.
- [46] Y. M. Álvarez-Cisneros, E. Ponce-Alquicira, Antibiotic resistance in lactic acid bacteria, in: Y. Kumar (Ed.), *Antimicrobial resistance: A global threat*, IntechOpen, Rijeka, 2019, pp. 53–73, <https://doi.org/10.5772/intechopen.80624>.
- [47] X. Yang, L. Li, Y. Duan, X. Yang, Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* JM113 *in vitro* and its protective effect on broiler chickens challenged with deoxynivalenol, *J. Anim. Sci.* 95 (2017) 837–846, <https://doi.org/10.2527/jas2016.0789>.
- [48] S. Li, Y. Zhao, L. Zhang, X. Zhang, L. Huang, D. Li, C. Niu, Z. Yang, Q. Wang, Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditional Chinese fermented foods, *Food Chem.* 135 (2012) 1914–1919, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.048>.
- [49] K. Ji, N.Y. Jang, Y.T. Kim, Isolation of lactic acid bacteria showing antioxidative and probiotic activities from kimchi and infant feces, *J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (2015) 1568–1577, <https://doi.org/10.4014/jmb.1501.01077>.
- [50] R. Ben Salah, I. Trabelsi, R. Ben Mansour, S. Lassoued, H. Chouayekh, S.A. Bejar, New *Lactobacillus plantarum* strain, TNS, from the gastro intestinal tract of poultry induces high cytokine production, *Anaerobe* 18 (2012) 436–444, <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.05.001>.
- [51] Z. Hashim, D.J. Dailin, D.N.A. Zaidel, A.H.M. Yusof, E. Salleh, Y.M.M. Jusoh, N. Pa'e, I.I. Muhamad, S. Selvamani, T. Ho, H. El Enshasy, Probiotics application in poultry industry: from feed to meat, *Bios. Res.* 18 (2021) 496–514.
- [52] P. Burns, F. Patrignani, D. Serrazanetti, G.C. Vinderola, J.A. Reinheimer, R. Lanciotti, M.E. Guerzoni, Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk, *J. Dairy Sci.* 91 (2008) 500–512, <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0516>.
- [53] V.H. Ozyurt, S. Otles, Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food, *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 13 (2014) 413–424, <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2014.4.8>.
- [54] K.Y. Lee, T.R. Heo, Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in Calcium Alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution, *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (2000) 869–873, <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.869-873.2000>.
- [55] I. Garbayo, C. Vilchez, J.M. Vega, J.E. Nava-Saucedo, J.N. Barbotin, Influence of immobilization parameters on growth and lactic acid production by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* co-immobilized in Calcium Alginate gel beads, *Biotechnol. Lett.* 26 (2004) 1825–1827, <https://doi.org/10.1007/s10529-004-5134-3>.
- [56] R.G. Puscaselu, A. Lobiuc, M. Dimian, M. Covasa, Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders, *Polymers* 12 (2020) 2417, <https://doi.org/10.3390/polym12102417>.
- [57] X.Y. Li, X.G. Chen, Z.W. Sun, H.J. Park, D.S. Cha, Preparation of Alginate/Chitosan/Carboxymethyl Chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1479–1485, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.09.053>.
- [58] T.W. Yeung, L.J. Arroyo-Maya, D.J. McClements, D.A. Sela, Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: enhancing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads, *Food Func.* 7 (2016) 1797–1804, <https://doi.org/10.1039/c5fo00801h>.
- [59] G. Mitropoulou, V. Nedovic, A. Goyal, Y. Kourkoutas, Immobilization technologies in probiotic food production, *J. Nutr. Metab.* (2013), <https://doi.org/10.1155/2013/716861>.
- [60] M.A. Khosravi Zanjani, B. Ghiassi Tarzi, A. Sharifan, N. Mohammadi, Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition, *Iran. J. Pharm. Res.* 13 (2014) 843–852.
- [61] K. Sultana, G. Godward, N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris, K. Kailasapathy, Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt, *Int. J. Food Microbiol.* 62 (2000) 47–55, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00380-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00380-9).
- [62] K. Papadimitriou, A. Alegría, P.Á. Bron, M. de Angelis, M. Gobetti, M. Kleerebezem, J.A. Lemos, D.M. Linares, P. Ross, C. Stanton, F. Turróni, D. van Sinderen, P. Varmanan, M. Ventura, M. Zúñiga, E. Tsakalidou, J. Kok, Stress physiology of lactic acid bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80 (2016) 837–890, <https://doi.org/10.1128/mbr.00076-15>.
- [63] A. Abedin-Do, Z. Taherian-Esfahani, S. Ghafouri-Fard, S. Ghafouri-Fard, E. Motevaseli, Immunomodulatory effects of *Lactobacillus* strains: emphasis on their effects on cancer cells, *Immunotherapy* 7 (2015) 1307–1329, <https://doi.org/10.2217/imt.15.92>.
- [64] J.T. Lai, K.W. Lai, L.Y. Zhu, K.L. Niam, L.P. Pui, Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 299v and its storage in kuni juice, *Malays. J. Microbiol.* 16 (2020) 235–244, <https://doi.org/10.21161/mjm.190398>.
- [65] I. Trabelsi, W. Bejar, D. Ayadi, H. Chouayekh, R. Kammoun, S. Bejar, R. Ben Salah, Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of

## Résumé

Les souches de *Lactiplantibacillus*, appartenant aux bactéries lactiques, représentent un groupe de probiotiques largement étudié et prometteur, offrant divers avantages potentiels pour la santé. Dans cette étude, cinq souches isolées de poulet de chair ont été sélectionnées en raison de leur activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes. Ces souches ont été identifiées comme appartenant aux espèces de *Lactiplantibacillus* grâce au séquençage de l'ARN 16S. Après avoir vérifié leur innocuité (absence de cytotoxicité et d'hémolyse), nous avons mis en évidence leurs propriétés probiotiques, telles que l'auto-agrégation, l'adhésion au polystyrène, ainsi que leurs activités antioxydante et antibactérienne. Ces souches ont montré des taux variables d'adhésion aux plaques de polystyrène. Ainsi, une bonne tolérance au phénol a été observée. L'encapsulation de ces souches dans des billes d'alginate a amélioré leur survie par rapport aux cellules libres, dans les jus gastriques (69–87 % contre 34–47 %) et intestinaux (72–100 % contre 27–51 %), après une exposition de 120 minutes. De plus, tous les isolats de *L. plantarum* ont une activité antifongique vis-à-vis le *Fusarium graminearum*. Ces résultats indiquent que les souches encapsulées de *Lactiplantibacillus* pourraient être envisagées comme additifs alimentaires pour les poulets de chair. Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leur potentiel probiotique in vivo.

**Mots clés :** Poulets de chair, Probiotiques, *Lactiplantibacillus plantarum*, Encapsulation, Alginate.

## **Abstract**

*Lactiplantibacillus* strains, belonging to the lactic acid bacteria, represent a widely studied and promising group of probiotics, offering various potential health benefits. In this study, five strains isolated from broiler's feces were evaluated their probiotic properties due to their antibacterial activity against pathogenic bacteria. These strains were identified as *Lactiplantibacillus* species using 16S RNA sequencing. After verifying their safety (absence of cytotoxicity and hemolysis), we highlighted their probiotic properties, such as auto-aggregation, adhesion to polystyrene, as well as their antioxidant and antibacterial activities. These strains showed variable rates of adhesion to polystyrene plates. Thus, a good tolerance to phenol was observed. Encapsulation of these strains in alginate beads improved their survival compared to free cells in gastric (69–87% vs. 34–47%) and intestinal (72–100% vs. 27–51%) juices after 120 min exposure. In addition, all *Lb. plantarum* isolates had antifungal activity against *Fusarium graminearum*. These results indicate that encapsulated *Lactiplantibacillus* strains could be considered as feed additives for broilers. However, further research is needed to evaluate their probiotic potential in vivo.

**Keywords:** Broiler, Probiotics, *Lactiplantibacillus plantarum*, Encapsulation, Alginate.

## ملخص

سلالات *Lactiplantibacillus*، التي تنتمي إلى البكتيريا اللبنية، تمثل مجموعة من البروبيوتيك التي تم دراستها على نطاق واسع وتُعد واعدة، حيث تقدم فوائد صحية محتملة متنوعة. في هذه الدراسة، تم اختيار خمس سلالات معزولة من عينات براز دجاج اللحم لإجراء تحليلات أكثر تفصيلاً بسبب نشاطها المضاد للبكتيريا ضد البكتيريا المسببة للأمراض. تم تحديد هذه السلالات على أنها تنتمي إلى أنواع *Lactiplantibacillus* بفضل تسلسل الحمض النووي الريبوزي 16S. بعد التحقق من سلامتها (عدم وجود سمية خلوية أو انحلال كريات الدم الحمراء)، قمنا بتسليط الضوء على خصائصها البروبيوتية، مثل التكتل الذاتي، والالتصاق بالبوليسيتيرين، فضلاً عن نشاطها المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا. أظهرت هذه السلالات معدلات متباينة من الالتصاق بالواح البوليسيتيرين، كما لوحظ تحمل جيد للفينول. أدى تغليف هذه السلالات في حبات الجينات إلى تحسين بقائها مقارنة بالخلايا الحرة، في العصارات المعدية (69-87% مقابل 34-47%) والعصارات المعوية (72-100% مقابل 27-51%)، بعد تعرضها لمدة 120 دقيقة. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع سلالات *Lb.plantarum* نشاطاً مضاداً للفطريات تجاه *Fusarium graminearum*. تشير هذه النتائج إلى أن السلالات المغلفة من *Lactiplantibacillus* قد تُعتبر إضافات غذائية لدجاج التسمين. ومع ذلك، هناك حاجة لمزيد من الأبحاث لتقييم إمكاناتها البروبيوتية.

**الكلمات المفتاحية:** دجاج التسمين، البروبيوتيك، *Lactiplantibacillus plantarum*، التغليف، Alginate.

## Résumé

Les souches de *Lactiplantibacillus*, appartenant aux bactéries lactiques, représentent un groupe de probiotiques largement étudié et prometteur, offrant divers avantages potentiels pour la santé. Dans cette étude, cinq souches isolées des feces de poulet de chair ont été sélectionnées en raison de leur activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes. Ces souches ont été identifiées comme appartenant aux espèces de *Lactiplantibacillus* grâce au séquençage de l'ARN 16S. Après avoir vérifié leur innocuité (absence de cytotoxicité et d'hémolyse), nous avons mis en évidence leurs propriétés probiotiques, telles que l'auto-agrégation, l'adhésion au polystyrène, ainsi que leurs activités antioxydante et antibactérienne. Ces souches ont montré des taux variables d'adhésion aux plaques de polystyrène. Ainsi, une bonne tolérance au phénol a été observée. L'encapsulation de ces souches dans des billes d'alginate a amélioré leur survie par rapport aux cellules libres, dans les jus gastriques (69–87 % contre 34–47 %) et intestinaux (72–100 % contre 27–51 %), après une exposition de 120 minutes. De plus, tous les isolats de *Lb. plantarum* ont une activité antifongique vis-à-vis le *Fusarium graminearum*. Ces résultats indiquent que les souches encapsulées de *Lactiplantibacillus* pourraient être envisagées comme additifs alimentaires pour les poulets de chair. Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour évaluer leur potentiel probiotique in vivo.

**Mots clés :** Poulets de chair, Probiotiques, *Lactiplantibacillus plantarum*, Encapsulation, Alginate.

## Abstract

*Lactiplantibacillus* strains, belonging to the lactic acid bacteria, represent a widely studied and promising group of probiotics, offering various potential health benefits. In this study, five strains isolated from poultry feces were selected due to their antibacterial activity against pathogenic bacteria. These strains were identified as *Lactiplantibacillus* species using 16S RNA sequencing. After verifying their safety (absence of cytotoxicity and hemolysis), we highlighted their probiotic properties, such as auto-aggregation, adhesion to polystyrene, as well as their antioxidant and antibacterial activities. These strains showed variable rates of adhesion to polystyrene plates. Thus, a good tolerance to phenol was observed. Encapsulation of these strains in alginate beads improved their survival compared to free cells in gastric (69–87% vs. 34–47%) and intestinal (72–100% vs. 27–51%) juices after 120 min exposure. In addition, all *Lb. plantarum* isolates had antifungal activity against *Fusarium graminearum*. These results indicate that encapsulated *Lactiplantibacillus* strains could be considered as feed additives for broilers. However, further research is needed to evaluate their probiotic potential in vivo.

**Keywords:** Broiler, Probiotics, *Lactiplantibacillus plantarum*, Encapsulation, Alginate.

## ملخص

سلالات *Lactiplantibacillus*، التي تنتمي إلى البكتيريا اللبنية، تمثل مجموعة من البروبيوتيك التي تم دراستها على نطاق واسع وتعد واعدة، حيث تقدم فوائد صحية محتملة متنوعة. في هذه الدراسة، تم اختيار خمس سلالات معزولة من عينات براز دجاج اللحم لإجراء تحليلات أكثر تفصيلاً بسبب نشاطها المضاد للبكتيريا ضد البكتيريا المسببة للأمراض. تم تحديد هذه السلالات على أنها تنتمي إلى أنواع اللاكتوبلانتيباسيلوس بفضل تسلسل الحمض النووي الريبي 16S. بعد التحقق من سلامتها (عدم وجود سمية خلوية أو انحلال كريات الدم الحمراء)، قمنا بتسليط الضوء على خصائصها البروبيوتية، مثل التكتل الذاتي، والالتصاق بالبوليستيرين، فضلاً عن نشاطها المضاد للأكسدة والمضاد للبكتيريا. أظهرت هذه السلالات معدلات متباينة من الالتصاق بالوواح البوليستيرين، كما لوحظ تحمل جيد للفينول. أدى تغليف هذه السلالات في حبات الجينات إلى تحسين بقائها مقارنة بالخلايا الحرة، في العصارات المعدية (69-87% مقابل 34-47%) والعصارات المعوية (72-100% مقابل 27-51%)، بعد تعرضها لمدة 120 دقيقة. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت جميع سلالات *Lb. plantarum* نشاطاً مضاداً للفطريات تجاه *Fusarium graminearum*. تشير هذه النتائج إلى أن السلالات المغلفة من *Lactiplantibacillus* قد تُعتبر إضافات غذائية لدجاج التسمين. ومع ذلك، هناك حاجة لمزيد من الأبحاث لتقييم إمكاناتها البروبيوتية.

**الكلمات المفتاحية:** دجاج التسمين، البروبيوتيك، *Lactiplantibacillus plantarum*، التغليف، Alginate.