



HAL
open science

Nouveaux candidats probiotiques fibrolytiques du genre *Bacillus* : propriétés enzymatiques, innocuité et modulation de microbiotes intestinaux "obèses" en modèle *in vitro*

Serigne Inssa Ngom

► To cite this version:

Serigne Inssa Ngom. Nouveaux candidats probiotiques fibrolytiques du genre *Bacillus* : propriétés enzymatiques, innocuité et modulation de microbiotes intestinaux "obèses" en modèle *in vitro*. Bactériologie. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASQ009 . tel-04428365

HAL Id: tel-04428365

<https://hal.science/tel-04428365>

Submitted on 18 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Nouveaux candidats probiotiques fibrolytiques du genre *Bacillus* : propriétés enzymatiques, innocuité et modulation de microbiotes intestinaux "obèses" en modèle *in vitro*

New fibrolytic probiotic candidates of the genus Bacillus: enzymatic properties, safety, and modulation of obese gut microbiota using an in vitro model

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École Doctorale n°569, Innovation Thérapeutique : du Fondamental à l'Appliqué (ITFA),
Spécialité de doctorat : Microbiologie
Graduate School : Santé et médicaments. Référent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans l'UMR1319 MICALIS (Université Paris-Saclay, INRAE, Agroparistech) sous la direction de **Christel BERA-MAILLET**, Chargée de recherche

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 17 Mars 2023, par

Serigne Inssa NGOM

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Imad KANSAU Professeur, Université Paris-Saclay	Président
Karine CLEMENT PU-PH, INSERM, Sorbonne Université	Rapporteur & Examinatrice
Christophe CHASSARD Directeur de recherche, INRAE, Université de Clermont-Auvergne	Rapporteur & Examineur
Amandine EVERARD Professeure, WELBIO, Université Catholique de Louvain (Belgique)	Examinatrice
Benoit FOLIGNE Professeur, INSERM, Université de Lille	Examineur

Titre : Nouveaux candidats probiotiques fibrolytiques du genre *Bacillus* : propriétés enzymatiques, innocuité et modulation de microbiotes intestinaux "obèses" en modèle *in vitro*

Mots clés : *Bacillus*, microbiote intestinal, obésité, probiotiques, fibres végétales, glycoside hydrolases

Résumé : Des milliards de bactéries colonisent le tractus gastro-intestinal et entretiennent une relation symbiotique avec l'hôte. La perturbation de l'équilibre des interactions microbiote-hôte joue un rôle dans l'apparition de plusieurs maladies métaboliques. Parmi elles, l'obésité est reconnue comme une pandémie par l'OMS depuis 1997. Une diminution de la diversité et de la richesse des bactéries intestinales a été mise en évidence chez les personnes en situation d'obésité, pouvant être associée à un mauvais état de santé. Ainsi, plusieurs approches sont aujourd'hui proposées pour moduler le microbiote intestinal et restaurer l'homéostasie, parmi lesquelles l'utilisation de probiotiques pour prévenir ou traiter les maladies métaboliques telles que l'obésité.

Ce travail de thèse s'intéresse à cette problématique et a pour but de trouver de nouveaux probiotiques qui pourraient bénéficier à la santé humaine en agissant comme un levier sur la symbiose microbiote/hôte. Les objectifs de cette thèse se déclinent en deux grands volets. Dans une première partie, nous avons criblé plusieurs souches de *Bacillus* d'une collection de bactéries environnementales afin d'identifier une ou plusieurs souches probiotiques candidates possédant des fonctions fibrolytiques. Ces fonctions sont, en effet, associées aux espèces majeures du microbiote intestinal souvent appauvries chez un individu en situation d'obésité. Neuf souches de *Bacillus* ont été identifiées avec des activités hémicellulolytiques correspondant à celles impliquées dans la digestion des fibres alimentaires.

L'une d'entre elles, avec de multiples activités polysaccharidolytiques, a été choisie comme candidat probiotique. L'innocuité de la souche de *Bacillus* sélectionnée a été évaluée, conformément aux réglementations de l'EFSA, pour une utilisation potentielle en tant que probiotique.

Puis, dans une deuxième partie, nous avons développé un modèle *in vitro* de microbiote obèse pour étudier la capacité du candidat probiotique fibrolytique à moduler le microbiote intestinal à l'aide de cultures continues en fermenteurs. L'impact du candidat probiotique fibrolytique a été évalué à travers l'activité métabolique ainsi que la composition et la diversité du microbiote des personnes en situation d'obésité. Nos résultats ont révélé que l'utilisation d'une souche probiotique candidate de *Bacillus*, sélectionnée pour ses propriétés fibrolytiques, en combinaison avec un régime riche en fibres, augmentait significativement la production de butyrate *in vitro*, par rapport à l'apport en fibres alimentaires seul. La capacité des fibres végétales et du candidat probiotique *Bacillus* à rétablir l'équilibre des bactéries intestinales dans le contexte de l'obésité a également été caractérisée par l'abondance de membres bactériens dégradant les fibres et producteurs d'AGCC. Cette combinaison pourrait donc être une stratégie intéressante pour moduler la communauté microbienne des individus en situation d'obésité en stimulant sélectivement différents groupes microbiens.

Title: New fibrolytic probiotic candidates of the genus *Bacillus*: enzymatic properties, safety, and modulation of obese gut microbiota using an in-vitro model

Keywords: *Bacillus*, intestinal microbiota, obesity, probiotic, dietary fibres, glycoside hydrolases

Abstract: Trillions of bacteria colonize our gastrointestinal tract and maintain a symbiotic relationship with the host. Disturbance in the balance of intestinal microbiota-host interactions plays a role in the onset of several metabolic diseases. Obesity has been recognized as a pandemic by the WHO since 1997. A decrease in the diversity and richness of gut bacteria has been evidenced in obese people, associated with poor health and well-being. As a result, several approaches are now proposed to modulate the intestinal microbiota and restore homeostasis, among them the use of probiotics to prevent or treat metabolic syndromes such as obesity.

This thesis work focused on this issue. It aimed to find new probiotics that could benefit human health by acting as a lever on the microbiota/host symbiosis. The objectives of this thesis fall into two main areas. In the first part, we screened several *Bacillus* strains from a collection of environmental bacteria to identify one or more candidate probiotic strains with fibrolytic functions. These functions are indeed associated with the major species of intestinal microbiota often depleted in obese microbiota. Nine *Bacillus* strains were identified with hemicellulolytic activities corresponding to those involved in dietary fibres digestion, one of them with multiple polysaccharidolytic activities was chosen as a probiotic candidate.

The selected *Bacillus* strain has been evaluated for safety, according to EFSA regulations, for potential use as a probiotic.

Then, in the second part, we developed an *in vitro* model of obese microbiota to study the ability of the fibrolytic probiotic candidate to modulate the intestinal microbiota using continuous cultures in fermenters. The impact of the fibrolytic probiotic candidate was assessed through the metabolic activity as well as the composition and diversity of the microbiota of obese people. Our results revealed that the use of a candidate probiotic strain of *Bacillus*, selected for its fibrolytic properties, in combination with a high-fiber diet significantly increased butyrate production *in vitro*, compared to the dietary fiber intake alone. The ability of both plant fibers and the *Bacillus* probiotic candidate to restore the balance of intestinal bacteria in the context of obesity has also been characterized by the abundance of fiber-degrading and SCFA-producing bacterial members. This combination could therefore be a valuable strategy to modulate the microbial community of obese individuals by selectively stimulating different microbial groups.

“I don't know anything, but I do know that everything is interesting if you go into it deeply enough”

Richard Phillips Feynman, *The Pleasure of Finding Things Out*

Dédicaces

Je dédie ce travail,

A ma mère et à mon défunt père

En témoignage de l'amour profond que j'éprouve pour vous. Vous êtes ma source de motivation et d'inspiration. Aucun mot, aussi doux, aussi poignant soit-il ne pourrait refléter toute la reconnaissance que j'ai pour vous. Je ne vous remercierai jamais assez. Cette thèse est dédiée à la mémoire de mon défunt père, en reconnaissance de tout ce qu'il a fait pour moi et pour tout l'amour et l'encouragement qu'il m'a donné.

A mon frère et à mes sœurs

Vous êtes ce que j'ai de plus cher. Avec vous j'ai compris le sens de l'amour inconditionnel.

A mon défunt professeur Massamba Seck

Cher professeur, cher Massamba, je suis submergé par l'émotion en écrivant ces mots. Ton voyage inattendu vers l'au-delà a laissé en moi un grand vide. Tu as été un professeur pour moi, un ami, un grand frère et par-dessus tout une référence. J'espère que de l'outre-tombe tu me regardes et tu es fier de ce que je fais, de ce que je suis devenu. Repose en paix cher ami.

A Aaron Swartz

Pour une démocratisation concrète et complète de l'accès aux savoirs. Pour une science accessible !!!

Remerciements

Cette belle thèse fut d'abord une aventure humaine qui a débuté à Mpal (Saint-Louis, Sénégal), passant par différentes villes du Maroc jusqu'à Jouy-en-Josas. Cette aventure n'aurait pas été possible sans le concours de plusieurs personnes qui avec humanisme, et chacun à son niveau, m'ont aidé à traverser, à surmonter des obstacles. Je voudrais prendre le temps de les remercier. Je sais qu'il me sera difficile de trouver les mots justes pour exprimer toute cette reconnaissance et gratitude qui est mienne envers celles et ceux qui ont participé à ma formation, et ont semé le grain de l'amour de la science dans mon cœur. Je voudrais d'abord ici remercier mes Maîtres, Maîtresses et Professeurs, catalyseurs de ma curiosité, quelle soit scientifique ou littéraire, et de ma soif de savoir.

Je voudrais également remercier, Pr Imad Kansau, Pr Karine Clément, Dr Christophe Chassard, Dr Amandine Everard, Dr Benoit Foligné qui, malgré leur agenda serré, ont bien voulu donner de leur temps pour évaluer mes travaux de thèse. Je voudrais renouveler mes remerciements à l'égard du Dr Amandine Everard et du Dr Benoit Foligné, membres de mon comité de suivi thèse pour leurs conseils, orientations, et suggestions pertinentes au cours de ma thèse.

Mes remerciements vont ensuite à l'endroit de Hervé Blottière, Joël Doré et Nicolas Lapaque pour leur bienveillance, et leur accueil au sein de l'équipe FInE. Je remercie particulièrement Hervé Blottière et Nicolas Lapaque, responsables successifs de l'équipe FInE, pour m'avoir permis d'être dans les conditions idoines pour travailler. Je réitère ces remerciements à l'endroit de Nico pour ses conseils avisés pour les expérimentations en biologie cellulaire.

Cette thèse n'aurait pas eu lieu sans l'immense confiance que Christel MAILLET a placée en moi. Notre rencontre remonte à un certain jour de Novembre 2017 à Rabat (Maroc). Et depuis, Christel n'a cessé d'être un soutien, un mentor sur qui j'ai pu compter en toutes circonstances. Aucun mot ne sera assez puissant pour exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance envers elle. Je pense avoir muri aussi bien scientifiquement qu'humainement à tes côtés.

Je ne pourrais parler de Rabat sans remercier les collègues et collaborateurs du CNRST au Maroc. Je pense au Prof AMAR, au Prof EL. Fahime, à Bahia Rached, Taha Chouati et bien sûr Soufiane Maski que j'ai eu le plaisir de retrouver à Jouy-en-Josas. Je chérirai toujours les moments chaleureux que nous avons passés ensemble, votre humanisme m'a particulièrement touché. Cette thèse existe aussi parce que vous avez bien voulu nous fournir, à travers les CCMM, les souches bactériennes sur lesquelles nous avons travaillé. Croyez en ma sincère reconnaissance !

Je remercie également Marine Gilles, Florence Thirion de MGP pour l'acquisition des données de métagénomique, Lydie Oliveira Correia et Celine Henry pour la protéomique.

Je voudrais remercier aussi ma très chère Faby pour m'avoir initié à la culture anaérobie, son aide incommensurable en microbiologie et pour mes manips en fermenteurs, pour ses conseils et sa gentillesse à laquelle j'ai été sensible. Je serai heureux le jour où j'aurai ton sens de l'organisation. Merci pour tes encouragements tout au long de cette thèse.

Mes remerciements vont également à l'endroit de Christelle Bressuire. Je te remercie très sincèrement de m'avoir appris à utiliser les fermenteurs, à les dompter et à faire face à toutes les surprises qu'ils peuvent nous réserver. Merci d'avoir été une grande sœur pour moi au labo.

Je tiens également à remercier ma très chère Catherine Juste. J'ai eu un réel plaisir à être ton voisin de bureau. Nos discussions à propos de la littérature et des livres ont été des moments d'évasion pour moi. Je te remercie pour toutes ces heures passées avec moi, sous la chaleur de la chambre de Freter, à m'apprendre à purifier du microbiote intestinal. Je te souhaite beaucoup de bonheur dans ta nouvelle vie de retraitée, ma très chère Catherine.

Mes remerciements vont ensuite à l'endroit de Vincent Brochard. Je te remercie beaucoup pour ta gentillesse, ta bienveillance et ta serviabilité. Merci d'avoir pris le temps de me former à la bio-cell et de répondre à mes nombreuses questions. Tu manqueras beaucoup à l'équipe. Je te souhaite de beaucoup t'épanouir dans ta nouvelle équipe.

Un grand merci à Stan (alias Stanichouuu) pour sa gentillesse, son optimisme, ses encouragements et tous ses conseils en bio-info et surtout pour ces moments de rigolades et de légèreté entre deux trucs sérieux (autrement dit pour tous ces moments où tu prenais plaisir à m'embêter). Je tiens également à remercier Pierre pour sa bienveillance et le temps passé avec moi à la paillasse et pour tous ses conseils constructifs. Je ne pourrai finir cette partie sans adresser mes remerciements et exprimer ma profonde gratitude à Alex (merci d'avoir essayé de m'initier au Trail). Merci à Marteen pour ta gentillesse et tes conseils toujours pertinents. Je remercie Julie pour sa bienveillance, sa serviabilité et pour ton aide inestimable (on se fera un kebab sauce algérienne après tout ça...).

J'aurais aimé pouvoir faire un paragraphe pour remercier toutes ces personnes qui ont participé de près ou de loin à la réussite de cette thèse aussi bien humainement que scientifiquement, je pourrais en faire un livre. Très sobrement ici, mais chaleureusement dans mon cœur, je tiens à adresser également mes sincères remerciements à Colombe, Hiba, Ruma, Alice, Camille,

Delphine, Rozenn, Laurène et Laura. Sans oublier, celles et ceux qui sont parti.es explorer d'autres horizons, je pense à Amandine, Ludovica, Celia (je souhaite beaucoup de bonheur à toi et Elliot dans votre nouvelle vie de jeunes parents), Maxime et Mohamed. Merci pour tous ces moments conviviaux qui ont été un viatique pour survivre aux affres des manips ratées, à la morosité du temps hivernal et à la déprime de la rédaction. Je veux aussi remercier mes deux stagiaires, Héloïse et Stanislas.

Je voudrais également remercier mon ami Jean-Marc pour son soutien infaillible pendant ma thèse, merci également pour toutes ces discussions autour des valeurs que nous partageons.

Il me sera difficile d'adresser mes remerciements sans penser à l'équipe sœur, je veux nommer PhylHom. Je remercie donc chaleureusement Patou, Karine, Céline, Constance, Camille et les nouvelles, Solène et Emilie. Un spécial remerciement à Esra pour son amitié et la relecture de mes articles avec beaucoup de bienveillance.

Merci également à mes collègues de l'IUT de Rambouillet, Nathalie, Eric, Farouk, Rivo et Omar.

Je n'oublie pas nos gestionnaires d'unité, la RH, ainsi que nos informaticiens notamment Aurore, Marion, Sebastien, Momar, Franck et Emmanuel. Je remercie aussi, à travers Ludo, toute l'équipe de la prépa.

Cette thèse doit aussi son existence à l'amour inconditionnel et au soutien constant dont j'ai pu bénéficier de ma famille et de mes amis pendant ces années de thèse. Je vous exprime ma profonde gratitude et reconnaissance. Enfin, je souhaite remercier très chaleureusement Naomi, pour avoir été le soleil qui embellit mes journées, parfois maussades durant cette thèse. Merci pour ton soutien constant et tes encouragements et pour tous ces moments en ta présence où j'ai pu penser à autre chose qu'à ma thèse.

Liste des abréviations

aadk : aminoglycoside 6-adenylyl transferase

ADNr : Acide desoxyribonucléque ribosomal

AGCC : Acide gras à chaînes courtes

AhR : Aryl hydrocarbon

aph : Aminoglycoside 3'-phosphotransferase

ARCOL : Artificial colon

BSS : Basal salt solution

CARD : Comprehensive antibiotic resistance database

cat : chloramphenicol acetyltransferase

CAZymes : Carbohydrate active enzymes

CCMM : Collections coordonnées marocaines de microorganismes

CE : Carbohydrate esterase

CEI : Cellules épithéliales intestinales

C-IBS : constipated-irritable bowel syndrom

CMC : Carboxymethylcellulose

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CNRST : Centre national pour la recherche scientifique et technique

DC: Dendritic cells

DCA: Deoxycholic acid

DNBS: Dinitrobenzene sulfonic acid

DNS: Dinitrosalicylic acid

DSS: Dextran sulfate sodium

EFSA: European food safety authority

ENS: Enteric nervous system

EPS: Extracellular polymeric substances

ErmD: Erythromycin resistance

FAO/WHO: Food and agriculture organization/World health organization

FMT: Fecal microbiota transplantation

GALT: Gut-associated lymphoid tissue

GH: Glycoside hydrolase

GLP-1: Glucagon-like peptide-1

GRAS: Generally regarded as safe

gyrB: gyrase B

HDAC3: Histone deacetylase 3

IBD: Inflammatory Bowel Syndrome

IL10: Interleukin 10

IMC : Indice de masse corporelle

MLST: Multi locus sequence typing

NF κ B: Nuclear factor-kappa B

NGP: Next-generation probiotic

NLR: Nod-like receptor

PL: Polysaccharide lyase

PRR: Pattern recognition receptor

PYY: Peptide tyrosine tyrosine;

QPS: Qualified Presumption of Safety

SCFA: Short chain fatty acid

SHIME: Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem

TGF- β : Transforming growth factor β

TLR: Toll-like receptor

TNBS: Trinitrobenzene sulfonic acid

Tregs: Regulatory T cells

UDCA: Ursodeoxycholic acid

VFDB : Virulence factor database

Liste des figures

Figure 1: Abondance totale des bactéries le long du tractus digestif (modifiée de de Vos et al, 2022)	24
Figure 2: Ratio des bactéries aux cellules humaines (Sender et al, 2016).....	25
Figure 3: Phylogénie de plusieurs génomes bactériens du microbiote intestinal humain (adaptée de Almeida et al. 2019).	26
Figure 4: Représentation schématique des entérotypes du microbiote intestinal humain (modifiée de Costea et al., 2017).	27
Figure 5: Impact de la dégradation des aliments sur l'hôte (Leeming et al 2021)	29
Figure 6: Schéma décrivant les différentes voies de communication bidirectionnelles connues entre le microbiote intestinal et le cerveau (Cryan et al, 2019).....	31
Figure 7: Description des mécanismes régissant les interactions entre le microbiote intestinal et lesystème immunitaire (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020).....	33
Figure 8: États stables alternatifs et transition critique dans la symbiose microbiote intestinal-hôte (Van Guchte et al, 2018)	37
Figure 9: Aperçu des principaux effets des composés alimentaires sur la composition du microbiote intestinal (Ramos et Martin, 2021).....	41
Figure 10: Composition des fibres alimentaires et localisation dans les cellules végétales (Gill et al., 2021).....	44
Figure 11: Structure schématique d'un type d'arabinoxylanes (A), du xyloglucane (B) et des β -glucanes (C) (Scheller and Ulvskov, 2010).....	45
Figure 12: Chaîne trophique dans l'écosystème colon humain (adapté de Mosoni, 2014, et Doré et al., 2017).....	46
Figure 13: Voies de biosynthèse des AGCC à partir de la fermentation des fibres végétales (Koh et al, 2016).....	47
Figure 14: Relation entre diversité des fibres alimentaires et diversité du microbiote intestinal (Thomson et al, 2021).....	48
Figure 15: Comparaison des microbes intestinaux humains anciens et modernes de pays industrialisés ou non (Wibowo et al, 2021).....	49
Figure 16: Mécanismes d'action des probiotiques conduisant à des effets bénéfiques pour la santé humaine (Sanders et al., 2019).	55
Figure 17: Potentiel effet bénéfique des probiotiques sur les CEI (Gareau et al, 2010)	58
Figure 18: Un aperçu des effets améliorants des bactéries bénéfiques de nouvelle génération sur les maladies métaboliques (Kumari et al ,2021).....	60
Figure 19: Les différentes stratagies de fermentation in vitro (adapté de Singh et al, 2022).	73
Figure 20: Système de 6 fermenteurs anaérobies de l'équipe FInE de MICALIS.	76

Liste des tableaux

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques des constituants des fibres alimentaires (Gill et al., 2021).....	43
Tableau 2: Familles probables de CAZymes impliquées dans la dégradation de polysaccharides végétaux chez les bactéries intestinales (adapté de Ye et al, 2022).....	50
Tableau 3: Les souches probiotiques et leurs maladies cibles (adapté de Puebla-Barragan and Reid, 2019).....	57
Tableau 4: Liste non exhaustive des principales espèces clé de voûte identifiées du microbiome intestinal humain (adapté de Tudela et al, 2021).....	65
Tableau 5 : Probiotiques commercialisés avec des souches de Bacillus à usage humain (Cutting, 2011)	69
Tableau 6: Différents systèmes de fermentation in vitro en continu (adapté de Singh et al, 2022)	75

VALORISATION: PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

Maski S, Ngom SI, Rached B, Chouati T, Benabdelkhalek M, El Fahime E, Amar M, **Béra-Maillet C** (2021) Hemicellulosic biomass conversion by Moroccan hot spring *Bacillus paralicheniformis* CCMM B940 evidenced by glycoside hydrolase activities and whole genome sequencing. **3 Biotech 11 (8) :379. doi :10.1007/s13205-021-02919-0.**

Serigne Inssa NGOM, Soufiane MASKI, Bahia RACHED, Taha CHOUATI, Lydie OLIVEIRA CORREIA, Catherine JUSTE, Thierry MEYLHEUC, Bernard HENRISSAT, Elmostafa EL FAHIME, Mohamed AMAR & Christel BÉRA-MAILLET (**Under review**). Characterisation of hemicellulolytic *Bacillus paralicheniformis* CCMM strains as future fibrolytic probiotics. **Scientific reports** (Submission ID df79ce9a-e670-433a-be66-8b07908d17da).

NGOM Serigne Inssa, BRESSUIRE Christelle, BÉGUET-CRESPEL Fabienne, JUSTE Catherine, GUIBOUT Héloïse, THIRION Florence, RACHED Bahia, EL FAHIME Elmostafa, AMAR Mohamed, BÉRA-MAILLET Christel (**Manuscrit en préparation**). Fibre-degrading *Bacillus paralicheniformis* probiotic candidate improves metabolic activity of colonic butyrate-producers in an *in vitro* obese model.

Communications orales

Serigne Inssa Ngom, Soufiane MASKI, Bahia RACHED, Taha CHOUATI, Lydie OLIVEIRA CORREIA, Catherine JUSTE, Elmostapha EL FAHIME, Mohamed AMAR, Christel BÉRA - MAILLET: « Thermophilic strains of *Bacillus* sp. from the Coordinated Collection of Moroccan Microorganisms (CCMM) as new fibre-degrading probiotic candidates ». **16ème congrès de la Société Française de Microbiologie, Nantes (22-24 Septembre 2021).**

Serigne Inssa NGOM, Christelle BRESSUIRE, Fabienne BÉGUET-CRESPEL, Catherine JUSTE, Florence THIRION, Bahia RACHED, Elmostapha EL FAHIME, Mohamed AMAR, Christel BÉRA-MAILLET: « Fibre-degrading *Bacillus* probiotic candidate and dietary fibres improve metabolic activity of colonic butyrate-producers in ex-vivo obese model ». **9th World Congress on Targeting Microbiota, Paris (19-21 Octobre 2022).**

Serigne Inssa NGOM. Finale régionale « Ma Thèse en 180s », Université Paris-Saclay (15 Mars 2022).

Comminications affichées :

Serigne Inssa NGOM, Bahia RACHED, Taha CHOUATI, Soufiane MASK, Naima RHALLABI, ElMostafa ELFAHIME, Mohamed AMAR, Christel BERA-MAILLET : « Criblage de souches de *Bacillus* extrémophiles isolées au Maroc pour des activités de dégradation des fibres végétales, en vue d'applications en biotechnologies ». **15e congrès de la SFM, Paris (30 Septembre 2019-2 Octobre 2019).**

Serigne Inssa NGOM, Soufiane MASKI, Bahia RACHED, Taha CHOUATI, Lydie OLIVEIRA CORREIA, Catherine JUSTE, Elmostapha EL FAHIME, Mohamed AMAR, Christel BÉRA-MAILLET: « Thermophilic strains of *Bacillus* sp. from the Coordinated Collection of Moroccan Microorganisms (CCMM): new safe fibre-degrading probiotic candidates? ». **XXIeme édition des journées de l'École Doctorale ITFA, Faculté de Pharmacie, Chatenay-Malabry (28 Juin 2022).**

Serigne Inssa NGOM, Soufiane MASKI, Bahia RACHED, Taha CHOUATI, Lydie OLIVEIRA CORREIA, Catherine JUSTE, Elmostapha EL FAHIME, Mohamed Amar, Christel BÉRA -MAILLET: « Impact of dietary fibres combined with a fibre-degrading probiotic candidate on ex-vivo dysbiotic gut model ». **8th International conference on dietary fiber 2022, Leuven, Belgium (16-18 Octobre 2022).**

Bahia Rached, Taha Chouati, **Serigne Inssa Ngom**, Mohammed Ajdig, El Mostafa El Fahime, Christel Béra-Maillet, Mohamed Amar, Fouad Mellouki : « Identification et caractérisation de souches de *Bacillus* sp. isolées au Maroc ». **17^e congrès de la SFM « Microbes 2022 », Montpellier (03-05 Octobre 2022).**

Table des matières

Liste des abréviations	9
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux	12
VALORISATION: PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	13
Contexte scientifique et objectifs du projet de thèse	17
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	22
Partie I : Etat de l'art sur le microbiote intestinal.....	23
1. Soi ou non-soi : telle est la question ?	23
2. Le microbiote, une histoire de richesse et de diversité.....	24
3. Le microbiote : un allié sûr ?	28
4. Dialogue avec l'Immunité : entre coévolution et coconstruction.....	32
Partie II : Rupture de la symbiose hôte-microbiote.....	35
1. Dysbiose : leurre et lueurs.....	35
2. Le microbiote : entre fragilité et plasticité.....	38
3. Alimentation, fibres et microbiote.....	40
4. CAZymes : diversité et spécificités	49
Partie III : Modulation du microbiote intestinal	53
1. Probiotique traditionnel	55
2. Probiotique de nouvelle génération	59
3. Espèces clé de voûte : De la métaphore au concept	63
4. Le genre <i>Bacillus</i> comme probiotique.....	67
5. Méthodes d'études <i>in vitro</i> du microbiote intestinal	71
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	77
CHAPITRE II : Criblage de souches de <i>Bacillus</i> pour des activités fibrolytiques	78
Article 1: Hemicellulosic biomass conversion by Moroccan hot spring <i>Bacillus paralicheniformis</i> CCMM B940 evidenced by glycoside hydrolase activities and whole genome sequencing	78
ABSTRACT	82
GENOME RESEARCH REPORTS.....	83
Article 2: Characterisation of hemicellulolytic <i>Bacillus paralicheniformis</i> CCMM strains as future fibrolytic probiotics	99
ABSTRACT	102
Introduction	103
Results	104
Discussion	114
Methods.....	117

Résultats complémentaires de l'article 2 : Innocuité et dialogue avec les cellules de l'hôte des souches de <i>Bacillus</i> des CCMM	135
Tests de résistance aux antibiotiques.....	135
Présence de gènes de virulence et de toxicité.....	137
Propriétés immunomodulatrices des souches de <i>Bacillus</i>	139
Modulation de la perméabilité intestinale dans un modèle cellulaire.....	142
CHAPITRE III : Impact de la souche candidate CCMM B969 en fermenteur anaérobie.....	144
Article 3: Fibre-degrading <i>bacillus paralicheniformis</i> probiotic candidate improves metabolic activity of colonic butyrate-producers in an <i>in vitro</i> obese model	144
Abstract	147
Introduction	148
Methods	149
Results	153
Discussion	159
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....	175
Références	185

Contexte scientifique et objectifs du projet de thèse

Le microbiote intestinal humain est étudié depuis plus de 60 ans pour mieux décrire les communautés microbiennes anaérobies qui le composent (diversité, abondance des espèces) et leurs fonctions au sein de l'écosystème intestinal. Organisés en réseaux trophiques, ces microorganismes tirent profit de notre alimentation pour se développer et dialoguent en permanence avec les cellules de l'hôte (cellules épithéliales intestinales, immunitaires ou entéro-endocrines). Ces interrelations entretiennent l'homéostasie intestinale, un état d'équilibre entre microorganismes et cellules humaines qui contribue au maintien de notre bonne santé et de notre bien-être.

Des études ambitieuses visent à décrypter la composition du microbiote intestinal de centaines, voire de milliers d'individus à travers le monde à l'aide de programmes de recherche de grande envergure tels que The Human Microbiome Project (The Human Microbiome Consortium Project, 2012), MetaHIT (Qin *et al.*, 2010), l'American Gut et plus récemment en France, le French Gut (coordonné par INRAE), et grâce à des outils de séquençage de plus en plus performants. Les objectifs sont multiples : comparer les microorganismes présents chez des individus en bonne santé, leur diversité et abondance, l'influence de l'ethnie, de la situation géographique, de l'alimentation, de l'âge, du sexe, mais aussi étudier leur signature dans des contextes de pathologies intestinales (Tap *et al.*, 2017), et prédire les fonctions supportées par cette communauté.

Les recherches sur le microbiote intestinal ces dernières années ont ainsi mis en évidence de nombreuses corrélations qui tendent de plus en plus vers un lien de causalité entre la rupture de la symbiose microbiote-hôte (dysbiose) et la survenue de maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète de type 2 chez l'Homme (Zhao, 2013; Zhao *et al.*, 2018; Agus, Clément and Sokol, 2021). La dysbiose, conséquence d'une alimentation occidentale riche en graisses, pauvre en fibres alimentaires, d'un mode de vie sédentaire et de la surconsommation d'antibiotiques, peut entraîner une perte de richesse microbienne et une augmentation de la

perméabilité intestinale (van de Guchte, Blottière and Doré, 2018). De nombreuses études s'intéressent donc à la manière de restaurer la symbiose. Comment moduler le microbiote intestinal pour rétablir l'équilibre des populations devient une question centrale pour contribuer à la prévention et au traitement des maladies métaboliques chez certains individus. Plusieurs approches sont aujourd'hui proposées pour moduler le microbiote intestinal, et parmi elles l'utilisation de probiotiques. Elle semble être une approche prometteuse pour lutter contre les maladies métaboliques telles que l'obésité (Sanders *et al.*, 2019), reconnue comme une pandémie par l'OMS depuis 1997 et qui concernerait plus d'un milliard de personnes dans le monde d'ici 2025 (Worldobesity, 2021). Toutefois, l'obésité est une pathologie complexe, multifactorielle, souvent associée à un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, du diabète de type 2 et d'autres maladies métaboliques. Il est important de souligner que tous les individus en situation d'obésité ne présentent pas les mêmes risques. En effet, certains individus souffrant d'obésité peuvent être métaboliquement sains, c'est-à-dire qu'ils ont une faible résistance à l'insuline, une faible inflammation et un profil lipidique normal, tandis que d'autres peuvent être métaboliquement malades (Iacobini *et al.*, 2019). Le microbiote intestinal est altéré chez les personnes en situation d'obésité, en particulier chez celles qui sont métaboliquement malades (Cotillard *et al.*, 2013; Le Chatelier *et al.*, 2013). Cette altération peut alors contribuer à l'inflammation chronique, à la résistance à l'insuline et à d'autres problèmes métaboliques qui sont associés à l'obésité (Turnbaugh *et al.*, 2006; Vrieze *et al.*, 2012). La recherche de probiotiques démontrant des propriétés anti-inflammatoires, ou ayant un effet sur la prise alimentaire ou la satiété à travers la production de butyrate, par exemple, peut dans ce cas présenter un intérêt supplémentaire.

Ce travail de thèse porte donc sur la modulation du microbiote intestinal, en termes de composition, diversité et fonctions, d'individus en situation d'obésité, via un nouveau type de probiotique que nous allons sélectionner, caractériser au niveau phylogénétique et fonctionnel,

et valider en modèle de fermentation continue *in vitro*. Il vise ainsi à rechercher des bactéries qui pourraient être bénéfiques pour la santé humaine en agissant comme un levier positif de la symbiose microbiote/hôte. Ce travail de thèse se décline en deux axes principaux. Dans le premier axe, j'ai criblé plusieurs souches du genre *Bacillus* issues de collections de bactéries environnementales marocaines, afin d'identifier des candidats probiotiques présentant des fonctions fibrolytiques similaires à celles portées par les bactéries commensales de l'intestin. Ces fonctions sont en effet associées aux espèces majeures du microbiote intestinal qui représentent le socle d'un solide réseau trophique qui produit l'énergie nécessaire aux microorganismes pour leur croissance, et fournit également à l'hôte ses principales sources d'énergie pour le maintien de l'homéostasie. L'innocuité des souches d'intérêt a également été étudiée expérimentalement et à travers l'analyse de leur génome, selon les recommandations de l'EFSA, pour une utilisation potentielle en tant que probiotique. Ce premier axe m'a ainsi permis d'identifier une souche de *Bacillus paralicheniformis* aux fonctions fibrolytiques similaires à celles exprimées par les bactéries fibrolytiques intestinales, travail valorisé par une publication dans 3Biotech (Maski *et al.*, 2021) et un second article soumis dans Scientific Reports (Ngom *et al.*). Puis, dans le deuxième axe, j'ai développé un modèle *in vitro* de microbiote fécal obèse pour étudier la capacité du candidat probiotique fibrolytique à moduler un microbiote dysbiotique à l'aide de cultures continues en fermenteurs. L'objectif de cet axe était d'évaluer l'impact de la souche candidate probiotique fibrolytique sur l'activité métabolique, sur la composition et la diversité du microbiote de trois personnes en situation d'obésité, couplé à un ré-équilibre de l'apport en fibres alimentaires. Les résultats ont révélé que l'utilisation d'une souche probiotique candidate de *B. paralicheniformis*, sélectionnée pour ses propriétés fibrolytiques, en association avec un régime riche en fibres, augmentait significativement la production de butyrate *in vitro*, par rapport à l'action de l'apport en fibres seul. La capacité des fibres alimentaires/probiotiques à rétablir l'équilibre des bactéries

intestinales dans le contexte de l'obésité a également été caractérisée par l'abondance de certains membres bactériens dégradant les fibres et producteurs d'AGCC. Ce travail fait l'objet d'une troisième publication à soumettre dans Gut Microbes.

L'ensemble de mes travaux de thèse est regroupé dans ce manuscrit sous la forme de 3 publications dont deux en premier auteur, complétées par une partie complémentaire sur l'étude d'innocuité des souches d'intérêt, et précédées d'une synthèse bibliographique en trois parties permettant de contextualiser le projet de thèse. La première partie de la synthèse bibliographique fait un état de l'art du microbiote intestinal en insistant sur sa composition et son impact sur la santé. La deuxième partie décrit les conséquences d'une rupture de symbiose et les facteurs influençant la composition, la diversité du microbiote intestinal, ainsi que ses fonctions. La dernière partie s'articule autour des stratégies de modulation du microbiote intestinal à travers l'utilisation des probiotiques et une réflexion sur les notions d'espèces clé de voûte et leur importance dans la structure globale de l'écosystème intestinal. Une attention particulière a été portée sur le genre *Bacillus* en tant que probiotique.

Enfin, les principaux résultats de cette thèse ont été remis dans leur contexte général et font l'objet d'une discussion, clôturée par une conclusion générale qui revient sur les nouvelles perspectives qu'offre une souche candidate probiotique fibrolytique. Ce travail de thèse a démontré que la combinaison d'un apport de fibres alimentaires ré-équilibré et d'une souche probiotique candidate de *B. paralicheniformis* est une stratégie intéressante pour moduler la communauté microbienne des individus en situation d'obésité, en stimulant sélectivement différentes espèces microbiennes productrices de butyrate.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I : Etat de l'art sur le microbiote intestinal

1. Soi ou non-soi : telle est la question ?

« On a souvent besoin d'un plus petit que soi » dit Jean de la Fontaine dans « Le lion et Le rat ». D'intenses recherches depuis le siècle dernier ont permis de mettre en évidence la part importante jouée par les microorganismes aussi bien dans les maladies que dans la santé et le bien-être de l'Homme (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). Ces microorganismes entretiennent une relation avec leur hôte, qui peut être de différentes natures allant du parasitisme à la symbiose. Le terme « symbiose » fut introduit pour la première fois en 1879 par Anton de BARY désignant « l'association vivante d'espèces différentes » (Bary, 1879). En effet, le corps humain, notamment le tractus gastro-intestinal est colonisé par des centaines de milliards de microorganismes. Les recherches actuelles suggèrent que cette colonisation s'établit dès la naissance, tandis que la diversité microbienne dans l'intestin du nouveau-né atteint approximativement celle d'un adulte vers l'âge de 3 ans (Doré and Blottière, 2015). Les premières jours du nouveau-né sont également être importants pour la maturation de son système immunitaire ainsi que la diversification globale de son microbiote jusqu'à l'âge de 3 ans (Doré and Blottière, 2015; Dzidic *et al.*, 2018). Le microbiote intestinal co-évolue ainsi avec son hôte et de nombreux chercheurs ont tendance à le décrire comme un organe supplémentaire de notre corps, du fait de son rôle important pour notre santé (O'Hara and Shanahan, 2006; Byndloss and Bäumler, 2018). Toutefois, à la question : « Est-ce que nous explorons un nouvel organe ? », Patrice Cani répond : « Probablement non ! » (Cani, 2017). Selon lui, le microbiote représente un ensemble multiple d'« organes » au lieu d'un seul organe, ou un système d'engrenage complexe au sein d'une autre « machine » encore plus complexe qui est l'humain (Cani, 2017). D'autres vont beaucoup plus loin en reprenant le concept d'holobionte de Lynn Margulis (1991) pour décrire la relation complexe qu'entretient le microbiote intestinal avec son hôte (van de Guchte, Blottière and Doré, 2018). La question du soi ou non-soi n'est pas seulement philosophique et épistémologique, elle est aussi scientifique. Répondre à cette question nous permettrait de mieux considérer l'ensemble des interactions qu'entretient le microbiote avec « l'hôte », mais aussi les interconnexions entre les membres de la communauté microbienne. Elle nous permettra aussi de décentrer le regard que nous portons sur l'hôte au sein de l'holobionte Homme-microbiote, de considérer une relation de codépendance entre le microbiote et son hôte. Pour certains, le microbiote est à la fois soi et non-soi : il fait partie de notre biologie, mais se compose d'entités à évolution rapide qui répondent sur des échelles de temps physiologiques, écologiques et évolutives aux

perturbations externes d'une manière qui affecte nos phénotypes (Dominguez-Bello *et al.*, 2019). En ce sens, je pense que le microbiote intestinal est un soi-non-soi et le qualifier comme « nouvel organe » serait réductionniste et ne tiendrait pas compte de toute sa complexité. Albert Camus disait que « Mal nommer les choses, c'est ajouter au malheur du monde ».

2. Le microbiote, une histoire de richesse et de diversité

Depuis l'invention en 1887 par Robert Koch d'une nouvelle technique de culture en boîte de Pétri (remercions ici son assistant Julius Richard Pétri !), les méthodes culturelles conventionnelles associées aux techniques d'identification physiologiques et biochimiques ont permis d'avoir des connaissances de base sur la composition du microbiote intestinal. L'extension de ces connaissances s'est heurtée à la très grande fragilité de beaucoup de bactéries anaérobies strictes, très sensibles à l'oxygène, mais aussi à la méconnaissance des besoins nutritifs de certaines bactéries de l'intestin. En 1967 et 1969, les méthodes de culture en tubes proposées par Hungate sous flux de gaz inerte, et la manipulation des cultures en chambre de Freter, ont permis de cultiver un plus grand nombre de bactéries et d'avoir des connaissances nouvelles sur la composition du microbiote intestinal (Clark, 2019). A partir de

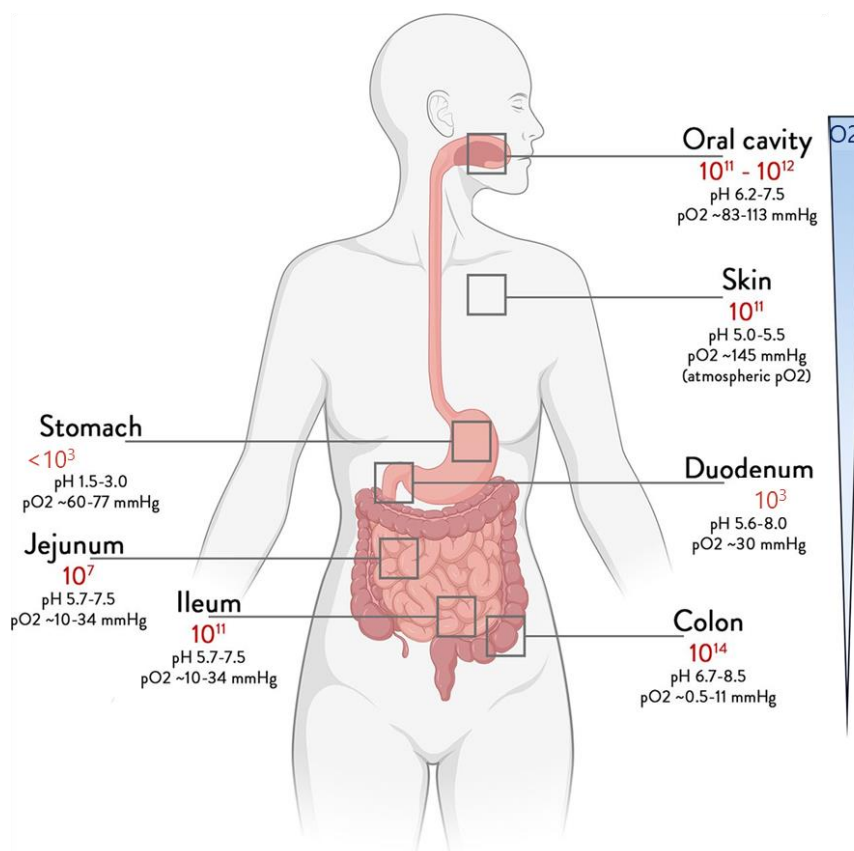


Figure 1: Abondance totale des bactéries le long du tractus digestif (modifiée de de Vos *et al.*, 2022)

1980, le développement des méthodes de séquençage métagénomique a permis d'acquérir des connaissances plus solides encore sur la composition et la diversité du microbiote, notamment dans le tractus gastro-intestinal humain. Grâce à ces avancées technologiques, nous savons aujourd'hui que la complexité taxonomique du microbiote et la charge bactérienne augmentent progressivement le long du tube digestif, de l'estomac à l'iléon jusqu'au colon distal pour atteindre 10^{14} bactéries (Figure 1). A l'inverse, la quantité d'oxygène diminue alors que le pH acide de l'estomac se rapproche de 7 dans le colon.

Une étude récente suggère que le corps humain, principalement le colon, serait colonisé par 3.9×10^{13} microorganismes, notamment des Procaryotes (Sender, Fuchs and Milo, 2016). Cette étude remet en cause des études plus anciennes qui stipulaient que le nombre de cellules bactériennes était 10 fois supérieur au nombre de cellules humaines pour un individu donné (Luckey, 1972). Pour Sender et al (2016), le ratio entre le nombre de cellules bactériennes et le nombre de cellules humaines est approximativement égal à 1 (Figure 2). L'estimation de Senders prend en compte principalement le volume du colon où est retrouvée la plus grande densité bactérienne. Elle tient compte également des cellules humaines anucléées, rendant son estimation plus précise que celle de Luckey.

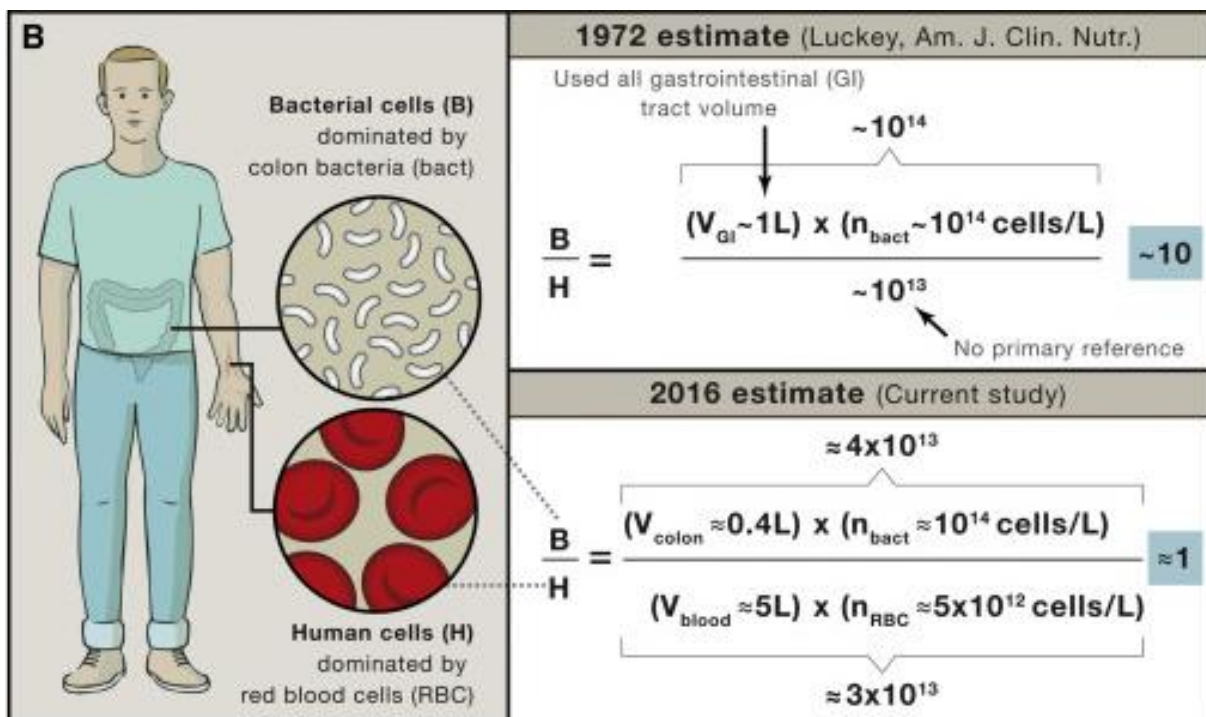


Figure 2: Ratio des bactéries aux cellules humaines (Sender et al, 2016)

Le microbiome intestinal humain comprend principalement les Firmicutes (récemment renommé Bacillota (Oren and Garrity, 2021), les Bacteroidetes (Bacteroidota), les

Actinobacteria (Actinomycetota) et les Proteobacteria (Pseudomonadota) (Figure 3). Les études de métagénomique menées sur des centaines d'individus ont permis d'identifier entre 1000 et 2000 espèces différentes (Postler and Ghosh, 2017; A. Almeida *et al.*, 2019). La diversité génétique est encore plus surprenante. Le séquençage métagénomique d'échantillons fécaux de 124 européens a identifié 3.3×10^6 gènes microbiens non redondants provenant de jusqu'à 1150 espèces différentes, et dépassant en nombre les gènes codant pour les protéines humaines d'environ 150 fois (Qin *et al.*, 2010; Postler and Ghosh, 2017).

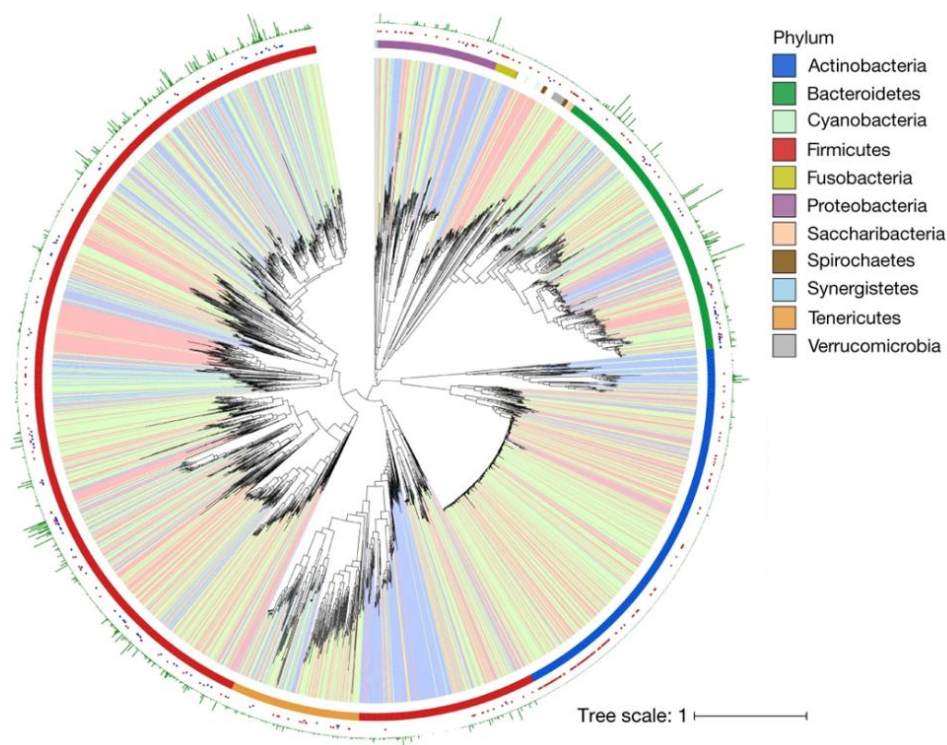


Figure 3: Phylogénie de plusieurs génomes bactériens du microbiote intestinal humain (adaptée de Almeida *et al.* 2019).

Le microbiote intestinal de chaque individu est spécifiquement caractérisé par des groupes de bactéries nommés entérotypes. Les entérotypes sont identifiés en fonction de la composition et de la proportion de différents types de micro-organismes présents dans le microbiome intestinal. Il existe plusieurs entérotypes différents, chacun ayant une composition unique de micro-organismes. Ainsi, trois entérotypes ont été caractérisés par trois genres bactériens dominants (Figure 4) : *Bacteroides* (entérotype I), *Prevotella* (entérotype II) ou *Ruminococcus* (entérotype III) (Arumugam *et al.*, 2011; Costea *et al.*, 2017). Chaque entérotype abrite différents genres de bactéries. Ces genres bactériens ne sont pas fixes car il y a une flexibilité ou une plasticité dans la distribution écologique dépendante, par exemple, des changements alimentaires de

longue durée ou des prises d'antibiotiques, faisant passer un individu d'un entérotipe à un autre (Malard *et al.*, 2021).

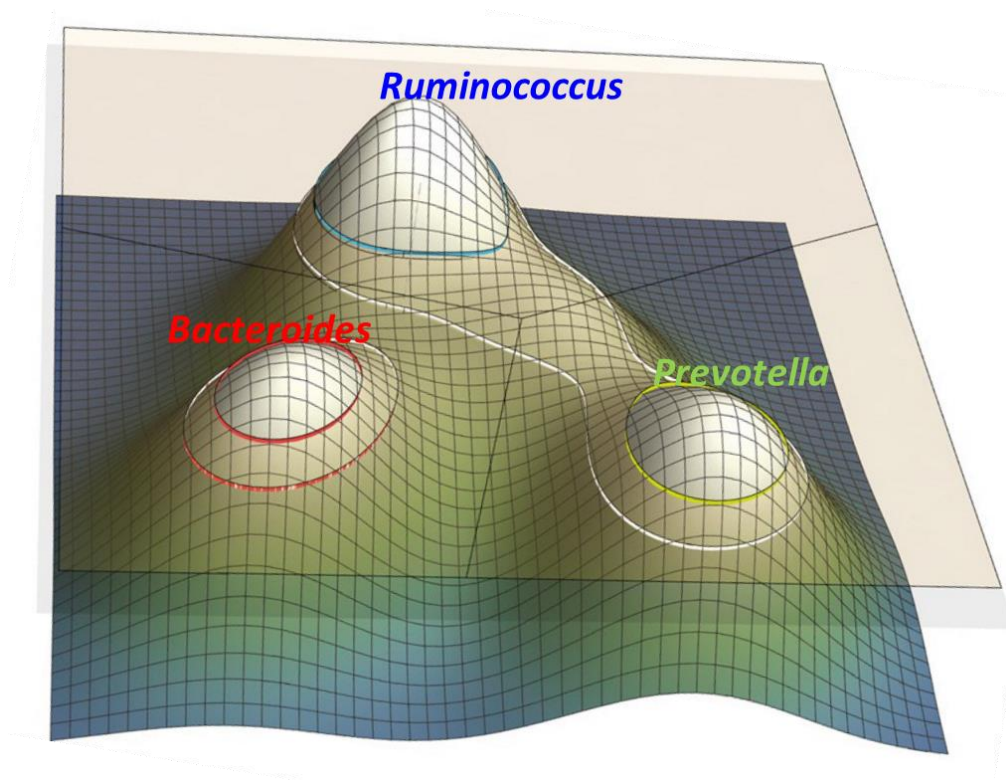


Figure 4: Représentation schématique des entérotypes du microbiote intestinal humain (modifiée de Costea *et al.*, 2017).

Qin *et al.* (2010) ont estimé que chaque être humain hébergeait au moins 160 espèces différentes (Qin *et al.*, 2010), alors que des études plus récentes estiment ce nombre entre 100 et 500 (Lloyd-Price, Abu-Ali and Huttenhower, 2016; Zhang *et al.*, 2023). Avec des données de séquençage de l'ARNr 16S de plusieurs individus sains, Tap *et al.* (2009) montrent un « core » ou noyau phylogénétique de 35,8 % du microbiote intestinal total partagé entre différents individus. De même, Truong *et al.* ont montré (2017) sur la base de données métagénomiques qu'en moyenne seules 35,3 % des espèces sont partagées entre deux individus non apparentés. Tolstoï dans son roman intitulé « Anna Karénine » disait que : « Toutes les familles heureuses se ressemblent. Les familles malheureuses le sont chacune à leur manière. » Reprenant ainsi le principe d'Anna Karénine, Ghosh *et al.* (2020) suggèrent que tous les individus sains ont des microbiotes similaires alors que ceux des personnes malades sont aberrants les uns des autres. Je pense que l'application de ce principe sur la description du microbiote intestinal pourrait être cruciale dans la définition de ce que nous pourrions considérer comme étant un microbiote sain.

3. Le microbiote : un allié sûr ?

Du fait de sa grande diversité et de ses variations inter-individuelles, il est aujourd'hui difficile pour les spécialistes les mieux avertis, de définir ce qu'est un microbiote dit « sain ». Nonobstant cet état de fait, il est quand même noté que les fonctions du microbiote sont bien conservées d'un individu sain à un autre. En effet, le microbiote intestinal contribue à un large panel de fonctions physiologiques allant de la dégradation des fibres végétales complexes, la synthèse de métabolites, aux fonctions de barrière intestinale jusqu'à la maturation du système immunitaire de l'hôte.

L'alimentation de l'Homme est constituée de 5% à 10% de fibres végétales dans les sociétés occidentalisées, cet apport en fibres peut être supérieur dans les communautés fortement consommatrices de végétaux (Krautkramer, Fan and Bäckhed, 2021). La dégradation de ces fibres végétales est prise en charge par les enzymes salivaires et se poursuit tout au long du tube digestif jusque dans l'intestin. En raison du faible nombre d'enzymes présentes chez l'Homme permettant uniquement la dégradation de certains sucres simples (Kaoutari *et al.*, 2013), les fibres végétales complexes échappent à la digestion dans la partie supérieure du tube digestif et parviennent au colon où elles sont dégradées puis fermentées par le microbiote intestinal qui possède une multitude d'enzymes capables de déstructurer les fibres végétales les plus complexes (cf. partie II, §3). Les bactéries de la muqueuse iléale possèdent, elles aussi, un panel de gènes codant pour des enzymes fibrolytiques (Patrascu *et al.*, 2017), mais ces activités n'ont pas encore été démontrées *in vivo*. Si tel était le cas, cela pourrait impacter la définition actuelle des fibres alimentaires.

L'utilisation de ces fibres par les bactéries intestinales est un facteur clé pour la diversité et la stabilité de l'écosystème intestinal, ce qui est bénéfique non seulement pour l'hôte mais aussi pour ses bactéries intestinales (Cheng *et al.*, 2020). Il en résulte la production de métabolites fermentaires, notamment des AGCC. Ces métabolites jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie intestinale et de la symbiose hôte-microbiote (Leeming *et al.*, 2021) (Figure 5). Ils sont impliqués dans la régulation immunitaire, la régulation du pH, l'absorption de sodium et d'eau et la sécrétion de mucus. Ils sont également impliqués dans la sécrétion d'hormones notamment PYY et GLP-1 qui ont un effet sur la satiété ainsi que la sécrétion d'insuline (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021).

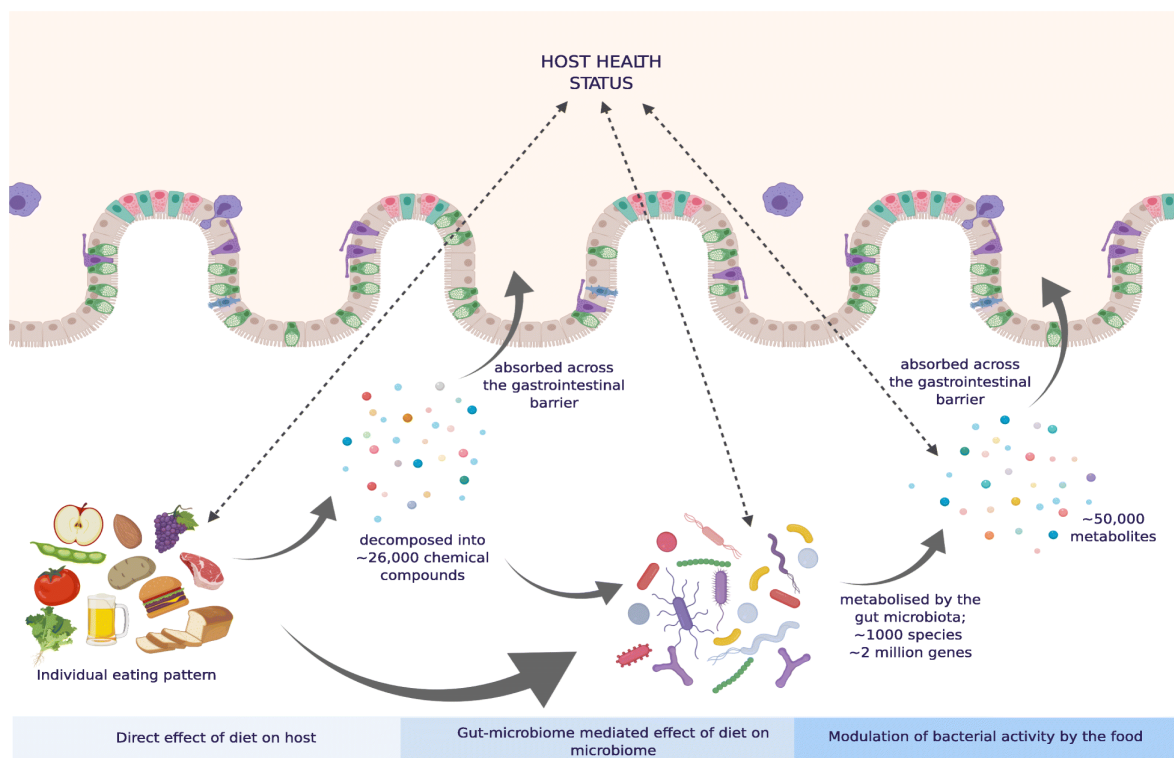


Figure 5: Impact de la dégradation des aliments sur l'hôte (Leeming *et al* 2021)

En plus des AGCC et des acides gras branchés, certaines bactéries de l'intestin peuvent également synthétiser de manière endogène des co-facteurs, tels que la vitamine B, essentiels pour le métabolisme de l'hôte et la régulation de l'expression des gènes (Wan *et al.*, 2022). Le microbiote possède des voies enzymatiques impliquées dans la synthèse des vitamines de huit complexes de vitamines B différentes : la biotine (B7), la cobalamine (B12), le folate (B9), la niacine (B3), l'acide pantothénique (B5), la pyridoxine (B6) et riboflavine (B2). Ces vitamines, ou celles provenant de l'alimentation, sont également utilisées comme co-facteurs par un grand nombre de bactéries intestinales. Par exemple, la vitamine B12 est un co-facteur particulièrement important pour les bactéries du genre *Bacteroides* qui n'ont pas la capacité de

synthétiser cette vitamine. La biotine est étudiée pour son lien avec le surpoids et l'obésité (Belda *et al.*, 2022).

Le microbiote intestinal joue également un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. Ce maintien passerait, en plus des AGCC, par les métabolites dérivés du tryptophane. En effet, des études suggèrent que le microbiote transforme le tryptophane issu de l'alimentation en indole par des tryptophanases. L'indole peut être reconnu par les récepteurs Aryl hydrocarbon (AhR) se trouvant sur les cellules épithéliales intestinales (IEC). Il est suggéré que l'activation des AhR dans ces dites cellules améliore les fonctions de barrière intestinale en améliorant les jonctions serrées, grâce à la régulation de Notch1 et en augmentant l'expression du récepteur à IL10 (Zhou *et al.*, 2022).

Outre les métabolites cités précédemment, les sels d'acides biliaires secondaires dérivés du microbiote jouent aussi leur partition sur son effet santé bénéfique pour l'homme. Plus précisément, lors d'une prise alimentaire, 95% des acides biliaires intestinaux sont réabsorbés dans l'iléon puis retournent dans le foie, lieu de leur synthèse à partir du cholestérol. Ces acides biliaires sont impliqués dans la régulation de la digestion et l'absorption du cholestérol, des triglycérides ainsi que des vitamines liposolubles, entre autres fonctions (de Vos *et al.*, 2022). Cependant, les acides biliaires non absorbés peuvent servir de substrats pour le métabolisme du microbiote intestinal. De ce fait, les acides biliaires primaires sont transformés en acide biliaire secondaires, tels que l'acide désoxycholique (DCA), l'acide lithocholique et l'acide ursodeoxycholique (UDCA). Ces acides biliaires secondaires, dérivés du microbiote intestinal, peuvent influencer la prolifération des IEC et le péristaltisme colique par différentes voies (Zhou *et al.*, 2022).

L'axe intestin-cerveau joue également un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'hôte. L'intestin, est parfois communément appelé notre deuxième cerveau, et communique, via le système nerveux entérique (ENS), de manière bidirectionnelle avec le cerveau à travers diverses voies et métabolites bactériens (Cryan *et al.*, 2019). Des études suggèrent, en effet, que le microbiote intestinal interagit avec le système nerveux central et influence les systèmes neuroendocriniens associés à la réponse au stress, à l'anxiété, à la satiété et à la fonction de mémoire (Figure 6). Un dérèglement de cette voie est associé à un phénotype altéré, le diabète de type 2 (Knauf *et al.*, 2020). De plus en plus de recherches s'intéressent à l'axe intestin-cerveau pour traiter les maladies métaboliques (T2D, obésité).

En plus des molécules classiques telles que les AGCC, les acides biliaires, les hormones peptidiques intestinales, le concept d'entérosynes a récemment émergé (Knauf *et al.*, 2020). Les entérosynes sont définies comme des molécules bioactives de diverse nature provenant de l'intestin (hôte, microbiote, aliments) qui ont la capacité de moduler la contraction duodénale, en ciblant l'ENS. Les entérosynes peuvent être chimiquement diverses et liées aux hormones, aux peptides/lipides bioactifs, aux nutriments, au microbiote et aux facteurs immunitaires (de Vos *et al.*, 2022).

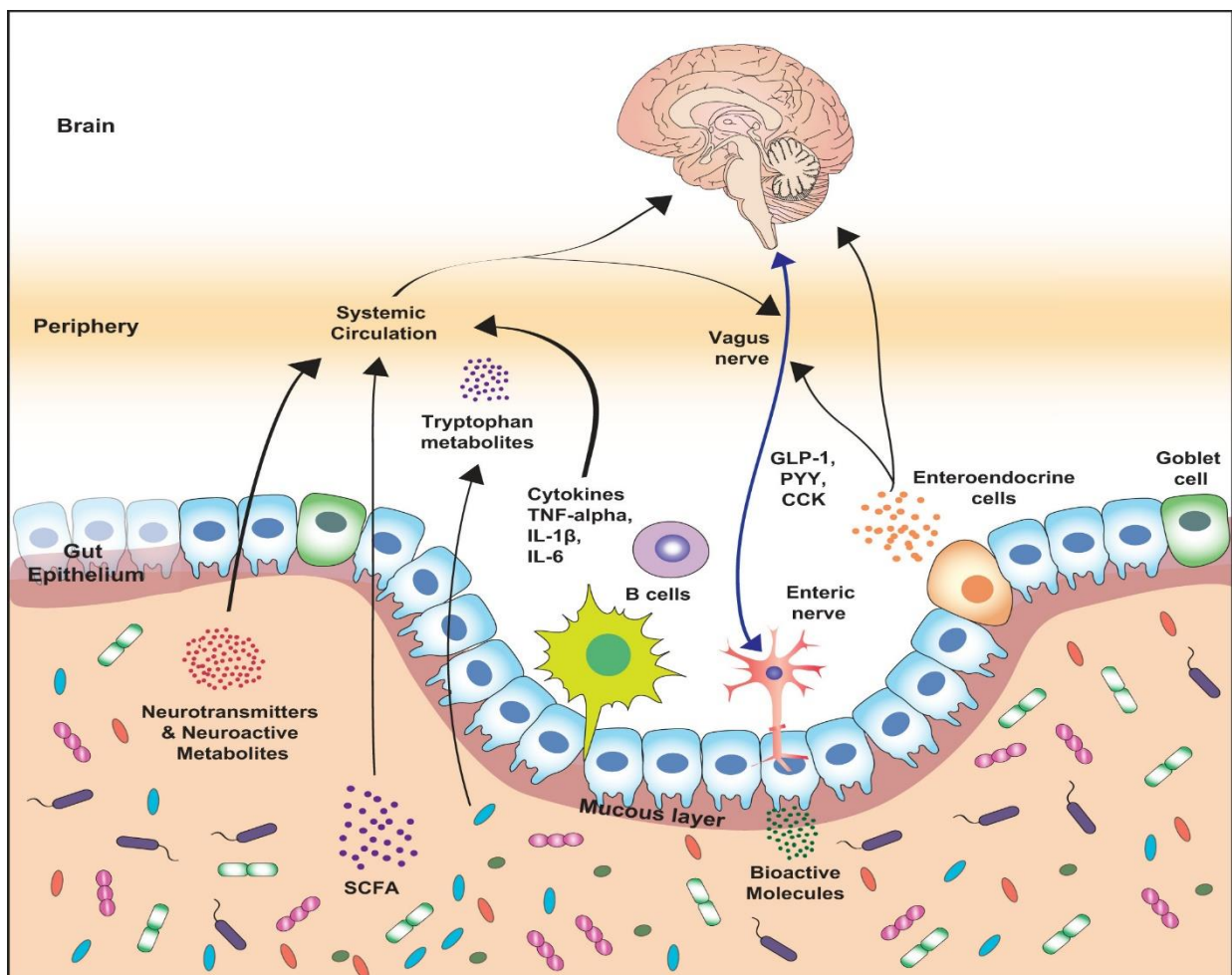


Figure 6: Schéma décrivant les différentes voies de communication bidirectionnelles connues entre le microbiote intestinal et le cerveau, y compris le métabolisme hépatique et de la vésicule biliaire, les réponses immunomodulatrices, l'innervation neuronale, l'entéroendocrine et la signalisation des métabolites microbiens. CCK, cholécystokinine ; GLP-1, peptide de type glucagon-1 ; IL, interleukine ; PYY, peptide YY; TNF, facteur de nécrose tumorale (Cryan et al, 2019)

Enfin, dans un autre registre, des études récentes ont montré par quels mécanismes le microbiote prévient la colonisation de l'intestin par des pathogènes et entraîne leur éradication. Elles suggèrent que les bactéries intestinales ont la capacité de limiter la croissance des pathogènes en passant par les voies métaboliques qui contrôlent la compétition pour des nutriments et des

niches dans l'intestin, et également en exacerbant les mécanismes de défense de l'hôte (Caballero-Flores, Pickard and Núñez, 2022).

L'ensemble de ces observations contribue à clarifier l'impact du microbiote intestinal sur notre santé, et à démontrer que son rôle est prépondérant. Comme Patrice Cani (Cani, 2017), nous sommes aussi tentés de dire qu'il est à l'intersection de tout. Cependant, il est certain que nous manquons encore de connaissances mécanistiques, sans ambiguïté, sur comment cet ensemble hétérogène et dynamique qu'est le microbiote intestinal impacte notre physiologie et homéostasie.

4. Dialogue avec l'Immunité : entre coévolution et coconstruction

Comme évoqué précédemment, il est aujourd'hui admis que la colonisation de l'intestin par le microbiote débute dès la naissance. Cette colonisation de l'intestin de l'hôte est cruciale pour l'éducation et la maturation de son système immunitaire. Les événements les plus critiques dans l'éducation de l'immunité de l'hôte peuvent avoir lieu au cours des premières années de la vie, au cours desquelles la composition du microbiote affiche une variabilité intra et interindividuelle plus élevée, avant d'atteindre une configuration plus stable et semblable à celle de l'adulte à l'âge d'environ 3 ans (Doré and Blottière, 2015; Dzidic *et al.*, 2018). Cette colonisation initiale peut être impactée par plusieurs facteurs, dont le mode d'accouchement qui a un effet sur la composition du microbiote initial, et l'allaitement (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020).

Il a été montré que le microbiote intestinal peut influencer les voies immunitaires de l'hôte par des signaux initiés à la fois par un contact direct avec des antigènes de surface microbiens et par des effets indirects de métabolites dérivés du microbiote (Sbihi *et al.*, 2019). Le système immunitaire inné répond à différents motifs microbiens par des récepteurs de reconnaissance appelés PRR (Pattern Recognition Receptors). Ces derniers sont exprimés à la surface ou dans le cytoplasme des cellules immunitaires comme les cellules dendritiques, mais aussi sur les CEI. Parmi les PRR, les récepteurs de type « Toll » (TLR) ont été initialement décrits comme

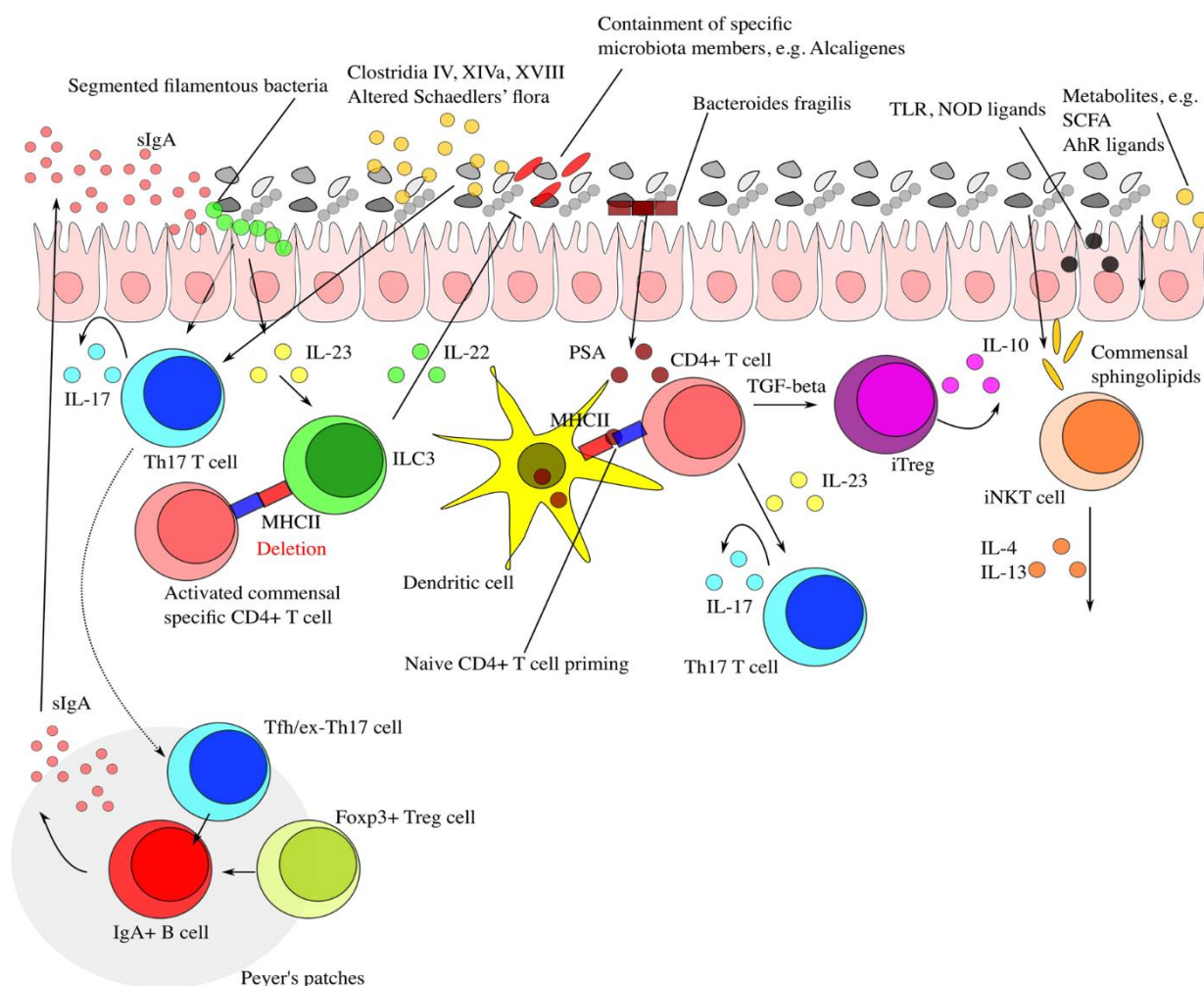


Figure 7: Description des mécanismes régissant les interactions entre le microbiote intestinal et le système immunitaire (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020).

des récepteurs détectant les signaux microbiens pendant une infection, et déclenchant une réponse immunitaire. Cependant, leurs ligands ne sont pas exclusifs aux agents pathogènes et sont abondamment produits par le microbiote intestinal. Les ligands des TLR, NLR, et les métabolites dérivés du microbiote (par exemple, les AGCC et ligands AhR) agissent directement sur les entérocytes et les cellules immunitaires intestinales, mais peuvent également atteindre des tissus distants via la circulation systémique pour moduler l'immunité (Figure 7) (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020). Les TLR sont impliqués dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes, régulent l'abondance des microbes commensaux et maintiennent l'intégrité des tissus. Autrement dit, suite à une stimulation des TLR, une cascade complexe de signaux est initiée, conduisant à l'activation du facteur de transcription NFκB qui régule une variété de gènes codant pour les chimiokines, les cytokines ainsi que d'autres effecteurs de la réponse immunitaire humorale (Lazar *et al.*, 2018). L'activité des TLR diminue au cours des premières semaines de la vie, permettant potentiellement le développement d'une communauté bactérienne intestinale stable. De plus, l'activation des TLR par des antigènes appartenant au

microbiote intestinal signale l'inhibition des réactions inflammatoires, ainsi essentielle au maintien de l'homéostasie intestinale.

Par ailleurs, les AGCC, particulièrement le butyrate (issu du métabolisme du microbiote intestinal), peuvent entraîner la différenciation des monocytes en macrophages par l'inhibition de l'histone désacétylase 3 (HDAC3). Les monocytes et les macrophages sont des cellules effectrices immunitaires innées cruciales et ont des rôles homéostatiques vitaux (Schulthess *et al.*, 2019).

Le microbiote entretient aussi une relation mutualistique avec le système immunitaire adaptatif. Les IgA sécrétoires (IgAs) jouent une part cruciale dans cette communication (Zheng, Liwinski and Elinav, 2020). Il est communément admis que les IgAs protègent les surfaces muqueuses ; cependant, la fonction protectrice des IgAs n'est pas encore entièrement comprise d'un point de vue mécanistique (Pabst, Cerovic and Hornef, 2016). Les antigènes des bactéries commensales induisent une production d'IgAs en faibles quantités, leur donnant ainsi un avantage pour la colonisation de leur niche intestinale (Lazar *et al.*, 2018). Il a été démontré que le microbiote intestinal module la migration et la fonction des neutrophiles et affecte la différenciation des populations de lymphocytes T en différents lymphocytes T auxiliaires (en anglais T helper, Th), respectivement : Th1, Th2, and Th17 ou en lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Tregs sont des médiateurs clés de la tolérance immunitaire, limitant une réponse inflammatoire trop élevée (Lazar *et al.*, 2018). Ainsi le microbiote et les métabolites microbiens contribuent à la tolérance immunologique intestinale via les Treg et les IgAs.

En conclusion, il est clair que notre système immunitaire est réellement dépendant de ses interactions avec le microbiote intestinal pour sa maturation et son développement. De même la composition de ce microbiote est largement modulée par notre système immunitaire, ce qui renforce l'idée de coévolution et de coconstruction (Bazin, Chiu and Pradeu, 2022) entre l'hôte et son microbiote. Mais au-delà du système immunitaire, nous avons vu également qu'il existe une relation de codépendance au sein de l'holobionte que forment l'hôte et son microbiote. Un microbiote « sain » dans un corps sain donc. Cependant, que se passerait-il si la relation hôte-microbiote arrivait à se détériorer ? Quelles seraient les conséquences d'une rupture de symbiose ?

Partie II : Rupture de la symbiose hôte-microbiote

Dans le chapitre précédent, nous avons vu l'impact et l'importance que peut avoir notre microbiote intestinal sur notre santé et réciproquement. Le microbiote entretient ainsi une relation très étroite avec son environnement, appelée « symbiose », par l'intermédiaire de médiateurs et de métabolites. Cette symbiose peut être rompue par plusieurs facteurs. Dans ce chapitre, nous nous focaliserons sur les caractéristiques de cette rupture, appelée « dysbiose ». Nous jetterons un regard neuf sur les facteurs qui influencent notre microbiote et pouvant mener ainsi à la dysbiose.

1. Dysbiose : leurs et leurs

Il est fréquent d'entendre la célèbre citation d'Hippocrate datant de plus de 2000 ans, à un moment où le microbiote intestinal était méconnu, disant « Toute maladie commence dans l'intestin » et suggérant déjà l'idée que notre système gastro-intestinal joue beaucoup sur ce que nous sommes, pour notre bien-être. Hippocrate, père de la médecine occidentale moderne avait certainement raison de faire le parallèle entre intestin et maladie. En effet, les intenses recherches ces dernières années ont montré des relations d'association, de corrélation voire de causalité entre notre microbiote, colonisant notre système gastro-intestinal, et la survenue de certaines maladies métaboliques (Zhao, 2013; Doré and Blottière, 2015; van de Guchte, Blottière and Doré, 2018). L'apparition de ces pathologies est concomitante à celle de la dysbiose. Néanmoins, tout comme la question vieille comme le monde s'agissant de l'œuf et de la poule, il n'est pas encore clairement établi si la dysbiose est la cause ou une conséquence de la survenue d'une maladie.

La dysbiose peut se traduire de différentes manières, allant de la réduction de la richesse en gènes du microbiote jusqu'à la réduction de sa diversité. Elle peut également se traduire par une réduction de la production de métabolites fermentaires comme les AGCC, ainsi qu'un maintien d'une inflammation de bas grade. Rappelant le principe d'Anna Karenine, il est important de préciser qu'il n'existe pas une dysbiose mais des dysbioses, tant les communautés bactériennes impactées dans les différentes maladies métaboliques sont différentes les unes des autres. Ce qui rend aujourd'hui la tâche difficile pour cerner les contours de ce que l'on appelle dysbiose. Mais nous allons partir sur des consensus scientifiques pour mieux saisir les leurs (ce qui est une dysbiose ou pas) et leurs (sur quels piliers agir pour la prévenir) d'une dysbiose.

Levy et al. (2017) ont articulé la dysbiose autour de trois catégories, à savoir « une augmentation des pathobiontes, la perte de commensaux ou la perte de diversité ». Vangay et al. (2015), de leur côté, distinguent quatre types de dysbiose, à savoir « la perte de taxons pionniers, la perte

de diversité, les changements de capacité métabolique ou la prolifération d'agents pathogènes ». Toutefois, nous articulons notre réflexion sur la dysbiose autour de deux catégories : une dysbiose taxonomique mettant l'accent essentiellement sur la variation de commensaux et de diversité, de même que sur la prolifération des pathogènes, et une dysbiose fonctionnelle.

Par dysbiose taxonomique, il est entendu une composition altérée, une réduction de la diversité et de la richesse du microbiote intestinal. La réduction de la diversité microbienne peut être observée à différents niveaux taxonomiques tels que le phylum, la famille, le genre ou même l'espèce (DAS and Nair, 2019). Dans un contexte d'obésité, l'équipe de J.I. Gordon a été la première à montrer une abondance plus élevée des Firmicutes par rapport aux Bacteroidetes chez des personnes et des souris obèses comparées à celles avec un poids normal pondéré (Ley *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2006) . Le ratio Firmicutes/Bacteroidetes (F/B) servira ainsi de marqueur de la dysbiose pendant des années chez les sujets obèses. Cependant, d'autres études chez l'Homme et les rongeurs n'ont rapporté aucune différence dans le rapport F/B chez les personnes souffrant d'obésité par rapport aux contrôles, aucun effet de la perte de poids sur le rapport F/B, ou même un rapport F/B inversé chez les personnes en situation d'obésité (Zhao, 2013). Ces études, basées sur le séquençage des ARNr16S bactériens, suggèrent ainsi que le ratio F/ B n'est pas assez robuste comme marqueur de la dysbiose dans un contexte d'obésité. Le Chatelier *et al.* (2013) ainsi que Cotillard *et al.*(2013) ont, quant à eux, montré, grâce à une méthodologie plus discriminante (métagénomique quantitative), une association négative entre la richesse du microbiote (en gènes et en bactéries) et l'obésité, suggérant une réduction de la diversité chez les personnes en situation d'obésité. Toutefois, une richesse en gènes comparable à celle de personnes normopondérales a été également observée chez certains individus en situation d'obésité. D'autres études rapportent que la réduction des bactéries bénéfiques telles que *Bifidobacterium* et les bactéries productrices de butyrate, ainsi que l'augmentation des bactéries pro-inflammatoires/pathogènes comme *Desulfovibrionaceae*, sont systématiquement associées au développement de l'obésité, du tissu adipeux et de l'inflammation systémique et des comorbidités métaboliques chez l'Homme (Qin *et al.*, 2012; Vrieze *et al.*, 2012) et les rongeurs (Zhang *et al.*, 2010). Une augmentation de l'abondance de *Fusobacterium nucleatum* est également signalée dans des contextes de cancer colorectal (Borowsky *et al.*, 2021). De même, *Escherichia coli* productrice de colibactine induit des dommages à l'ADN et favorise le cancer colorectal. Un niveau modéré de dysbiose dans le microbiote intestinal est également observé dans le diabète de type 2. Les espèces bactériennes codant pour les fonctions de

synthèse du butyrate sont réduites chez ces patients, tandis que l'abondance des pathogènes opportunistes est augmentée (Qin *et al.*, 2012; DAS and Nair, 2019).

Malgré la forte variabilité interindividuelle du microbiote, des fonctions « essentielles », stables, sur lesquelles différents organismes convergent sont conservées d'un individu à un autre. Les analyses taxonomiques entre les groupes de malades sont souvent incapables de révéler des motifs de variation communs, mais lire la dysbiose sous un prisme fonctionnel peut aider à mieux comprendre et à déceler des motifs constants d'une dysbiose. En effet, une dysbiose fonctionnelle dans l'intestin est observée chez les patients atteints du syndrome de l'intestin constipé-irritable (C-IBS). Les fonctions microbiennes associées à la réduction des sulfates sont enrichies tandis que les fonctions impliquées dans la production de lactate sont réduites chez les patients C-IBS (C. Chassard *et al.*, 2012). Liping Zhao *et al.* (2018) ont également montré que les maladies chroniques telles que le diabète de type 2 sont associées à une réduction de la production d'AGCC.

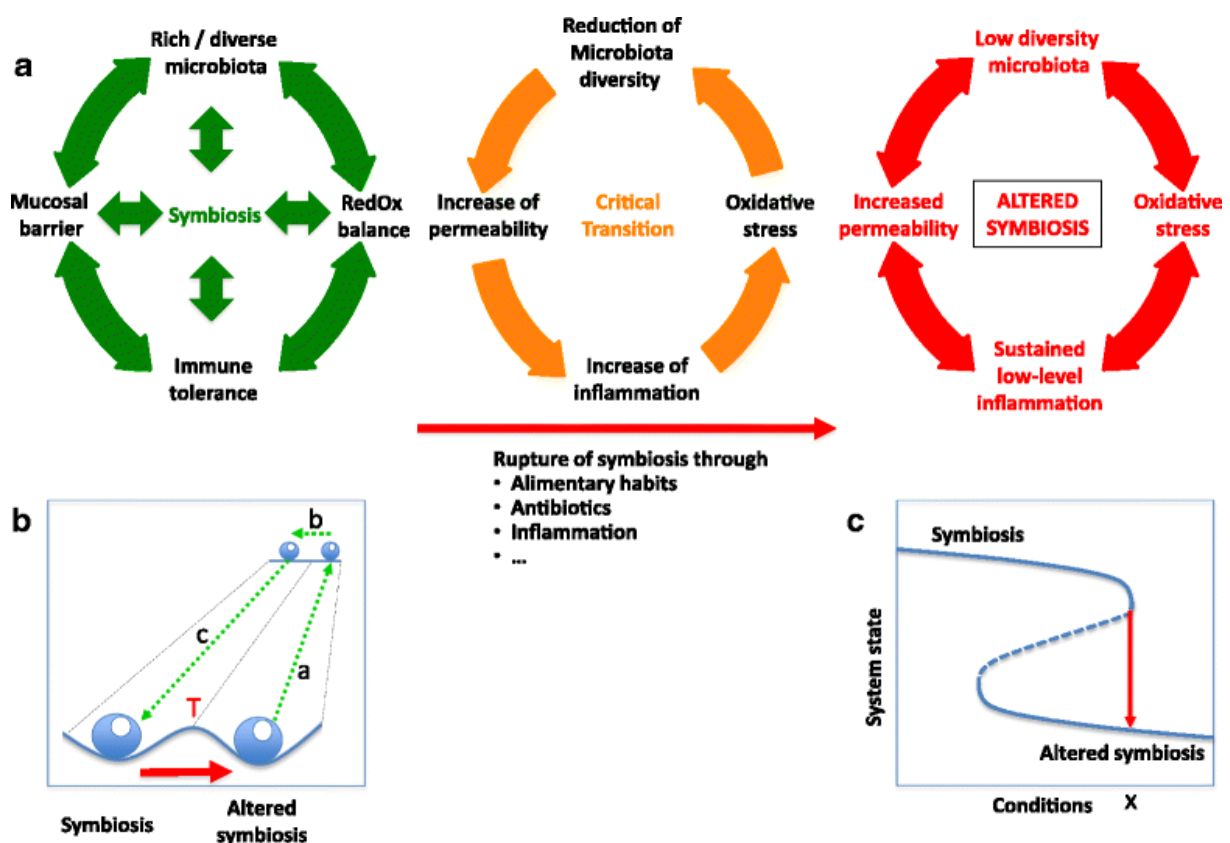


Figure 8: États stables alternatifs et transition critique dans la symbiose microbiote intestinale-hôte (Van Guchte *et al.*, 2018)

En somme, il est bien établi une association entre la dysbiose, qu'elle soit taxonomique et/ou fonctionnelle, et la survenue de maladies métaboliques. Pour certaines maladies, l'association

va au-delà de la corrélation, et met en exergue une relation de causalité en accord avec le postulat de Koch (Zhao, 2013). Néanmoins, de nouvelles études montrent que la relation hôte-microbiote n'est pas manichéenne, avec la symbiose d'un côté et la dysbiose de l'autre. Il existe, en fait, un état de transition critique. Van Guchte et al (2018) appliquent au microbiote un concept utilisé en écologie. Schématiquement, les états stables alternatifs sont souvent représentés comme des perles dans les vallées d'un paysage (Fig. 8b). À partir de cette représentation, il est intuitivement clair que lorsqu'un système est poussé à ses limites, il peut atteindre un « point de basculement (T) » (Fig. 8b) d'où il peut facilement être propulsé dans un état différent. Une telle transition d'état est également appelée « transition critique » ou « transition catastrophique », ce qui signifie que ramener les conditions à celles qui régnaient avant le changement n'est pas suffisant pour ramener le système à son état d'origine (Fig. 8c). L'état original et le nouvel état sont donc des états stables alternatifs, des états stables différents qui peuvent exister dans les mêmes conditions externes. Ainsi, dans l'écosystème intestinal, peut résider un état stable alternatif où le microbiote et l'hôte sont dans un cercle vicieux entretenant un nouvel équilibre pathologique (Fig. 8a).

En conclusion, la définition de la dysbiose d'un point de vue taxonomique est aujourd'hui très vague, à tel point que toute modification taxonomique pourrait être assimilée à une dysbiose. Il semble donc important de faire le lien entre les modifications taxonomiques et fonctionnelles pouvant mener à, ou entretenir, des maladies dans un cercle vicieux. De là, réside peut-être l'intérêt de faire appel au postulat de Koch, et de le revisiter pour établir des relations de causalité entre la dysbiose et les maladies.

2. Le microbiote : entre fragilité et plasticité

La littérature et les données scientifiques révèlent aujourd'hui toute la splendeur du microbiote et son importance pour notre santé. Mais elles révèlent également la fragilité de ce microbiote, en ce sens où plusieurs facteurs peuvent influencer sa composition, sa diversité et son métabolisme, pouvant mener à une dysbiose. Ces facteurs qui donnent les contours de notre microbiote débutent dès la grossesse (Michel and Blottière, 2022).

Des études montrent qu'un indice de masse corporelle (IMC) maternel élevé pendant la grossesse augmente la vulnérabilité de l'enfant à l'obésité et au diabète plus tard dans sa vie, en raison d'un microbiote altéré de la mère qui peut être transmis à l'enfant (Mehta, Kruger and Sokol, 2012; Gaillard *et al.*, 2013; Tang and Marroquin, 2022). Une alimentation riche en gras, le surpoids/obésité maternel avant la grossesse et le gain de poids gestationnel excessif provoquent la variation de taxons distinctifs dans la diversité microbienne de l'intestin maternel,

notamment ceux des *Lachnospira*, *Parabacteroides*, *Christensenellaceae*, *Bifidobacterium* et *Blautia*. De plus, il a été montré une diminution des taux d'*Akkermansia muciniphila*, *Staphylococcus* et *Clostridium difficile* chez les enfants des mères ayant un IMC normal durant la grossesse (Sarkar *et al.*, 2021).

Le mode d'accouchement a aussi une influence sur la composition et sur la diversité du microbiote intestinal. En effet, des études ont montré que les enfants nés par voie basse possèdent une structure et une composition de leurs microbiotes améliorées par rapport à ceux nés par césarienne. D'après ces études, les enfants nés par césarienne présentent une composition significativement plus faible en *Bifidobacterium* et une composition plus élevée en *Lactobacillus*, *Veillonella* et *Klebsiella* (Ngowi *et al.*, 2021). De même, au cours de la première semaine de vie, on retrouve, chez les nourrissons nés par voie basse, les genres bactériens en commun avec les communautés intestinales de leur mère tels que *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* et *Escherichia/Shigella* à une proportion plus élevée que celle des nourrissons nés par césarienne (Bäckhed *et al.*, 2015). L'allaitement a également un impact sur l'abondance de plusieurs taxons, en particulier les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacteria*. Ces derniers peuvent utiliser les oligosaccharides présents dans le lait maternel pour leur croissance (Sugino, Paneth and Comstock, 2019).

Outre les facteurs liés à la grossesse, au mode d'accouchement ainsi que l'allaitement, les facteurs génétiques jouent aussi un rôle important sur le modelage de la composition et la diversité du microbiote intestinal. Fan *et al.* (2020) rapportent que la génétique de l'hôte façonne le microbiote intestinal via deux mécanismes clés, notamment le polymorphisme nucléotidique des gènes codant pour la mucine et l'interaction microbes-microbes. Cependant, une étude menée sur une cohorte de 1046 individus sains a montré que l'environnement joue un rôle nettement plus important que la génétique de l'hôte dans la formation du microbiote intestinal humain (Rothschild *et al.*, 2018). Les substances chimiques utilisées dans la vie quotidienne et l'hygiène ont des effets importants sur l'abondance et la richesse de notre microbiote. En outre, notre mode de vie, tel que l'usage de la cigarette, l'alcool ainsi que l'activité physique influencent la composition de notre microbiote (Schmidt, Raes and Bork, 2018).

Les antibiotiques ont été d'un grand secours pour l'humanité, notamment entre les deux guerres, depuis leur découverte par Alexandre Fleming en 1928. Cependant, leur utilisation abusive dans nos sociétés modernes a ouvert la voie à une antibiorésistance massive posant ainsi un problème de santé majeure. L'utilisation d'antibiotiques peut aussi avoir des effets négatifs sur le microbiote intestinal entraînant une réduction de la diversité des espèces (y compris la perte de

certaines taxons importants), une altération de l'activité métabolique et la sélection d'organismes résistants aux antibiotiques. En outre, elle augmente la sensibilité de l'intestin à la colonisation par des pathogènes et stimule le développement de la résistance bactérienne aux antibiotiques pouvant entraîner des diarrhées et des infections récurrentes à *Clostridioides difficile* (Ramirez *et al.*, 2020). Il a été également montré que l'utilisation d'antibiotique à large spectre comme la clindamycine, même à court terme (7 j), pouvait entraîner une perte persistante (jusqu'à 2 ans) de la diversité des *Bacteroides* (Jandhyala *et al.*, 2015).

3. Alimentation, fibres et microbiote

Le gastronome français Anthelme Brillat-Savarin disait dans son livre « Physiologie et goût » : « Dis-moi ce que tu manges, je te dirai ce que tu es ». Cette citation pourrait être bien applicable à notre microbiote intestinal, tant, au fil des années, les recherches ont montré l'impact important de notre alimentation sur notre microbiote et sur notre Santé. Nos modes de vie actuels, caractérisés par une quête acharnée et constante d'une efficacité optimale en un temps record, ont changé drastiquement nos habitudes alimentaires dans une société capitaliste et consumériste. Ce faisant, notre alimentation, jadis riche en fibres végétales, est troquée au profit d'une restauration rapide ultra-transformée et calorique, pauvre en fibres, riche en gras, en protéines et en sucres raffinés. Ces nouvelles habitudes alimentaires, propres aux pays occidentalisés, s'inscrivent dans le « Western diet » décrit par Denis P Burkitt dès 1973 (Burkitt, 1973), et ne sont pas sans conséquences sur notre microbiote intestinal et sur la relation que nous entretenons avec ce dernier (Perler, Friedman and Wu, 2022). L'incidence des maladies métaboliques a augmenté, ainsi que les maladies cardio-vasculaires.

Des expériences réalisées chez la souris avec un régime riche en gras ont montré une diminution de Bacteroidetes et une augmentation des Firmicutes et Proteobacteria. De même, les conséquences métaboliques des régimes riches en gras ne sont pas observées chez les souris axéniques (sans germe) suggérant que le microbiote intestinal est un médiateur important du dysfonctionnement métabolique induit par ce régime (Rabot *et al.*, 2010). D'autres études montrent également qu'un régime riche en gras a entraîné une diminution du genre *Prevotella* par rapport à un régime pauvre en graisses/riche en carbohydrates. Une réduction significative de l'acide lactique et des entérocoques a été aussi observée chez des souris nourries avec un régime gras. Tandis qu'une autre étude révèle que les entérobactéries, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Shigella* sont également présentes à des niveaux plus élevés dans le groupe à régime riche en graisses (Beam, Clinger and Hao, 2021). Ces recherches constituent une constellation de preuves montrant une corrélation entre un régime riche en gras et les modifications du

microbiote intestinal. Le régime alimentaire riche en gras que nous retrouvons dans notre alimentation actuelle peut être divisé en acides gras saturés et insaturés selon l'absence ou la présence, respectivement, de doubles liaisons entre les molécules de carbone. Les graisses saturées, en particulier, ont été corrélées à une modulation négative du microbiote. Les régimes alimentaires contenant ces graisses comme composant principal réduisent systématiquement l'abondance des microbes bénéfiques pour la santé, tels que *Bifidobacterium*, *Bacteroidetes*, *Prevotella* et *Lactobacillus* (Figure 9), et favorisent la croissance de *Bilophila* pro-inflammatoire (Moszak, Szulińska and Bogdański, 2020; Ramos and Martín, 2021).

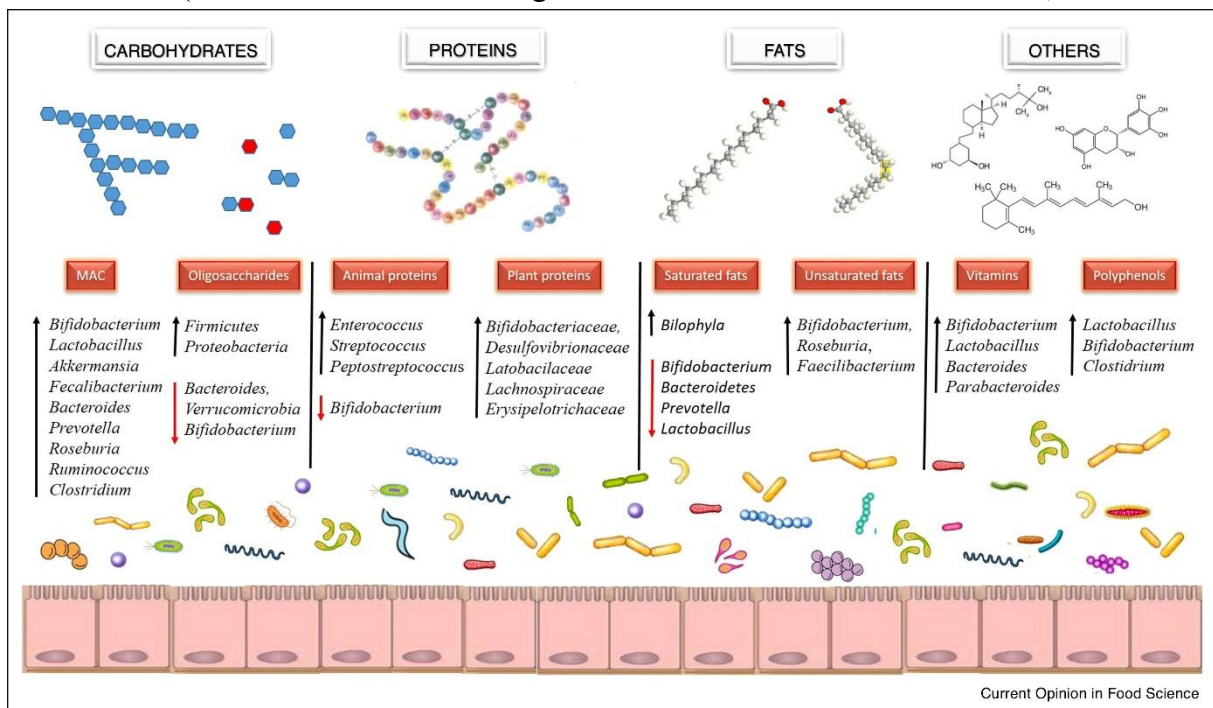


Figure 9: Aperçu des principaux effets des composés alimentaires sur la composition du microbiote intestinal (Ramos et Martin, 2021).

Outre un régime riche en gras, les protéines alimentaires modulent également la composition microbienne et la production de métabolites, les acides aminés fournissant aux microbes intestinaux le carbone et l'azote essentiels. Le catabolisme des acides aminés dans l'intestin produit de nombreux métabolites qui affectent la physiologie de l'hôte. En outre, les régimes riches en protéines représentent une approche diététique populaire pour induire une perte de poids chez les humains. Les données de nombreux essais convaincants sur des rongeurs démontrent une forte atténuation ou une prévention totale de l'obésité induite par un régime riche en graisses lorsque le régime contient un rapport protéines/glucides élevé (Madsen *et al.*, 2017). Toutefois, il a été montré que le microbiote intestinal était capable de convertir des composants de différentes sources de protéines en composés pouvant être liés au développement de maladies. Par exemple, la L-carnitine et la phosphatidylcholine, présentes

dans les viandes rouges et les œufs, peuvent être métabolisées en triméthylamine et en oxyde de triméthylamine (TMAO). Chez l'homme, les niveaux circulants de TMAO seraient associés à un risque accru de développement de l'athérosclérose (Madsen *et al.*, 2017). Néanmoins, la source de protéines alimentaires, animales ou végétales, détermine ses effets sur la composition du microbiote intestinal. Une étude menée par Kostovcikova et al (2019) montre que les régimes à base de protéines animales entraînent une augmentation de l'abondance relative des genres *Enterococcus* et *Streptococcus*.

Les fibres alimentaires qui parviennent au colon et servent de substrats pour les microorganismes intestinaux, proviennent de céréales, légumes, légumineuses et de fruits que nous consommons. Ce sont essentiellement des polysaccharides constitutifs des parois végétales, de l'amidon résistant (glucide de réserve énergétique), des gommes et des oligosaccharides non digestibles (Flint *et al.*, 2012) dont les caractéristiques physico-chimiques sont regroupées dans le tableau 1. En 2009, la commission du Codex alimentarius (FAO/OMS) a défini les fibres alimentaires comme étant des polymères glucidiques comportant 10 monomères ou plus, et qui ne sont pas hydrolysés par les enzymes endogènes de l'homme ni absorbées au niveau de l'intestin grêle (Jones, 2014). Toutefois, la décision d'inclure ou non des glucides de 3 à 9 unités monomères est laissée à l'appréciation des autorités locales de chaque pays. En Europe, la définition des fibres alimentaires inclut tout polymère avec un degré de polymérisation supérieur ou égal à 3 (Stephen *et al.*, 2017).

Tableau 1: Caractéristiques physico-chimiques des constituants des fibres alimentaires (Gill *et al.*, 2021).

Fibre type	Common sources	Physicochemical characteristics ^a		
		Solubility	Viscosity	Fermentability
Cellulose	All green plant cell walls	Insoluble	Non-viscous	Low
Lignins	All green plant cell walls	Insoluble	Non-viscous	Low
Arabinoxylans	Wheat, psyllium ^b	Low to medium	Medium	High ^b
β-Glucans	Oat, barley, fungi	Low to medium	Medium to high	High
Galactomannans	Guar gum, fenugreek	Medium to high	Medium to high	High
Pectins	Fruits, vegetables, legumes	High	Medium to high	High
Inulin	Cereals, fruits, vegetables	Medium to high	Low to high	High
Galacto-oligosaccharides	Pulses (e.g. beans, peas, lentils)	High	Low	High
Dextrins	Cereals (e.g. wheat dextrins)	High	Non-viscous to low	High
Alginate	Seaweed	High	High	Low
Methylcellulose	Synthesized	High	High	Non-fermentable
Resistant Starch				
RS-1 (physically inaccessible)	Whole grains, legumes, raw fruits, vegetables	Insoluble	Non-viscous	High
RS-2 (starch conformation)	Cereals, raw legumes, raw fruits, vegetables	Low	Non-viscous	High
RS-3 (retrograded)	Cooking and cooling of any starch source	Low	Non-viscous to low	High
RS-4 (chemically modified)	Synthesized (e.g. acylated starches)	Low to high	Low to medium	High
RS-5 (starch-lipid complex)	Synthesized (e.g. amylose and stearic acid)	Low	Low	Low

Les fibres pariétales sont constituées de cellulose, hémicelluloses, pectine et lignine qui forment une structure hétérogène, dense et très enchevêtrée, rendant sa dégradation par les bactéries intestinales plus difficile (Figure 10) (Gill *et al.*, 2021). La cellulose est un homopolymère de résidus D-glucose reliés par des liaisons glycosidiques de type β-1,4 organisés en microfibrilles et fibres dont la structure est maintenue par des liaisons hydrogène. Plus il y a de liaisons, plus la cellulose est cristalline et récalcitrante à la dégradation (Flint *et al.*, 2012). A ce jour, parmi les espèces bactériennes du microbiote intestinal, *Ruminococcus champanellensis* et *Bacteroides cellulosilyticus* ont été identifiées comme capables de dégrader la cellulose (Robert *et al.*, 2007; Chassard *et al.*, 2012). Le xylane est le constituant majeur des hémicelluloses. Il s'agit d'un hétéro-polysaccharide complexe, constitué d'une chaîne principale de résidus D-xylose reliés en β-1,4, substituée de façon variable en α-1,2 ou α-1,3 par différents résidus acetyl, L-arabinose, acide D-glucuronique, glucose méthylé (Figure 11A). Le nom du polymère

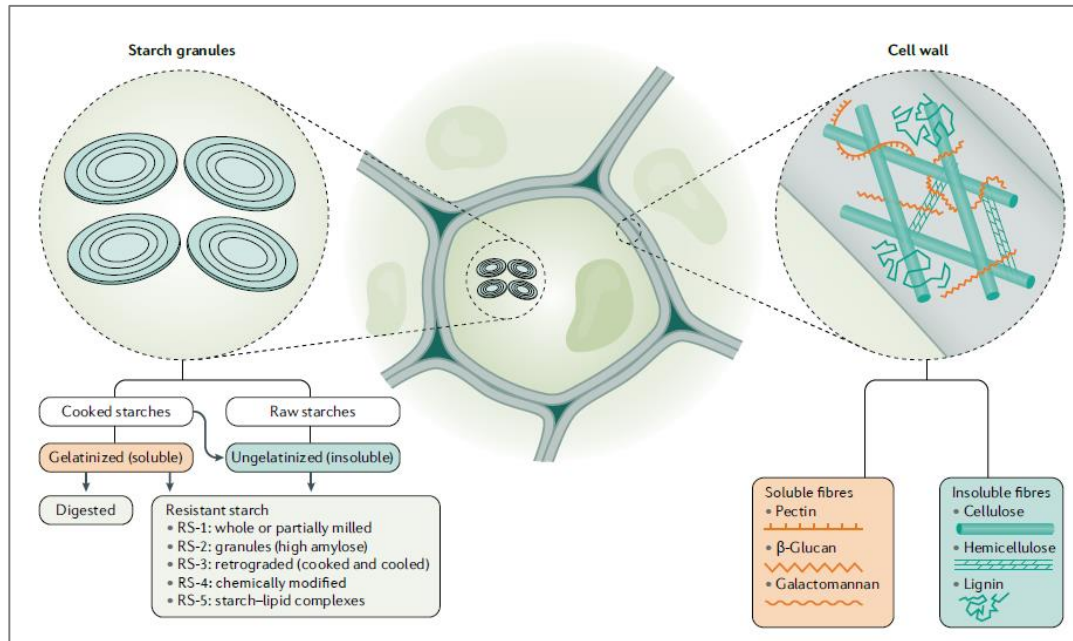


Figure 10: Composition des fibres alimentaires et localisation dans les cellules végétales (Gill et al., 2021)

de xylane tient compte de ses substitutions et de leur proportion. Des acides féruliques ou coumariques, présents sur la lignine, peuvent également se fixer par estérification sur les résidus arabinose du xylane et joueraient un rôle dans la liaison du xylane à la lignine (Scheller and Ulvskov, 2010).

D'autres polysaccharides solubles ou insolubles font partis des hémicelluloses. Parmi les fibres solubles, se trouvent les β -glucanes ou lichénanes (polymères de glucose qui ne diffèrent que dans leurs proportions et répartitions de liaisons β -1,2 et β -1,3) (Figure 11C), ainsi que les galactomannanes (polymère de D-mannoses reliés en β -1,4, substitués en α -1,6 par du D-galactose) qui servent de polysaccharides de réserve. Les xyloglucanes font partis des polysaccharides majoritaires des hémicelluloses. Ce sont des polymères de D-glucose (glucanes) reliés en β -1,4 et substitués par des D-xyloses reliés en α -1,6, pouvant eux-mêmes porter des résidus D-galactose ou L-fucose (Figure 11B). La laminarine est un β -1,3 glucane parfois substitué en β -1,6 par des résidus glucose, et provient de certaines algues.

Les pectines sont des fibres solubles, ubiquitaires, et constituées d'un ensemble de polymères hétérogènes complexes lui conférant la plus grande diversité de résidus osidiques et de liaisons glycosidiques parvenant au colon. Ce sont des hétéro-polysaccharides composés majoritairement d'acides D-galacturoniques reliés en β -1,4 sur lesquels se branchent plusieurs types de chaînes latérales formant des homogalacturonanes et rhamnogalacturonanes (types I et II). Les pectines confèrent à la plante une résistance mécanique et sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire comme gélifiant. Ces structures varient avec l'origine de la plante, sa localisation et méthode d'extraction (Rastall *et al.*, 2022).

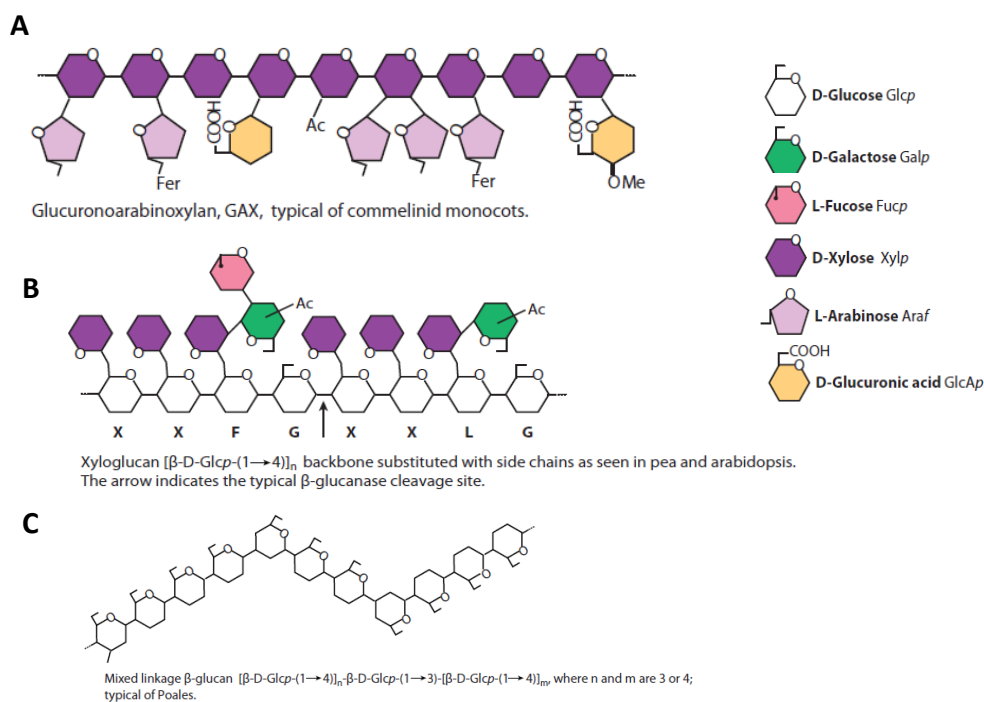


Figure 11: Structure schématique d'un type d'arabinoxylanes (A), du xyloglucane (B) et des β -glucanes (C) (Scheller and Ulvskov, 2010).

Enfin, la lignine est un ensemble de polymères phénoliques insolubles, de haut poids moléculaire, impliqués dans la rigidité de la paroi végétale et peu dégradé par les bactéries intestinales.

Ansi, une très grande variété de structures moléculaires glucidiques atteint le colon au cours de la digestion et sert de substrats pour le microbiote intestinal, fédérant les microorganismes en chaîne trophique dans le colon pour dégrader efficacement ces fibres grâce à des activités enzymatiques et des voies métaboliques complémentaires (Figure 12). Le résultat de la dégradation des fibres par les espèces bactériennes fibrolytiques du colon, et de la fermentation des oligosaccharides générés, aboutit à la production des AGCC, acétate, butyrate et propionate, produits finaux du métabolisme des fibres alimentaires dans le colon, et à des gaz réutilisés par

d'autres espèces, hydrogénotrophes, ou excrétés par l'hôte (50% de la population étant méthano-excrétrice) (Mosoni, 2014; Doré *et al.*, 2017).

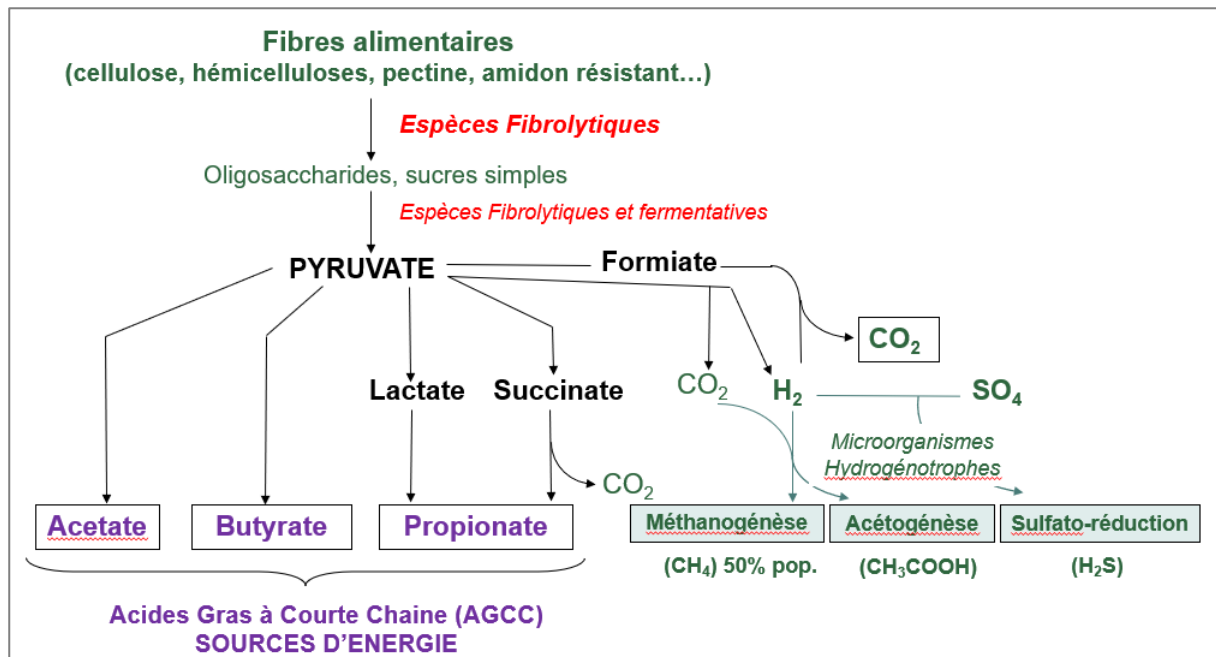


Figure 12: Chaîne trophique dans l'écosystème colon humain (adapté de Mosoni, 2014, et Doré *et al.*, 2017).

Les AGCC sont absorbés par l'hôte et utilisés comme source d'énergie, mais ont également une variété d'effets physiologiques distincts dont nous avons donné un aperçu précédemment. L'un des principaux AGCC, l'acétate, peut être produit à partir du pyruvate par de nombreuses bactéries intestinales acétogènes comme *Blautia hydrogenotrophica* soit via l'acétyl-CoA, soit via la voie de Wood-Ljungdahl dans laquelle l'acétate est synthétisé via deux branches : (1) la branche du méthyle également appelée branche orientale via la réduction du CO₂ en formiate et (2) la branche du carbonyle ou branche occidentale via la réduction du CO₂ en CO, qui est en outre combiné avec un groupe méthyle pour produire de l'acétyl-CoA (Figure 13). Le propionate, quant à lui, est produit à partir de la conversion du succinate en méthylmalonyl-CoA via la voie du succinate qu'utilisent les Bacteroidetes et quelques Firmicutes. Le propionate peut également être synthétisé à partir d'acrylate avec du lactate comme précurseur par la voie de l'acrylate et par la voie du propanediol, dans laquelle les sucres désoxyhexoses (tels que le fucose et le rhamnose) sont des substrats. Le butyrate, un des AGCC majeurs dans l'intestin, est formé à partir de la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA et de la réduction subséquente en butyryl-CoA, qui peut être converti en butyrate via la voie dite classique, par la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase. Le butyryl-CoA peut également être transformé en butyrate par la voie butyryl-CoA: acétate CoA-transférase. Certains microbes

de l'intestin peuvent utiliser à la fois le lactate et l'acétate pour synthétiser le butyrate, empêchant ainsi l'accumulation de lactate et stabilisant l'environnement intestinal (Koh *et al.*, 2016).

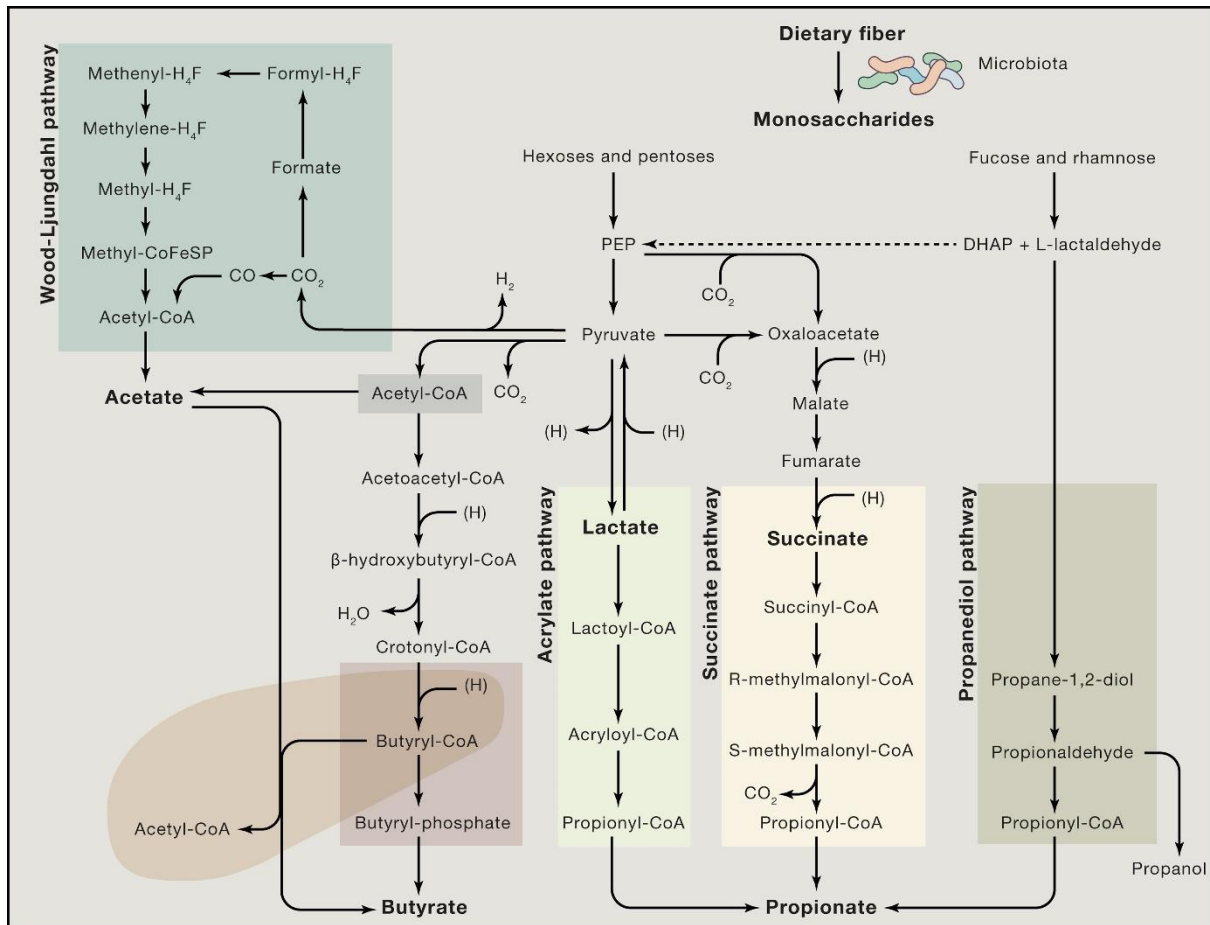


Figure 13: Voies de biosynthèse des AGCC à partir de la fermentation des fibres végétales (Koh *et al.*, 2016)

La dérégulation du métabolisme des AGCC pourrait être associée à plusieurs maladies métaboliques notamment le diabète de type 2, l'obésité ainsi que la stéatose hépatique non alcoolique. En effet, l'abondance des bactéries productrices d'AGCC, de même que les AGCC, sont réduits dans les échantillons fécaux de souris dysmétaboliques et chez l'Homme en contexte d'obésité et de diabète (Zhao *et al.*, 2018). De très nombreuses études ont démontré les relations bénéfiques entre la consommation de fibres et la santé. L'impact des fibres végétales sur le microbiote intestinal dépend de la source, du type de molécules, des liaisons, de la longueur de la chaîne, de la taille des particules et de l'association avec d'autres composés des fibres végétales (protéines, polyphénols...). De même la solubilité, la viscosité et la fermentescibilité impactent également l'utilisation de ces fibres végétales par le microbiote intestinal, et le temps de transit dans l'intestin.

Une diversité de fibres dans l'alimentation favorisera une population bactérienne richement diversifiée et potentiellement plus stable. Ceci est crucial pour maintenir une couche de mucus colique saine qui joue un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes, la protection des cellules intestinales contre les dommages mécaniques et chimiques et le maintien de l'homéostasie intestinale. Une diversité accrue de fibres alimentaires améliore la diversité et éventuellement la stabilité du microbiote intestinal (Figure 14), et s'accompagne d'une diminution de certaines bactéries dégradant le mucus, et d'une couche de mucus rétablie (Thomson, Garcia and Edwards, 2021).

Les études comparatives des microbiotes intestinaux de personnes vivant en milieu rural ou dans les sociétés industrialisées soulignent l'importance de l'alimentation, notamment les fibres

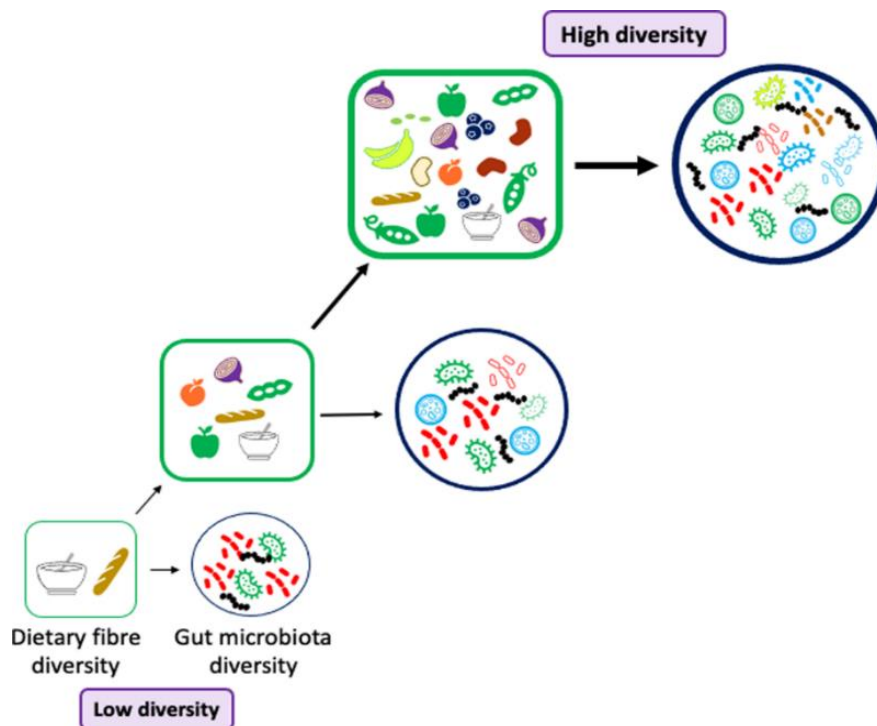


Figure 14: Relation entre diversité des fibres alimentaires et diversité du microbiote intestinal (Thomson et al, 2021)

végétales, sur le microbiote intestinal. Par exemple, les microbiotes d'enfants issus de milieu rural Burkinabé ont une abondance des genres *Prevotella* et *Xylanibacter* plus élevée que des enfants italiens et des niveaux plus élevés d'AGCC fécaux (De Filippo *et al.*, 2010). Dans le même sillage, Schnorr *et al.*, (2014) souligne une diversité et une richesse microbienne élevée chez les Hadza, une tribu de chasseurs-cueilleurs en Tanzanie, comparé aux microbiotes intestinaux d'Italiens vivant en zone urbaine. Ces résultats sont consolidés par ceux de Wibowo *al* (2021) qui montrent une ressemblance entre le microbiote issu de selles vieilles de plus de 1000 ans et celui de personnes vivant dans des zones non-industrialisées dont la diversité

microbienne est réduite (Figure 15). La prévalence plus élevée de certaines espèces et de gènes dégradant le mucus dans les microbiomes industrialisés que dans les microbiomes anciens et non industrialisés est probablement due aux régimes alimentaires occidentaux, qui manquent souvent de fibres alimentaires suffisantes pour soutenir les espèces microbiennes, autrefois nombreuses, dégradant les fibres (Olm and Sonnenburg, 2021).

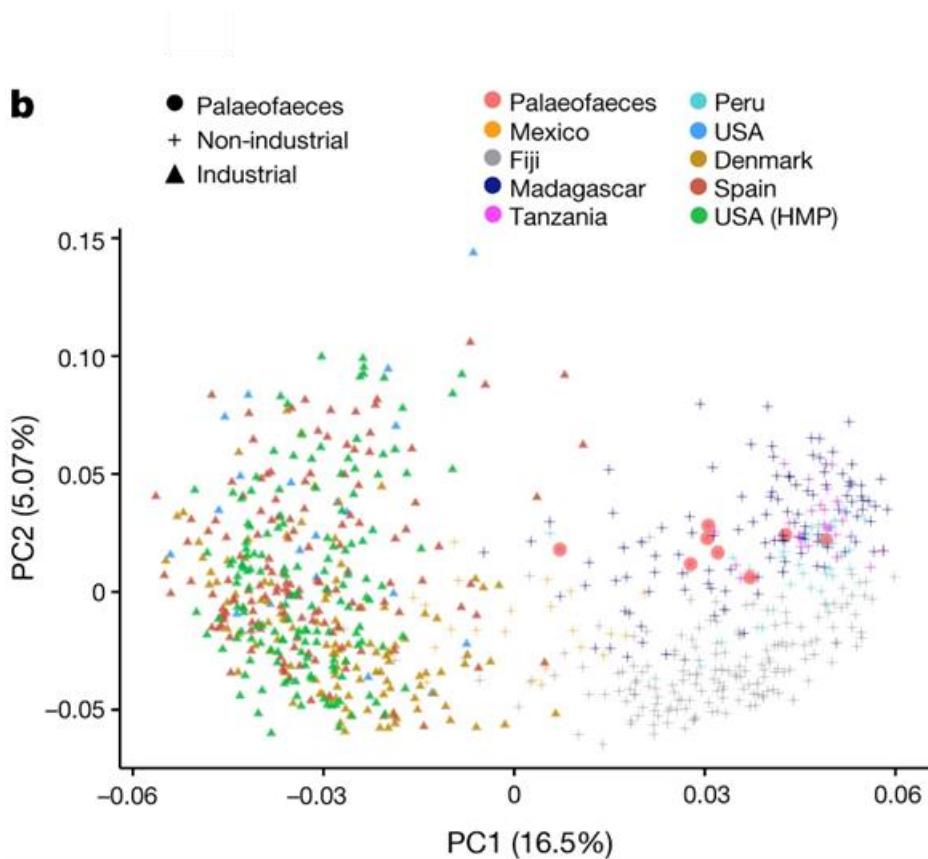


Figure 15: Comparaison des microbes intestinaux humains anciens et modernes de pays industrialisés ou non (Wibowo et al, 2021)

4. CAZymes : diversité et spécificités

Le génome humain ne contient que 17 enzymes digestives permettant la dégradation du saccharose, du lactose (le sucre du lait) et de l'amidon (Kaoutari et al., 2013). En revanche, la grande diversité de polysaccharides de notre alimentation est principalement digérée par environ 16000 enzymes spécialisées, codées par les gènes du microbiote intestinal et faisant partie des Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes), dont 9000 gènes impliqués dans le métabolisme des fibres végétales complexes (Kaoutari et al., 2013; Holscher, 2021).

Les CAZymes sont classées en différentes familles en fonction des similitudes de séquences d'acides aminés, des replis protéiques et des mécanismes hydrolytiques (Patrascu *et al.*, 2017; Drula *et al.*, 2022). Depuis 1998, ces CAZymes sont répertoriées dans une base de données accessible en ligne (www.cazy.org), et classées en 5 catégories : les Glycoside-Hydrolases (GH), les Polysaccharide-Lyases (PL), les Carbohydrate-Estérases (CE), les Glycosyl-Transférases (GT) et les Auxiliary Activities (AA). Les GH, les PL et les CE sont particulièrement impliquées dans la dégradation des fibres végétales. La BD CAZy comporte actuellement 174 familles de GH, classées selon leur homologie de séquences, dont plus de 80 impliquées dans la dégradation des fibres. Les GH représentent la classe la plus importante et la plus étudiée. Leur structure protéique peut être modulaire, et intégrer des modules de liaison aux polysaccharides (CBM) qui permettent d'augmenter l'efficacité de l'enzyme en la rapprochant de son substrat. Les enzymes d'une même famille peuvent être monospécifiques, ou polyspécifiques et il existe une redondance fonctionnelle entre les enzymes classées dans différentes familles. Leur mode d'action peut être de type « endo » ou « exo » selon la façon d'initier l'hydrolyse de la fibre (à l'intérieur ou à son extrémité). Le tableau 2 indique différentes bactéries de l'intestin et leurs familles d'enzymes impliquées dans la dégradation des fibres (Ye *et al.*, 2022).

Tableau 2: Familles probables de CAZymes impliquées dans la dégradation de polysaccharides végétaux chez les bactéries intestinales (adapté de Ye *et al.*, 2022)

Fibres	Enzymes	CAZymes	Microbiote intestinal
Arabinoxylane	Xylanase (EC 3.2.1.8 and EC 3.2.1.32), α -glucuronidase (EC 3.2.1.139), α -(1,2)-glucuronosidase (EC 3.2.1.131), α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), β -xylosidase (EC 3.2.1.37), feruloyl esterase (EC 3.1.1.73), acetyl xylan esterase (EC 3.1.1.72)	GH3, GH5, GH8, GH10, GH11, GH26, GH30, GH39, GH43, GH51, GH52, GH54, GH62, GH67, GH115, GH141, CE1, CE2, CE4, CE6, CE7	<i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides xylanisolvans</i> , <i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , <i>Prevotella copri</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Roseburia intestinalis</i> , <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Ruminococcus champanellensis</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i>
Xyloglucane	Xylosidase (EC 3.2.1.37), endoglucanase (EC 3.2.1.4), β -D-galactosidase	GH1, GH2, GH5, GH7, GH12, GH16,	<i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides xylanisolvans</i> ,

	(EC 3.2.1.23), xyloglucan endo- β -(1,4)-glucanase (EC 3.2.1.151), oligoxyloglucan β -glycosidase (EC 3.2.1.120)	GH42, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74, GH147, GH165	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , <i>Prevotella copri</i> , <i>Ruminococcus champanellensis</i>
Mannane	β -mannanase (EC 3.2.1.78), β -mannosidase (EC 3.2.1.25), β -glucosidase (EC 3.2.1.21), α -galactosidase (EC 3.2.1.22), acetyl mannan esterase	GH1, GH2, GH4, GH5, GH26, GH27, GH36, GH57, GH97, GH110, GH113, GH134, GH164, CE17	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides xylanisolvans</i> , <i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Roseburia intesinalis</i> , <i>Ruminococcus champanellensis</i>
β-Glucan	Licheninase (EC 3.2.1.73), endoglucanase (EC 3.2.1.4), exo- β -(1,3)-glucanases (EC 3.2.1.58), endo- β -(1,3)-glucanases (EC 3.2.1.6 and EC 3.2.1.39)	GH5, GH6, GH7, GH8, GH9, GH10, GH12, GH16, GH17, GH26, GH44, GH45, GH48, GH51, GH55, GH64, GH81, GH128, GH158	<i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides xylanisolvans</i> , <i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , <i>Prevotella copri</i> , <i>Ruminococcus champanellensis</i> , <i>Akkermansia muciniphila</i>
Rhamnogalacturonan (RG) and side chains	RG lyase (EC 4.2.2.23), RG exolyase (EC 4.2.2.24), RG hydrolase (EC 3.2.1.171), unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase (EC 3.2.1.172), RG acetyl esterase (EC 3.1.1.86), RG rhamnohydrolase (EC 3.2.1.174), RG galactohydrolase, α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), endoarabinase (EC 3.2.1.99), β -galactosidase (EC 3.2.1.23), endogalactanase (EC 3.2.1.89), feruloyl esterase (EC 3.1.1.73) p-coumaroyl esterase	GH2, GH28, GH35, GH42, GH43, GH51, GH53, GH54, GH78, GH88, GH93, GH95, GH105, GH106, GH127, GH146, GH147, PL1, PL3, PL4, PL9, PL10, PL11, PL26, CE1, CE12	<i>Bacteroides xylanisolvans</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , <i>Prevotella copri</i> , <i>Monoglobus pectinilyticus</i>
Inulin	Inulinase (EC 3.2.1.7 and EC 3.2.1.80), Inulin	GH32, GH91	<i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides xylanisolvans</i> ,

	fructotransferase (EC 4.2.2.17 and EC 4.2.2.18)		<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> , <i>Prevotella copri</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Eubacterium rectale</i>
Amidon résistant	α -amylase (EC 3.2.1.1), β -amylase (EC 3.2.1.2), glucoamylase (EC 3.2.1.3), α -glucosidase (EC 3.2.1.20), pullulanase (EC 3.2.1.41), isoamylase (EC 3.2.1.68)	GH4, GH13, GH14, GH15, GH31, GH57, GH63, GH97	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Roseburia intesinalis</i> , <i>Ruminococcus bromii</i>

Ces CAZymes (GH et PL) sont réparties dans différents phyla, plus particulièrement chez les Bacteroidota et les Firmicutes (Onyango *et al.*, 2021). Les espèces *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus* ont environ 6% de leurs gènes qui codent pour des GH et PL (contre 1-3% pour les autres bactéries intestinales) (Wardman *et al.*, 2022). Ces gènes sont parfois organisés en Polysaccharide Utilization Loci (PUL)(Terrapon *et al.*, 2018) spécialisés dans la dégradation du xylane, de la pectine ou d'autres polysaccharides représentatifs des fibres alimentaires, afin d'optimiser la captation de fibres, leur hydrolyse et l'internalisation rapide des produits de digestion des fibres. Différentes bactéries possèdent diverses capacités pour décomposer des molécules complexes en molécules simples. Ce processus de dégradation est contrôlé par une série de CAZymes dont la synthèse est modulée par notre alimentation. Une étude chez l'humain indique qu'un régime riche en fibres a entraîné une augmentation globale de la capacité à dégrader les fibres complexes à l'échelle de la cohorte (Wastyk *et al.*, 2021). Ainsi Wastyk et al. montrent d'une part que la consommation de fibres semble augmenter de manière constante l'abondance de CAZymes, et d'autre part que les changements taxonomiques qui entraînent ces augmentations peuvent différer d'un participant à l'autre. Les gènes de CAZymes peuvent d'ailleurs être acquis par transfert horizontal de gènes médié par transposons.

Partie III : Modulation du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est soumis à divers facteurs environnementaux qui influencent sa composition et sa diversité. Ces modifications, ou des modifications fonctionnelles, peuvent être associées ou même être la cause de maladies et syndromes métaboliques tels que le diabète de type 2 ou l'obésité (Zhao, 2013; Cani, 2017; Agus, Clément and Sokol, 2021). L'obésité est définie par l'OMS comme une accumulation anormale ou excessive de graisse, qui nuit à la santé. En 2017, plus de 4 millions de personnes mouraient chaque année des suites de surpoids ou d'obésité, selon une étude sur la charge mondiale de morbidité (WHO).

« Peut-on donc moduler le microbiote intestinal pour prévenir ou guérir ces maladies ? » est une question qui prend sens pour les scientifiques aussi bien que pour la société. Plusieurs stratégies sont ainsi proposées afin de prendre le meilleur parti de la plasticité du microbiote intestinal en fonction des situations. Parmi lesdites stratégies, la transplantation de microbiote fécal (FMT) fait partie des approches utilisées et étudiées pour le traitement de certaines maladies liées au microbiote intestinal, en modifiant significativement la composition du microbiote. Pour corriger la dysbiose, le microbiote intestinal d'un individu en bonne santé (exempt de pathogènes) est transféré par gastroscopie ou coloscopie vers celui d'un individu malade recevant un traitement antibiotique et/ou du polyéthylène glycol au préalable. Chez les patients atteints de *Clostridioides difficile*, il a été démontré que la modulation du microbiote par la FMT restaure l'écosystème perturbé et que l'effet est durable (Jalanka *et al.*, 2016). La FMT est décrite pour la première fois au quatrième siècle en Chine suite à une administration d'une suspension de fèces humaines à des patients souffrant d'intoxications alimentaires ou de diarrhée sévère (Zhang *et al.*, 2012). Au fil des siècles et des années, la FMT fut donc utilisée pour traiter diverses affections gastro-intestinales. Ce n'est qu'en 1983 que la FMT est utilisée pour traiter les infections à *Clostridioides difficile* (Schwan *et al.*, 1983).

Devant le succès de ce traitement, l'efficacité de la FMT est étudiée dans beaucoup d'autres contextes cliniques comme l'antibiothérapie, l'allergie, les IBD, les maladies auto-immunes et neuro-dégénératives (Vendrik *et al.*, 2020; Marrs and Walter, 2021). Dans le cas des maladies métaboliques, les bénéfices des études cliniques n'ont jusqu'à présent été que modérés et transitoires, et ont amélioré la sensibilité à l'insuline, l'adiposité abdominale, le métabolisme des lipides sans donner lieu à une perte de poids significative (Lahtinen *et al.*, 2022).

Outre la FMT, les prébiotiques semblent être également une approche prometteuse pour moduler le microbiote intestinal. En 1995, Glenn Gibson and Marcel Roberfroid introduisirent le « concept de prébiotiques ». Ils les définirent comme des ingrédients alimentaires non digestibles (plutôt glucidiques) qui ont un effet bénéfique sur l'hôte et sa santé, en stimulant

sélectivement la croissance et/ou l'activité d'une espèce ou d'un nombre limité d'espèces microbiennes déjà présentes dans le côlon. En 2004, la définition des prébiotiques est revue et inclut trois critères : (1) la résistance à l'hydrolyse par les enzymes de mammifères, à l'acidité gastrique et à l'absorption gastro-intestinale ; (2) une fermentation par le microbiote intestinal ; et (3) une stimulation sélective de la croissance et/ou de l'activité des microorganismes du microbiote associés à la santé et au bien-être (Holscher, 2017). En 2017, l'Association Scientifique Internationale pour les Probiotiques et Prébiotiques (ISAAP) introduit parmi les prébiotiques des substances non glucidiques, certaines non issues de l'alimentation, et un mode d'action au bénéfice d'autres régions du corps que le tractus digestif. La définition officielle est alors devenue « un substrat qui est utilisé sélectivement par les microorganismes de l'hôte et lui confère un bénéfice santé » (Gibson *et al.*, 2017). Dans un grand nombre d'études, l'effet bénéfique des prébiotiques concerne l'amélioration du système immunitaire soit par des effets directs tels que l'augmentation de l'expression de cytokines anti-inflammatoires, et la réduction de cytokines pro-inflammatoires (Shokryazdan *et al.*, 2016), soit par des effets indirects sur la composition du microbiote et une production d'AGCC (Macfarlane and Macfarlane, 2011; Shokryazdan *et al.*, 2016). Chez des individus en situation d'obésité, différentes études cliniques ont montré le rôle de fibres prébiotiques sur la régulation de la prise alimentaire, des paramètres de l'hôte (glucose sanguin, insuline, cholestérol, triglycérides) et la production de métabolites bactériens tels que le lactate et les AGCC (da Silva *et al.*, 2021). Toutefois, leur efficacité pour limiter la prise de poids reste timide.

Une autre stratégie pour moduler le microbiote intestinal passe par l'utilisation de probiotiques. Les probiotiques sont définis comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte (Salminen *et al.*, 2021). Leurs effets seraient médiés par des interactions directes avec les microorganismes commensaux, ou avec les cellules immunitaires via les cellules de l'hôte. Par exemple, les souches probiotiques pourraient interagir avec les commensales à travers une compétition pour les nutriments, ou au contraire du crossfeeding, en produisant des antimicrobiens, ou en participant à la stabilité de l'écosystème (Sanders *et al.*, 2019). Un grand nombre de mécanismes d'action sont suggérés dans la Figure 16. La conception des probiotiques a évolué au fil des années.

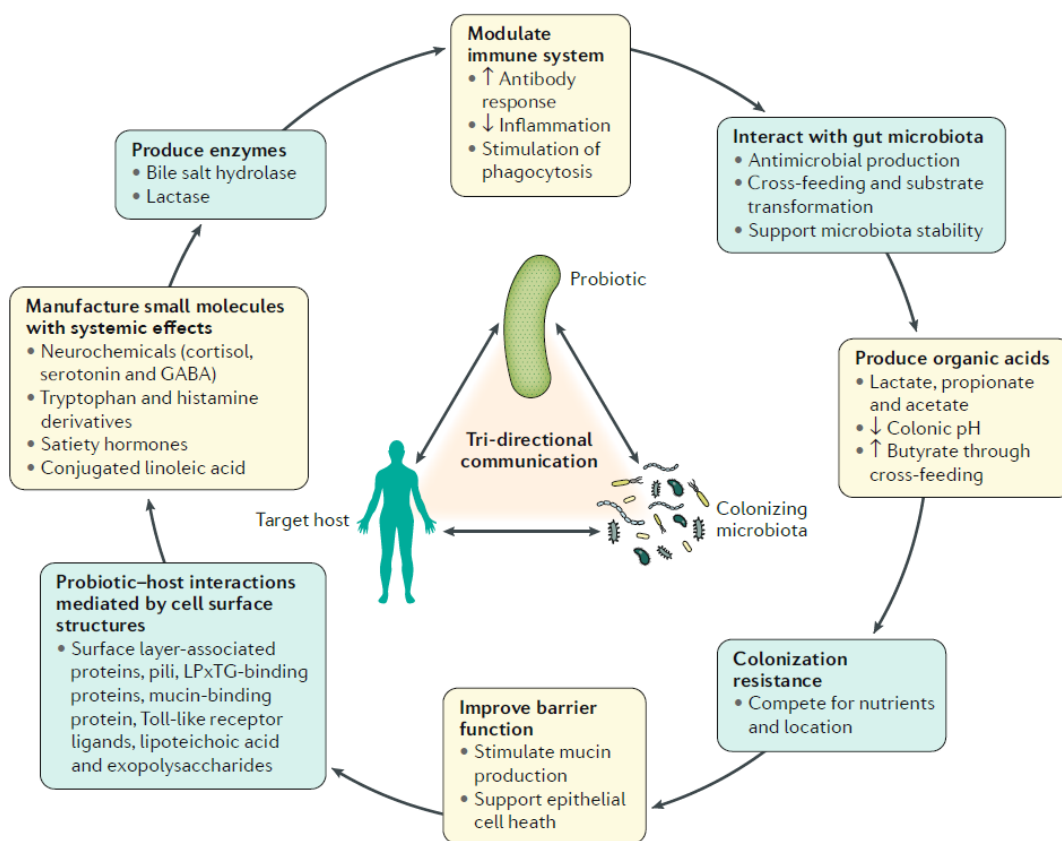


Figure 16: Mécanismes d'action des probiotiques conduisant à des effets bénéfiques pour la santé humaine (Sanders *et al.*, 2019).

1. Probiotique traditionnel

L'utilisation des probiotiques à travers des produits fermentés pourrait bien remonter à plus de 2000 ans avant JC, à un moment où la connaissance sur les microorganismes relevait du néant (Nakazawa and Hosono, 1992). Cependant, l'avènement de la microbiologie, lu sous le prisme de l'invention du microscope et par conséquent de la découverte des microorganismes, a ouvert

la voie à une identification plus précise de ce que nous appelons aujourd'hui : probiotique. L'Institut Pasteur a joué un rôle prépondérant dans l'identification de bactéries bénéfiques pour la santé, démythifiant ainsi l'idée que tous les microorganismes étaient dangereux pour la santé de l'Homme. En effet, Henri Tissier alors pédiatre à l'Institut Pasteur fut le premier à découvrir en 1899, *Bifidobacterium spp*, remarquant que cette dernière était dominante dans l'intestin d'enfants allaités au sein. Il suggéra ainsi que cette bactérie pourrait être utilisée pour prévenir le développement de diarrhées chez les nourrissons (Veiga, Miret and Jimenez, 2020). Toutefois, cette idée que des bactéries pourraient être bénéfiques à notre santé est souvent attribuée à Elie Metchnikoff, prix Nobel en 1908. Metchnikoff avait fait la brillante observation que la consommation régulière de bactéries lactiques dans les produits laitiers fermentés, comme le yaourt, était associée à l'amélioration de la santé et de la longévité des populations paysannes bulgares. Il a lié cela à une souche de *Lactobacillus* présente dans les produits fermentés bulgares et découverte par un médecin bulgare de 27 ans, Stamen Grigorov. Ce dernier, lors d'une conférence sur invitation de Metchnikoff à l'Institut Pasteur, avait lui aussi suggéré que le yaourt pourrait être la raison pour laquelle les bulgares vivaient plus longtemps. Les travaux de Metchnikoff ont permis d'isoler à partir de lait fermenté des souches pures telles que *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* utilisées pour faire du yaourt. Dans la même veine, Alfred Nissle, en 1917 remarqua qu'un soldat allemand semblait être immunisé à la dysenterie qui faisait ravage. Sur la base de ses expériences précédentes, Nissle soupçonnait que la flore digestive de ce soldat contenait une souche d'*E. coli* fortement antagoniste contre des pathogènes intestinaux. Ces travaux conduisirent à la découverte de cette souche, qui a montré une activité antagoniste marquée contre les entérobactéries pathogènes responsables de diarrhées, en inhibant leur adhérence aux cellules de l'hôte et en sécrétant certaines bactériocines. Les résultats d'études sur cette souche ont révélé que ce probiotique pouvait aussi être utilisé dans d'autres maladies du tractus gastro-intestinal (Sonnenborn and Schulze, 2009). Ce n'est qu'en 1965 que le terme « probiotique » fit son apparition dans la littérature scientifique, forgé par Lilly et Stillwell. Ils définirent alors les probiotiques comme étant des substances capables de promouvoir la croissance d'autres espèces dans un milieu chimiquement défini (Lilly and Stillwell, 1965). En 1989, Fuller donna une nouvelle définition plus précise des probiotiques en excluant de manière claire les antibiotiques. En effet, pour lui les probiotiques sont des compléments alimentaires microbiens vivants ayant un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant son équilibre microbien intestinal (Fuller, 1989). Au début des années 2000, la définition des probiotiques évolue encore, et inclut la notion de quantités adéquates de microorganismes administrés. Autrement dit, les probiotiques sont considérés aujourd'hui

comme des microorganismes vivants qui administrés à des quantités adéquates confèrent à l'hôte un effet santé bénéfique (FAO/WHO, 2002; Hill *et al.*, 2014).

A l'aune des importants travaux réalisés en microbiologie depuis Metchnikoff et tous ceux dont les travaux sont moins connus et reconnus, les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* représentent les probiotiques les plus étudiés et les plus utilisés, par exemple, pour traiter des maladies associées à une dysbiose (Puebla-Barragan and Reid, 2019) (Tableau 3).

Tableau 3: Les souches probiotiques et leurs maladies cibles (adapté de Puebla-Barragan and Reid, 2019)

Maladies cibles	Probiotiques
Syndrome de l'intestin irritable	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624
	<i>Bifidobacterium animalis</i> DN-173 010
Constipation	<i>Bifidobacterium lactis</i> DN-173010
	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938
Diarrhée associée à une prise d'antibiotique	Combinaison de <i>Lactobacillus acidophilus</i> CL 1285 + <i>Lactobacillus casei</i> LBC80R + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CLR2
	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
	<i>Saccharomyces boulardii</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
Maladie inflammatoire de l'intestin	VSL#3
High cholesterol	<i>Lactobacillus acidophilus</i> + <i>Bifidobacterium lactis</i>

Les effets bénéfiques des probiotiques sont médiés par divers mécanismes. Certaines souches probiotiques fournissent une barrière physique auprès de l'épithélium intestinal bloquant ainsi la colonisation des pathogènes (Figure 17a). Elles peuvent également stimuler les cellules à Goblet pour induire la production de mucus (Figure 17b). De plus, certains probiotiques maintiennent la perméabilité intestinale en augmentant l'intégrité intercellulaire des jonctions serrées apicales ou en empêchant la redistribution des protéines de jonction serrée, arrêtant ainsi le passage des molécules dans la lamina propria (Figure 17c). Alors que l'effet d'autres probiotiques passe par la production de facteurs antimicrobiens (Figure 17d). Il est aussi montré que certaines souches probiotiques stimulent le système immunitaire inné en signalant les cellules dendritiques, qui se déplacent ensuite vers les ganglions lymphatiques mésentériques et conduisent à l'induction de cellules TREG et à la production de cytokines anti-inflammatoires, notamment IL-10 et le TGF- β (Figure 17e). Des probiotiques peuvent également empêcher ou déclencher une réponse immunitaire innée en initiant la production de TNF par les cellules épithéliales et en inhibant (ou en activant) NF κ B dans les macrophages (M ϕ). Ils peuvent également atténuer (ou en amorcer) la réponse immunitaire de l'hôte en influençant la production d'IL-8 (Figure 17f) (Gareau, Sherman and Walker, 2010).

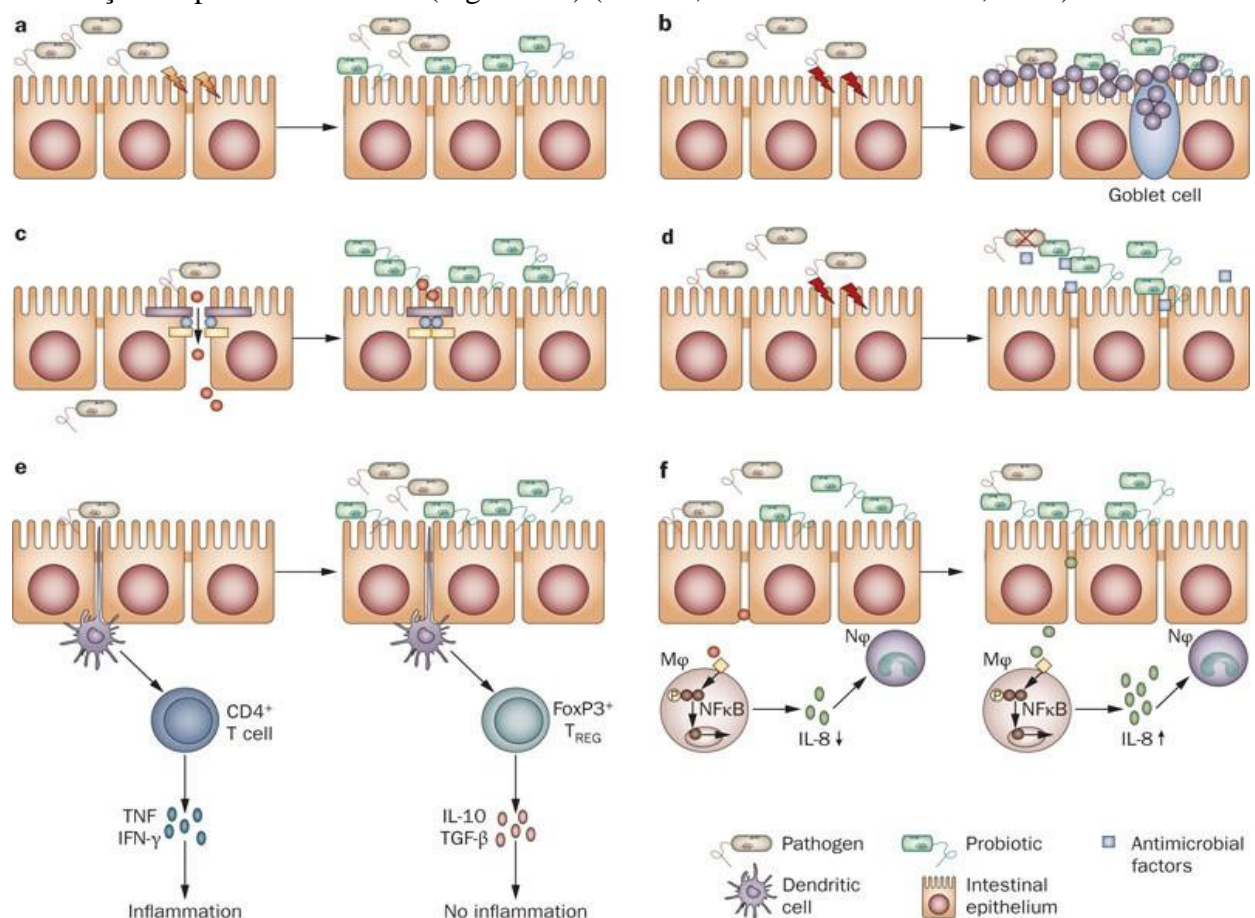


Figure 17: Potentiel effet bénéfique des probiotiques sur les CEI (Gareau et al, 2010)

Les probiotiques modulent la réponse de l'immunité innée à travers le contact avec les cellules dendritiques et épithéliales. En effet, les cellules dendritiques (CD) sont des cellules présentatrices d'antigène spécialisées qui migrent des tissus périphériques aux organes lymphoïdes secondaires pour la présentation de l'antigène aux cellules T. Des CD se trouvent dans la lamina propria de l'intestin grêle et du gros intestin et dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) (Rescigno, 2010). Les cellules dendritiques possèdent des récepteurs uniques pouvant reconnaître des ligands microbiens ainsi que leurs dérivés moléculaires. Elles agissent également comme un catalyseur pour diverses formes de voies de signalisation qui modifient les phénotypes et les cytokines sécrétées telles que les TLR et les récepteurs de lectine de type c (Mörbe *et al.*, 2021). Une étude menée par Konieczna (2013), menée chez l'animal, a montré qu'une souche probiotique telle que *Bifidobacterium infantis* 35624 peut moduler l'activité des CD, entraînant une augmentation des cellules dendritiques CD103(+) dans la lamina propria. L'effet bénéfique de cette augmentation conduit à la réduction de la colite induite par le sulfate de dextran sodium (DSS) (Konieczna *et al.*, 2013). Une autre étude montre également que l'administration orale de *B.infantis* 14518 à des souris BALB/C stimule la croissance, le développement et la maturation des cellules dendritiques dans le tissu lymphoïde associé à l'intestin (Fu *et al.*, 2017).

Il est aujourd'hui bien admis que les CEI, connues pour leurs fonctions d'absorption, jouent aussi un rôle important dans l'immunoprotection. En effet, les CEI protègent l'hôte des microorganismes pathogènes et des agents toxiques grâce à une épaisse couche de mucus qu'elles synthétisent. Cette barrière mucoale entretient une relation complexe avec les cellules immunitaires de la lamina propria et des plaques de Peyer, mais aussi avec le contenu luminal. Les probiotiques participent au renforcement et au maintien de la barrière mucoale intestinale en empêchant la colonisation des pathogènes par compétition pour les nutriments dans l'intestin (Habil *et al.*, 2014). Ils peuvent également moduler la réponse immunitaire en entraînant une immunostimulation ou immunorégulation. De plus, les probiotiques peuvent renforcer les défenses de la barrière mucoale en induisant la sécrétion de peptides antimicrobiens, tels que la β -défensine-2 humaine (hBD-2), par les cellules épithéliales (Habil *et al.*, 2014).

2. Probiotique de nouvelle génération

Le développement des méthodes culturales et la métagénomique a permis d'acquérir des connaissances plus larges sur la composition du microbiote intestinal. Lesdites connaissances ont mis en lumière de nouvelles espèces bactériennes associées à un meilleur état de santé chez l'Homme (Everard *et al.*, 2013; Miquel *et al.*, 2013) . Par conséquent, le microbiote intestinal

devient un réservoir important de potentiels microorganismes qui, une fois isolés, pourraient avoir un effet bénéfique pour la santé de l'hôte si administrés à des quantités adéquates dans des contextes de maladies inflammatoires ou maladies métaboliques. Ainsi, de nouvelles espèces commensales émergent en tant que potentiels probiotiques de nouvelle génération ou « Next-generation probiotic (NGP) », par opposition aux probiotiques traditionnels. Mais, compte-tenu de la réglementation actuelle de l'EFSA concernant l'utilisation du terme « Probiotique » pour une mise sur le marché, les bactéries commercialisées sont étiquetées « bactéries bénéfiques de nouvelle génération » ou « next-generation beneficial microbes ». Plusieurs candidats, comme *Akkermansia muciniphila* et *Faecalibacterium prausnitzii*, ont récemment suscité un intérêt considérable pour la modulation du microbiote intestinal et le traitement de maladies métaboliques de l'hôte (Figure 18) dont l'obésité (Cani and Everard, 2014; Kumari *et al.*, 2021).

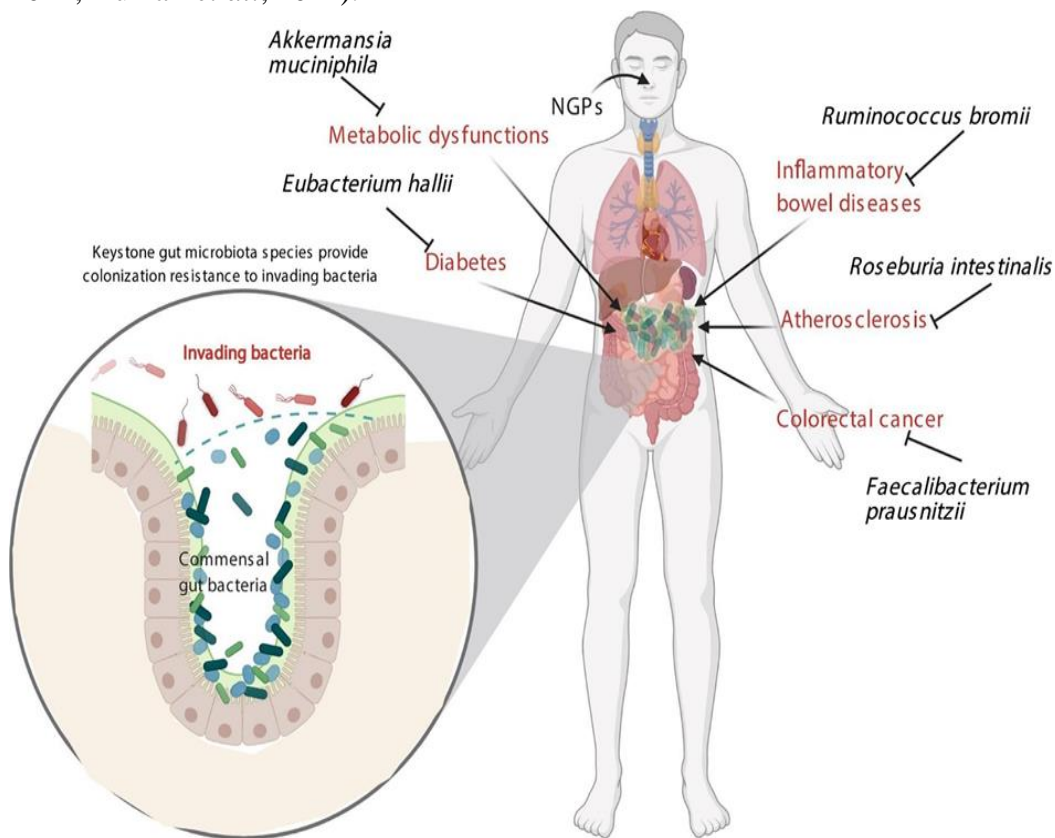


Figure 18: Un aperçu des effets améliorants des bactéries bénéfiques de nouvelle génération sur les maladies métaboliques (Kumari *et al.*, 2021)

Le concept « d'espèces clé de voûte » ou « Keystones species », appliqué au microbiote intestinal, émerge timidement pour rendre compte de l'importance des espèces plébiscitées et candidates comme probiotiques de nouvelle génération. *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Eubacterium hallii* sont couramment identifiées parmi les espèces clés du microbiote intestinal et potentiels NGP (D. Almeida *et al.*, 2019).

Akkermansia muciniphila isolée en 2004 appartient au phylum des Verrucomicrobia et représente approximativement 5% du microbiote intestinal total. Elle utilise la mucine, principale composante du mucus recouvrant les CEI, comme source de carbone, d'azote et d'énergie (Singh and Natraj, 2021). La dégradation du mucus induit les cellules caliciformes à générer de nouveau du mucus, qui en retour stimule la croissance d'*A. muciniphila* résidant à la surface de la muqueuse (Belzer and De Vos, 2012). *A. muciniphila* a la capacité de produire des oligosaccharides, de l'acétate et du propionate lors de la dégradation du mucus (Derrien *et al.*, 2004). Ces AGCC sont produits dans la couche de mucus, à proximité des cellules épithéliales, et seront donc facilement disponibles pour l'hôte (Belzer and De Vos, 2012). Les oligosaccharides et les AGCC produits stimulent la croissance et l'activité métabolique des bactéries localisées à proximité de la couche de mucus. Ces dernières peuvent donc fournir une barrière à la colonisation des bactéries pathogènes (Derrien *et al.*, 2011). Cependant, une réduction de l'abondance d'*A. muciniphila* dans l'intestin est associée à plusieurs maladies métaboliques et inflammatoires telles que l'obésité, le diabète de type 2 et le syndrome de l'intestin irritable (Cani and Everard, 2014; D. Almeida *et al.*, 2019). En effet, une étude menée par Schneeberger *et al.* (2015) montre qu'une plus faible abondance d'*A. muciniphila* chez les rats nourris avec un régime riche en gras provoque l'obésité et les maladies métaboliques associées, en perturbant l'homéostasie lipidique et en induisant une inflammation. L'administration d'*A. muciniphila* améliore les changements induits par ce régime, notamment en réduisant l'endotoxémie métabolique, en renforçant la barrière épithéliale intestinale endommagée, en améliorant la résistance à l'insuline et en atténuant les troubles cognitifs (Cani and de Vos, 2017; Kumari *et al.*, 2021). Everard *et al.* (2013) montrent que l'administration d'*A. muciniphila* vivante, à une dose de 2.10^8 cellules bactériennes par jour, protégeait en partie contre l'obésité induite par l'alimentation chez la souris. Ils rapportent en fait que les souris soumises à un régime riche en gras et traitées avec *A. muciniphila* ont montré un poids corporel inférieur de 50% par rapport au contrôle, sans modification de leur apport alimentaire et de l'élimination des graisses alimentaires dans les matières fécales. Cette protection s'est traduite par deux fois moins de masse grasseuse viscérale et sous-cutanée, mais aussi par une augmentation des marqueurs d'oxydation des acides gras dans le tissu adipeux (Everard *et al.*, 2013). De plus, les animaux recevant *A. muciniphila* ne présentaient plus de résistance à l'insuline, ni d'infiltration de cellules inflammatoires dans le tissu adipeux, ce qui est une caractéristique clé de l'obésité et de l'inflammation de bas grade associée (Everard *et al.*, 2013). De même, il a été montré qu'une abondance élevée d'*A. muciniphila* est associée à l'amélioration de l'homéostasie, de la glycémie, du profil lipidique et de la répartition des

graisses corporelles après une intervention alimentaire (Schneeberger *et al.*, 2015). Everard et al (2011) rapportent que l'administration de prébiotiques tels que les fructooligosaccharides et l'inuline augmentent l'abondance d'*A. muciniphila* chez la souris. Les travaux réalisés sur *Akkermansia muciniphila* depuis 2004 soutiennent l'intérêt porté à cette bactérie en tant que probiotique de nouvelle génération. Ce probiotique vient d'acquiescer récemment le statut de « novel food » par l'EFSA (Turck *et al.*, 2021), sous une forme pasteurisée qui augmenterait à la fois la stabilité et l'efficacité de la souche (Cani and de Vos, 2017). Il est produit par la société belge The Akkermansia Company.

Faecalibacterium prausnitzii, appartenant au phylum des Firmicutes, représente environ 5% du microbiote total chez les adultes sains (Miquel *et al.*, 2013). *F. prausnitzii* est connue pour digérer l'amidon et l'inuline mais ne dégradent pas les fibres végétales complexes. Elle consomme de l'acétate et produit du butyrate, et également du formiate et du D-lactate (Duncan *et al.*, 2002). Pour sa croissance, elle a besoin de sources d'énergies, dérivées de la dégradation des fibres végétales, qui lui parviennent grâce à un réseau d'alimentation croisée (ou cross-feeding) avec d'autres commensaux. Il est montré qu'*A. muciniphila*, par dégradation de la mucine, augmente le pool d'acétate et de propionate, ce qui entraîne, par syntrophie, la croissance de *F. prausnitzii* (Belzer *et al.*, 2017). Les effets bénéfiques portés par *F. prausnitzii* sont liés à sa production de butyrate et à ses propriétés immuno-modulatrices. Des recherches montrent qu'à des doses de 10^9 CFU/ jour, *F. prausnitzii* protège les rongeurs contre les colites induites par du DNBS, du TNBS ou du DSS (Saarela, 2019). En outre, elle a montré des effets bénéfiques sur une barrière épithéliale intestinale altérée dans un modèle d'inflammation chronique de bas grade (Martín *et al.*, 2015). Une diminution de l'abondance de *F. prausnitzii* dans l'intestin est également associée au développement d'une inflammation chronique, comme observé dans les contextes d'obésité (Maioli *et al.*, 2021). De plus, *F. prausnitzii* produit certains métabolites qui peuvent induire la production de lymphocytes T CD4CD8 $\alpha\alpha$ sécrétant de l'IL-10 (Sarrabayrouse *et al.*, 2015). *F. prausnitzii* stimule également les niveaux élevés de sécrétion d'IL-10 par les cellules mononucléaires du sang périphérique, les cellules dendritiques muqueuses et les macrophages. A la lumière des effets bénéfiques évoqués, *F. prausnitzii* est une candidate sérieuse comme probiotique de nouvelle génération. Produite par la société française Exceliom Biosciences, elle est en cours d'essai clinique pour une validation en tant que produit biothérapeutique vivant.

Outre *Faecalibacterium prausnitzii*, un autre membre du phylum des Firmicutes, *Eubacterium hallii*, pourrait aussi être considérée comme potentiel NGP. *Eubacterium hallii*, reclassifiée

aujourd'hui comme *Anaerobutyricum hallii* est une bactérie colonisant le microbiote intestinal et productrice de butyrate (Shetty *et al.*, 2018). *A. hallii* n'est pas non plus capable de dégrader les carbohydrates complexes des fibres alimentaires, mais peut consommer rapidement des métabolites issus de la fermentation des dégradeurs primaires pour produire du butyrate et du propionate (Bunesova, Lacroix and Schwab, 2018). *A. hallii* fait partie des rares membres du cluster XIVa des Clostridium capables de produire du butyrate à partir du lactate et de l'acétate. Cette capacité confère à cette bactérie un rôle crucial dans l'équilibre métabolique intestinal étant donné que l'accumulation de lactate est liée à divers troubles intestinaux, et pourrait également bénéficier d'une dominance compétitive sur d'autres micro-organismes (Duncan, Louis and Flint, 2004). Il a été montré que l'administration d'*A. hallii* à des souris obèses et diabétiques améliorerait la sensibilité à l'insuline et augmentait le métabolisme énergétique (Udayappan *et al.*, 2016). En résumé, les études soulignent l'importance de cette bactérie dans le maintien de l'homéostasie intestinale, et par conséquent *A. hallii*, en tant que probiotique, pourrait être utilisée dans le contexte des maladies métaboliques.

Compte-tenu de la législation française actuelle, aucun de ces candidats probiotiques ne peut bénéficier de l'appellation « Probiotique » pour leur commercialisation, encore réservé aux bactéries lactiques. Néanmoins plusieurs pays comme les Etats-unis ou la Chine ont, sont en train, de modifier leur réglementation dans un sens plus favorable à la délivrance de ce statut pour d'autres espèces.

Les intenses recherches menées ces dernières années sur le microbiote ont permis d'avoir des connaissances plus précises sur ces espèces bactériennes qui jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Ces espèces sont regroupées sous le concept d'espèces clé de voûte ou récemment sur le concept de « Guilde ». D'autres espèces, notamment productrices d'AGCC, pourraient également prétendre à ce statut de candidats NGP. Néanmoins, des études plus poussées sur le mécanisme d'action de ces candidats seraient les bienvenues afin de mieux cibler les dysbioses pour lesquelles ces potentiels NGP pourraient être efficaces.

3. Espèces clé de voûte : De la métaphore au concept

Le concept d'espèces clé de voûte ou de « keystone species » fut introduit pour la 1^{ère} fois en écologie par Robert T Paine en 1966. Paine avait en effet découvert que l'élimination de l'étoile de mer carnivore *Pisaster ochraceus*, le principal prédateur du système local, avait un impact dramatique sur l'écosystème de la communauté du littoral et la biodiversité de la côte pacifique à Washington avec l'extinction locale de plusieurs invertébrés et algues benthiques comme conséquence. Il précisa ce concept en 1969 affirmant que la composition et l'apparence

physique des espèces dans la Grande Baie de corail ont été grandement modifiées par les activités d'une seule espèce indigène abondante dans le réseau trophique. Ainsi pour lui, ces populations individuelles sont la clé de voûte de la structure de la communauté, et l'intégrité de la communauté et sa persistance inaltérée dans le temps, autrement dit sa stabilité, sont déterminées par leurs activités et leur abondance (Paine, 1969). Depuis, la définition a évolué et le champ d'application du concept élargi. Dans un article joliment écrit, Cottee-Jones et Whittaker (2012) firent le point sur l'évolution du concept et sa définition. Ils soulignent surtout la confusion et l'ambiguïté liées aux tentatives de définir et d'appliquer ce concept à d'autres écosystèmes mais aussi d'identifier des espèces comme espèces clé de voûte. C'est dans ce contexte que s'est tenue la conférence de Hilo à Hawaii en 1994 regroupant politiques et écologistes travaillant sur le concept dans le but de trouver une définition consensuelle d'une espèce clé de voûte. La définition suivante fut retenue à la suite de cette conférence : « une espèce clé de voûte est une espèce dont les impacts sur sa communauté ou son écosystème sont importants et beaucoup plus importants que ce à quoi on pourrait s'attendre compte tenu de son abondance » (Power and Scott Mills, 1995). Malgré ce consensus, d'autres définitions vont continuer d'émerger, prenant en compte l'influence de l'espèce clé de voûte sur son écosystème, son effet disproportionné par rapport à son abondance ou son effet disproportionné par rapport à sa biomasse (Cottee-Jones and Whittaker, 2012). Toutefois, nous considérons la définition proposée par Krebs plus complète, prenant en compte et l'abondance et l'influence d'une espèce clé de voûte. Pour lui, une espèce clés de voûte est une espèce relativement rare dans une communauté dont l'élimination provoque un changement important dans la structure de la communauté et l'extinction de certaines espèces (Krebs, 2009). Ainsi, les espèces relativement abondantes dans une communauté ne seraient pas considérées comme espèce clé de voûte. Dans le souci de simplifier le concept et de couper court à la confusion, Cottee-Jones et Whittaker (2012) proposent cette définition : « une espèce clé de voûte est une espèce dont l'importance pour le fonctionnement de l'écosystème est démontrable ». Ces pléthores de définition sont-elles applicables à l'écologie microbienne ?

Il est connu que les communautés microbiennes sont complexes, leur composition est influencée par plusieurs facteurs et se renouvelle donc rapidement dans le temps et dans l'espace. Pour ces raisons, la définition d'espèces clé de voûte dans une communauté microbienne doit être adaptée à partir des concepts originaux proposés en écologie. Ainsi pour Banerjee et al (2018a), les taxons microbiens clés de voûte sont des taxons hautement connectés qui, individuellement ou dans une guildes, exercent une influence considérable sur la structure

et le fonctionnement du microbiome, quelle que soit leur abondance dans l'espace et dans le temps. Ces taxons ont un rôle unique et crucial dans les communautés microbiennes, et leur élimination peut entraîner un changement radical dans la structure et le fonctionnement du microbiome (Banerjee, Schlaeppli and van der Heijden, 2018a).

Dans le microbiote intestinal, les espèces sont connectées entre elles (cf chapitre II §3) et interagissent via différents mécanismes incluant la sécrétion de molécules de quorum-sensing, d'alimentation croisée et synthèse de composés antimicrobiens. Ainsi, les interactions de cross-feeding entre espèces au sein d'un écosystème entraînent la dépendance à l'égard de bactéries spécifiques qui remplissent des fonctions essentielles pour d'autres espèces. A cet égard, plusieurs espèces bactériennes, appelées « dégradeurs primaires », et impliquées dans la dégradation de fibres végétales complexes, de mucines et dans la production d'AGCC sont identifiées comme espèces clé de voûte du microbiote intestinal, comme le montre le tableau 4 (Tudela, Claus and Saleh, 2021). Ces espèces clé de voûte sont identifiées de façon empirique ou par des modèles bio-informatiques utilisant des réseaux de co-occurrence (Banerjee, Schlaeppli and van der Heijden, 2018a). Toutefois, ces modèles de prédictions doivent être considérés avec précaution et validés de manière expérimentale avant d'attribuer le statut d'espèce clé de voûte à une quelconque espèce (Banerjee, Schlaeppli and van der Heijden, 2018b; Röttgers and Faust, 2018).

Tableau 4: Liste non exhaustive des principales espèces clé de voûte identifiées du microbiome intestinal humain (adapté de Tudela et al, 2021)

Espèce clé de voûte	Fonction	Méthode d'identification	Exemple d'association de maladie signalée chez l'homme
<i>Akkermansia muciniphila</i>	Dégrade la mucine	Empirique	Inflammation de l'intestin, obésité et maladies métaboliques
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Dégrade des carbohydrates complexes	Empirique	Association controversée avec l'IBD
<i>Bifidobacterium longum</i>	Dégrade des carbohydrates complexes, particulièrement les oligosaccharides dans le lait humain	Empirique	Très répandu chez les nouveau-nés en bonne santé

<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	Dégrade des carbohydrates complexes	Empirique	Très répandu dans le lait maternel humain
<i>Christensenella minuta</i>	Stimule la diversité de l'écosystème, produit de l'acétate,	Empirique, Réseaux de cooccurrence	Obésité, maladies métaboliques et maladies de Crohn
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Produit du butyrate	Présence/Absence	Maladie de Crohn, Rectocolite hémorragique
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Produit du méthane à partir du H ₂ et de l'acétate	Empirique et réseaux de cooccurrence	Obésité, maladie de Crohn
<i>Ruminococcus bromii</i>	Dégrade de l'amidon résistant, produit du butyrate	Empirique	Très répandu chez les individus en bonne santé

Les espèces clé de voûte du microbiote intestinal remplissent des fonctions essentielles cruciales pour le maintien de l'homéostasie intestinale. Ces fonctions sont généralement partagées entre plusieurs espèces, le terme de « groupe fonctionnel » est utilisé pour définir cette « redondance fonctionnelle » au sein de l'écosystème. Récemment l'équipe de Liping Zhao (2021) a repris le concept de « Guilde », en référence aux groupes fonctionnels où se retrouvent des espèces avec des fonctions similaires dans une communauté. Pour Liping Zhao, les membres d'une même guilde bactérienne sont susceptibles de travailler ensemble pour exercer des fonctions écologiques et montrer un comportement coabondant cohérent, qui peut être dérivé de l'exploitation des mêmes ressources de manière similaire ou de la possession de certains mécanismes moléculaires interactifs (Wu *et al.*, 2021). L'équipe de Harry Flint parle, elle, de « groupe clé de voûte » (Ze *et al.*, 2013). Nous pouvons comprendre des postulats de Zhao et de Flint que ce n'est pas l'espèce en soi qui est importante mais plutôt la fonction, peu importe l'appellation que nous lui donnons. Partant de cet état de fait, il nous semble important de se demander, non seulement, quelles sont les espèces perturbées ou perdues dans une maladie métabolique donnée mais aussi quelles sont les fonctions qui ne sont plus assurées. L'analyse des groupes fonctionnels pourrait permettre de mettre en place des biomarqueurs plus efficaces afin de prévenir ou de guérir des maladies impliquant le microbiote intestinal. Prolongeant cette idée, il pourrait être envisagé un nouveau concept de probiotiques isolés du microbiote ou de l'environnement sur la base de fonctions qu'ils partagent avec des espèces clé de voûte. Ils seront considérés comme des « probiotiques fonctionnels » qui assureront dans l'intestin des

fonctions essentielles déplétées, comme celle de « dégradeurs primaires » dans certains contextes de maladies métaboliques.

4. Le genre *Bacillus* comme probiotique

Les espèces appartenant au genre *Bacillus* sont ubiquitaires dans la nature mais à des concentrations plus importantes dans le sol, l'eau ou encore les produits alimentaires d'origine végétale ou fermentés (Schultz, Burton and Chanyi, 2017). L'histoire de *Bacillus* débute en 1835 quand Ehrenberg décrit pour la première fois « *Vibrio subtilis* ». Celle-ci fut renommée *Bacillus subtilis* en 1872 par Cohn. Le genre *Bacillus*, de la famille des *Bacillaceae* regroupe des espèces variées tant par leur diversité phylogénétique que par leurs fonctions. Les espèces bactériennes de la famille des *Bacillaceae* sont toutes sporulantes, mais les membres du genre *Bacillus* se distinguent particulièrement des autres membres de la famille par leur nature aérobie ou anaérobie facultative, leur forme en bâtonnets et leur production de catalase. Les premières classifications phylogénétiques des *Bacillus* basées sur la croissance en aérobose et la production de spores, ont conduit à des regroupements de bactéries en fonction de leur physiologie et de leur habitat (Claus and Berkeley, 1986). Les analyses phylogénétiques basées sur les séquences du gène codant pour l'ARNr16S ont permis une avancée plus importante avec la description de trois groupes taxonomiques différents : *Bacillus subtilis* groupe I, *Bacillus alvei* groupe II et *Bacillus brevis* groupe III (Slepecky and Hemphill, 2006). Toutefois, ces analyses n'étaient pas suffisamment discriminantes pour différencier toutes les espèces au sein du genre *Bacillus*, en raison de la nature hautement conservée de ce gène (A. P. Rooney *et al.*, 2009). Néanmoins, grâce au séquençage complet des génomes, nos connaissances de la phylogénie du genre *Bacillus* ont été approfondies, articulées autour de 2 espèces principales : *B. subtilis* et *B. cereus*. Le groupe *B. cereus* comporte de nombreuses espèces pathogènes des aliments (*B. cereus*), du bétail et de l'Homme (*B. anthracis*) ou des insectes (*B. thuringiensis*). Contrairement à *B. cereus*, la majorité des espèces du groupe *B. subtilis* n'est pas pathogène. Ces espèces représentent d'ailleurs un groupe d'espèces phylogénétiquement et phénotypiquement proches appelé le « complexe d'espèces de *B. subtilis* » (Alejandro P. Rooney *et al.*, 2009). Une étude récente utilisant des génomes de référence de ce complexe d'espèces (core genome) permet de distinguer quatre clades : clade I constitué de *B. subtilis* incluant trois sous-espèces, ainsi que *B. tequilensis*, *B. vallismortis*, *B. mojavensis* et *B. atrophaeus* ; clade II constitué de *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens*, et un complexe constitué de *B. methylotrophicus*, *B. velezensis* et *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* ; clade III

constitué de *B. licheniformis* et *B. sonorensis* ; clade IV constitué de *B. pumilus* et d'espèces apparentées (Fan *et al.*, 2017).

L'utilisation des espèces de *Bacillus* comme probiotiques remonterait à au moins 50 ans, avec un produit italien connu sous le nom d'Enterogermina, enregistré en 1958 en Italie en tant que complément médicamenteux en vente libre (Cutting, 2011). Néanmoins, elles ont été décrites bien avant, lors de la production d'aliments fermentés. Des aliments à base de soja de l'Inde, ou des condiments d'Afrique de l'Ouest sont obtenus à partir d'un processus de fermentation effectué par des espèces de *Bacillus* telles que *B. subtilis* et *B. licheniformis* (Wang and Fung, 1996). *Bacillus paralicheniformis*, très proche de *B. licheniformis* a été isolée pour la première fois à partir de Cheonggukjang, un produit de soja fermenté dans la cuisine coréenne traditionnelle (Dunlap *et al.*, 2015). Ainsi, la présence des espèces de *Bacillus* dans l'intestin est souvent associée à l'ingestion d'aliments et d'eau. Cependant, bien qu'il ne s'agisse pas de leur habitat naturel, ces espèces de *Bacillus* sont bien adaptées pour survivre dans le tractus gastro-intestinal. Certaines études vont même plus loin, considérant que décrire *Bacillus* comme un simple membre "transitoire" du microbiote intestinal est incorrect et qu'elles peuvent être bel et bien colonisatrices de l'intestin (Fakhry *et al.*, 2008; Hong, To, *et al.*, 2009). Un certain nombre d'espèces sporulantes appartenant à *Bacillus* a été isolé à partir d'échantillons fécaux humains (Fakhry *et al.*, 2008; Egan *et al.*, 2021). Une analyse d'échantillons fécaux de volontaires sains, et d'échantillons de l'iléon de patients avec des symptômes dyspeptiques a révélé la présence de *B. subtilis*, mais aussi de *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium* et *B. flexus* dans le tractus gastro-intestinal humain (Hong, Khaneja, *et al.*, 2009). Les auteurs estiment que le nombre de *Bacillus* était trop important pour être expliqué par la simple ingestion de nourriture et que les espèces de *Bacillus* étaient capables de former des structures de biofilm pour survivre au niveau de la paroi muqueuse (Hong, Khaneja, *et al.*, 2009; Egan *et al.*, 2021).

L'efficacité de *Bacillus spp.* en tant que probiotique, à partir de spores ou de formes végétatives, a été étudiée dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* et quelques-uns ont également été validés dans des essais cliniques humains (tableau 5). Les données disponibles de ces études, souvent associées au séquençage des communautés microbiennes, ont présenté les effets bénéfiques de différentes souches de *Bacillus spp.* pour la santé humaine. Des études *in vitro* en modèles coliques avec des sujets sains montrent que des souches de *Bacillus* utilisées comme probiotiques ont permis d'augmenter l'abondance des bactéries productrices d'AGCC, en particulier les Lachnospiraceae, ainsi que la production de butyrate (Marzorati *et al.*, 2020;

Sasaki *et al.*, 2020). De plus, la consommation de *Bacillus mesentericus* par des enfants diarrhéiques est associée à une augmentation de la quantité de bifidobactéries et de lactobacilles dans le tractus intestinal, de l'IL-10 sérique et à une diminution des taux de TNF- α (Chen *et al.*, 2010). Une étude utilisant un modèle porcin montre que *B. subtilis* améliore les performances de croissance et régule à la hausse le métabolisme des lipides dans la graisse sous-cutanée des porcs par le métabolisme des lipides grâce à la régulation de la proportion de Bacteroidetes et de Firmicutes dans l'intestin. Par conséquent, *Bacillus* pourrait jouer un rôle supplémentaire dans la régulation métabolique chez l'Homme (Cui *et al.*, 2013; Schultz, Burton and Chanyi, 2017).

A ce jour, divers probiotiques contenant des souches de *Bacillus*, seules ou associées à des bactéries lactiques et/ou des bifides, sont disponibles sur le marché (Cutting, 2011) comme le résume le tableau suivant. Si leurs effets sont parfois documentés à la suite d'études cliniques, il faut noter que le nombre d'individus inclus dans les cohortes est très variable d'une étude à l'autre, et parfois faible. Par ailleurs, aucun de ces produits ne bénéficie de recommandations médicales, ce qui incite à la prudence concernant le choix des formules commerciales facilement accessibles et leur champ d'application.

Tableau 5 : Probiotiques commercialisés avec des souches de Bacillus à usage humain (adapté de Cutting, 2011).

Produit	Fabricant	Commentaires	Essais cliniques
Bactisubtil®	Produit par Marion Merrell (Levallois-Perret, France) mais aussi par Hoechst puis par Aventis Pharma. Également cité comme produit par Casella-Med, Cologne, Allemagne	Capsule avec 1×10^9 spores de <i>Bacillus cereus</i> souche IP5832 (ATCC 14893) [n.b., déposé à l'origine comme <i>B. subtilis</i> .]	
Bio-Kult® Advanced	Protexin Health Care http://www.bio-kult.com	<i>B. subtilis</i> PXN®21® est l'un des composants de 14 souches présentes dans ce supplément probiotique britannique	Ishaque <i>et al.</i> , 2018; Baião <i>et al.</i> , 2022
Biosporin®	(1) Biofarm, Dniepropetrovsk, Ukraine	Biosporin® est un mélange de deux souches de bactéries antagonistes vivantes <i>B. subtilis</i> 2335 (parfois appelée <i>B. subtilis</i>)	

Produit	Fabricant	Commentaires	Essais cliniques
		3) et <i>B. licheniformis</i> 2336 (le rapport est de 3:1). À l'origine isolées de fourrage pour animaux.	
	(2) Garars, Russia	Il existe différentes versions de ces produits fabriquées dans différents pays, y compris une forme recombinante, Subalin.	
Biovicerin®	Geyer Medicamentos S.A. Porto Alegre, RS, Brazil http://www.geyermed.com	Suspension de 10^6 spores ml ⁻¹ <i>B. cereus</i> .	de Castro Soares <i>et al.</i> , 2017
Enterogermina®	Sanofi Winthrop SpA, Milan, Italy www.automedicazione.it	Flacon (5 ml) contenant 1×10^6 spores de <i>B. clausii</i> en suspension. Au moins quatre souches différentes de <i>B. clausii</i> présentes et produit initialement étiqueté comme porteur de <i>B. subtilis</i>	Plomer, Perez and Greifenberg, 2020
Schiff Digestive Advantage®	Schiff Nutrition International Ganeden Biotech Inc., Ohio, USA	<i>B. coagulans</i> GanedenBC ³⁰ Il s'agit d'une souche brevetée qui a l'approbation GRAS aux États-Unis	Nyangale <i>et al.</i> , 2015; Anaya-Loyola <i>et al.</i> , 2019
Lactospore®	Sabinsa Corp., Piscataway, NJ, USA www.sabinsa.com	Étiqueté comme <i>Lactobacillus sporogenes</i> mais contient <i>B. coagulans</i> MTCC 5856 ($6-15 \times 10^9$ g ⁻¹)	Majeed <i>et al.</i> , 2018, 2023
Medilac-Vita®	Hanmi Pharmaceutical Co. Ltd., Beijing, China http://www.hanmi.co.kr	<i>B. subtilis</i> souche RO179 (à 10^8 g ⁻¹) en combinaison avec <i>Enterococcus faecium</i> .	Li <i>et al.</i> , 2021
MegaSporeBiotic	Physicians Exclusive, LLC; Glenview, IL, USA	5 espèces de <i>Bacillus</i> dont <i>B. licheniformis</i>	McFarlin <i>et al.</i> , 2017

Produit	Fabricant	Commentaires	Essais cliniques
Lactoflorene Plus	Montefarmaco OTC, Bollate., Milan, Italy	Mélange de bactéries lactiques incluant. <i>L. acidophilus</i> , <i>B. bifidum</i> et <i>L. sporogenes</i> <i>L. sporogenes</i> à $3,3 \times 10^5$ UFC g ⁻¹ dont le nom valide est <i>B. coagulans</i> et est mal classé comme une souche de <i>B. subtilis</i> .	Soldi <i>et al.</i> , 2019
Primal Defense™	Garden of Life® Palm Beach, Florida, USA. www.gardenoflife.com/	13 espèces bactériennes dont <i>B. subtilis</i> . 15 milliards de cellules vivantes	Mendoza, 2019

Le genre *Bacillus* présente plusieurs caractéristiques intéressantes pour une utilisation comme probiotique chez l'Homme, comme nous venons de l'illustrer. Sa capacité à sporuler le rend facile à ingérer (capsules ou incorporé ds une matrice alimentaire), résistant au pH acide de l'estomac, et confère une longue stabilité au produit commercialisé. Les espèces de *Bacillus* sont également connues pour métaboliser une variété de fibres alimentaires complexes (Shinde et al. 2020; Maski et al. 2021), et augmenter les niveaux de bactéries produisant des AGCC (Marzorati et al., 2020; Sasaki et al., 2020). Elles peuvent également avoir des propriétés intéressantes pour lutter contre la prise de poids et anti-diabétiques (Yang et al., 2015).

Son utilisation chez l'Homme est encore peu développée mais plusieurs industriels du secteur pharmaceutique s'y intéressent. Notre choix pour ce travail de thèse s'est donc porté sur des souches du genre *Bacillus*.

5. Méthodes d'études *in vitro* du microbiote intestinal

Le microbiote intestinal est soumis à plusieurs facteurs qui peuvent modifier sa composition et sa diversité. Néanmoins diverses stratégies, dont l'utilisation des probiotiques, sont possibles pour moduler le microbiote intestinal. Afin de prendre connaissance du profil du microbiote en un instant donné et évaluer l'impact d'un probiotique sur celui-ci, des approches *in vivo* et *in vitro* sont utilisées.

Les essais cliniques chez l'Homme constituent une approche permettant d'établir des études de corrélations entre la composition du microbiote et le phénotype ou l'environnement de l'hôte

(Pham and Mohajeri, 2018). Ils peuvent ainsi permettre d'observer directement chez l'humain l'impact d'un probiotique. Pour comprendre le mécanisme d'action de la réponse physiologique suite à l'ingestion du probiotique, il est parfois nécessaire de réaliser des procédures plus ou moins invasives pour mesurer les paramètres de l'hôte (Brodkorb *et al.*, 2019). Ces études sont donc souvent limitées en raison de problèmes d'éthique et de sécurité, et du fait de leur coût élevé.

Les modèles animaux représentent une alternative aux essais cliniques chez l'Homme. Ces modèles (souris, rats et porcs) permettent aux chercheurs d'étudier les interactions hôte-microbes dans des environnements contrôlés. Les données issues d'études précédentes montrent que la majorité (> 95 %) des études *in vivo* sur l'effet de l'alimentation sur le microbiote est basée sur des modèles animaux, dont plus de 75% sur des modèles murins (Singh *et al.*, 2022). Toutefois, ces modèles animaux sont coûteux, demandent beaucoup de main-d'œuvre pour la maintenance des animaux et peuvent ne pas être physiologiquement représentatifs des métabolismes humains. De plus, le microbiote d'un animal diffère du microbiome humain, par conséquent, il reste un défi de traduire les résultats obtenus à partir de modèles animaux aux conditions chez l'homme (Pham and Mohajeri, 2018). L'utilisation de modèles animaux dans la recherche pose également des problèmes d'éthiques à l'ère du réveil d'une conscience écologique et de la considération du bien-être animal. Pour toutes ces raisons, il est donc important de considérer le développement de nouvelles approches *ex vivo* permettant d'évaluer l'impact de potentielles souches probiotiques sur le microbiome intestinal humain.

Dans l'optique de proposer des alternatives aux études *in vivo*, différents modèles de fermentation *in vitro* (ou *ex vivo* selon la terminologie utilisée par les auteurs) ont été développés comme outils puissants pour étudier le microbiote intestinal humain dans des conditions contrôlées, en réacteurs imitant différentes régions du côlon et permettant un échantillonnage dynamique dans le temps. Plusieurs modèles de fermentation *in vitro* sont couramment utilisés dans le monde pour l'étude du microbiote intestinal. Ils peuvent être divisés en modèles à compartiment unique ou multiple, et pour chacun en modèles statiques ou dynamiques (Figure 19), et simulent les conditions physiologiques d'une ou des parties du tractus gastro-intestinal à l'aide de milieux de culture adaptés, et d'une régulation fine et constante des paramètres physico-chimiques (pH, température, anaérobiose, agitation).

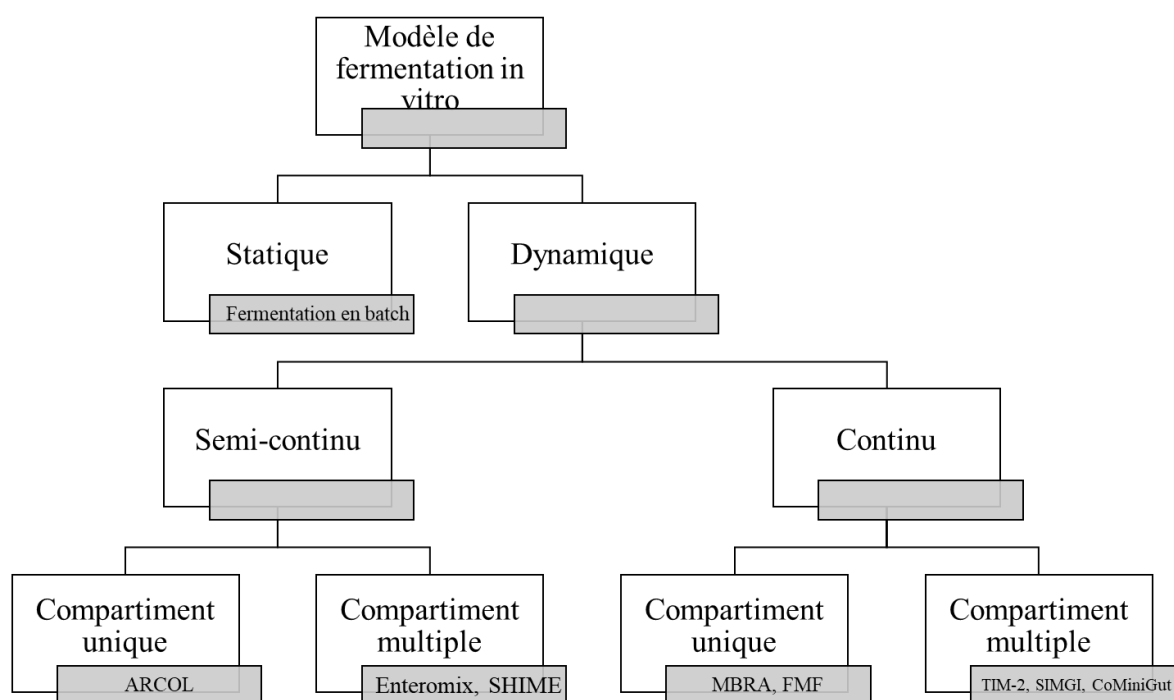


Figure 19: Les différentes stratégies de fermentation *in vitro* (adapté de Singh et al, 2022). ARCOL, Artificial colon; CoMiniGut, Copenhagen MiniGut; FMF: FInE Micalis Fermenters; MBRA, mini bioreactor array; SHIME, Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem; SIMGI, gastrointestinal simulator; TIM, TNO *in vitro* model.

Le modèle de fermentation *in vitro* statique appelé aussi fermentation en mode discontinu (batch) représente une approche simple, accessible et reproductible. Ce modèle est caractérisé par un environnement anaérobie fermé et une simulation de courte durée. Il est automatisable et permet un criblage à haut débit, ce qui en fait une méthode précieuse pour l'étude initiale de la modulation de la composition du microbiote intestinal et des activités métaboliques par des candidats probiotiques ou des composés alimentaires. Il permet également de travailler avec un volume de milieu de culture et de composés à tester réduit (Pham and Mohajeri, 2018). Des enceintes stériles de différentes capacités peuvent être utilisées pour une telle fermentation, avec des suspensions fécales et des milieux synthétiques ou simplifiés pour soutenir la croissance microbienne, ainsi que les composés d'intérêt. Dans ce modèle statique, tous les éléments nutritifs du milieu de culture sont fournis au début de la fermentation et sont consommés par les bactéries jusqu'à épuisement. De ce fait, les tests s'arrêtent lorsque l'un des substrats au moins est épuisé, ou bien si les conditions environnementales ne sont plus propices, comme par exemple un pH acide ou l'accumulation de métabolites microbiens toxiques (Nissen, Casciano and Gianotti, 2020), d'où la nécessité d'une fermentation sur un temps court (24h à

72h). Les modèles *in vitro* avec un seul compartiment sont souvent conçus pour simuler les conditions du côlon proximal (Roupar *et al.*, 2021). Cependant, ces temps de fermentation très courts pourraient ne pas permettre au modèle de soutenir la chaîne trophique du microbiote initial, où le produit de fermentation d'une espèce devient le substrat d'une autre. Ainsi pour pallier ces lacunes, des modèles dynamiques permettant de stabiliser le microbiote intestinal à l'aide d'un apport nutritif et une élimination des déchets toxiques, en continu, tout au long de la fermentation, peuvent être utilisés. Sur la base d'un apport nutritif, à intervalle régulier ou en continu, un modèle dynamique est dit « semi-continu » (appelé aussi « Fed-batch ») ou « continu » (chémostat).

Les modèles de fermentation dynamique en semi-continu pour modéliser le microbiote intestinal humain ont été adaptés à partir d'un système décrit par Miller et Wolin dans les années 80 (Venema and Van Den Abbeele, 2013). De nombreuses variantes de ce système ont ensuite été utilisées. Parmi les modèles dynamiques en semi-continu, nous pouvons citer les systèmes comme ARCOL, Enteromix ou encore SHIME.

Le modèle « Artificial Colon » ARCOL est un système de fermentation en semi-continu avec un seul compartiment développé à INRAE de Clermont-Auvergne (Cordonnier *et al.*, 2015). Il intègre les principaux paramètres physico-chimiques du gros intestin (colon), tels que le pH, la température, l'anaérobiose, l'apport d'effluents iléaux, ainsi que le temps de rétention (Dupont *et al.*, 2019). La pertinence du modèle ARCOL pour les études de probiotiques a également été démontrée car la survie des levures probiotiques et leur influence sur la production d'AGCC obtenues *in vitro* sont cohérentes avec les données disponibles chez des volontaires humains adultes (Dupont *et al.*, 2019). Le système Enteromix, quant à lui, est aussi un modèle en semi-continu mais avec plusieurs compartiments dans lesquels des milieux nutritifs sont fournis à un intervalle de 3 h (Venema and Van Den Abbeele, 2013). Les différents compartiments tentent de mimer les conditions physiologiques dans les côlons proximal, transverse et distal. L'inoculum est ajouté dans le premier récipient et une partie de la culture est mélangée puis pompée dans le récipient suivant. Le système SHIME, pour « Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem », est constitué de 5 bioréacteurs connectés et tente de mimer tout le tractus gastro-intestinal, de l'estomac au colon distal (Van Den Abbeele *et al.*, 2010). Il est également utilisé pour étudier l'effet des traitements prébiotiques, probiotiques et synbiotiques (Singh *et al.*, 2022).

En parallèle des modèles de fermentation *in-vitro* en semi-continu, des modèles en continu ont été développés dans le but d'étudier les communautés microbiennes du rumen. Mais ces

modèles peuvent être aussi utilisés pour étudier d'autres communautés microbiennes complexes, telles que celles retrouvées dans les matières fécales humaines. Ils peuvent comporter un ou plusieurs compartiments, et leur fonctionnement est bien détaillé dans plusieurs revues (Nissen, Casciano and Gianotti, 2020; Roupar *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2022). Quelques exemples de modèle en système continu sont listés dans le tableau 6 avec leurs avantages et leurs limites.

Tableau 6: Différents systèmes de fermentation in vitro en continu (adapté de Singh et al, 2022)

Modèle	Système	Avantages	Limites
Continu	MBRA	Bioréacteur avec un petit volume (15 ml)	Stimule uniquement le colon proximal
		Permet d'étudier un grand nombre d'échantillons	Les interactions avec l'hôte ne sont pas prises en compte
		Possibilités de faire plusieurs expériences en parallèle (up to 48)	
	PolyFermS	Des traitements en parallèle peuvent être étudiés sur le même microbiote	Les interactions avec l'hôte ne sont pas prises en compte
		Communauté microbienne stable	Pas de dialyse pour contrôler les métabolites produits
		Les études peuvent être effectuées sur du long-terme	
	TIM et TIM-2	Les métabolites en excès peuvent être éliminés	Les interactions avec l'hôte ne sont pas prises en compte
		Pas besoin d'un état idéal pour le microbiote	<ul style="list-style-type: none"> Les paramètres sont basés sur une personne en bonne santé

		<ul style="list-style-type: none"> • Hautement reproductible 	
	SIMGI	Études sur la variation du microbiote intestinal sur le long-terme	<ul style="list-style-type: none"> • Les interactions avec l'hôte ne sont pas prises en compte
		<ul style="list-style-type: none"> • Hautement automatisé 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas absorption de métabolites
		Une partie du colon peut être étudiée	

Les fermenteurs de l'équipe FInE (INRAE MICALIS), utilisés pour ce travail de thèse, sont des fermenteurs à compartiment unique (Figure 20), et ont été utilisés pour mimer le colon distal en fermentation continue (mode chémostat). Ce système a été utilisé récemment dans l'équipe pour étudier les interactions entre certaines fibres végétales et les espèces bactériennes intestinales, ou pour étudier l'impact d'aliments fermentés sur le microbiote.



Figure 20: Système de 6 fermenteurs anaérobies de l'équipe FInE de MICALIS. Ces fermenteurs fonctionnent en parallèle, indépendamment les uns des autres, ce qui permet de tester 6 conditions différentes en même temps. Photo C. Maillat @INRAE MICALIS FInE

TRAVAIL EXPERIMENTAL

CHAPITRE II : Criblage de souches de *Bacillus* pour des activités fibrolytiques

Article 1: Hemicellulosic biomass conversion by Moroccan hot spring *Bacillus paralicheniformis* CCMM B940 evidenced by glycoside hydrolase activities and whole genome sequencing

Le travail réalisé dans cet article entre dans le cadre d'une collaboration avec le Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) de Rabat, au Maroc, disposant, depuis 1998, de la plus large collection en Afrique, appelée « *Collections Coordonnées Marocaines de Microorganismes (CCMM)* ». Cette collection, qui regroupe plus de 1800 souches de bactéries, champignons et levures, a pour rôle de valoriser et de préserver *ex-situ*, les ressources génétiques microbiennes du Maroc selon des critères internationaux de qualité et de traçabilité. Parmi les isolats bactériens, nous souhaitons étudier et valoriser différentes espèces de *Bacillus* pour leur potentiel enzymatique. Les objectifs majeurs de ce travail étaient doubles. Il s'agissait tout d'abord d'évaluer l'efficacité de souches de *Bacillus* récemment isolées d'écosystèmes extrêmophiles marocains (Aanniz *et al.*, 2015) pour dégrader à la fois des fibres naturelles récalcitrantes et des fibres purifiées modèles, à travers la quantification des activités enzymatiques extracellulaires. Ensuite, nous souhaitons mettre en évidence par séquençage génomique le répertoire enzymatique global, des souches, dédié à la dégradation des fibres végétales de diverses natures que l'on retrouve aussi bien dans l'environnement que dans l'alimentation humaine. La connaissance du **potentiel fibrolytique** de ces souches était un préalable pour travailler par la suite à leur valorisation dans différentes applications en Biotechnologie ou en Santé humaine.

Le premier article présenté dans ce manuscrit, dont je suis 2^e auteur, est donc un travail initial, réalisé sur une souche représentative des *Bacillus aerius*, espèce qui nécessitait également d'être reclassifiée car n'ayant plus de souche type en culture dans aucune collection dans le monde (Dunlap, 2015). Nous avons montré dans cet article que la souche CCMM B940 était capable de dégrader des polysaccharides complexes tels que le xylane et le lichénane, constituants majeurs des parois végétales. La souche a également montré des aptitudes à dégrader des fibres végétales naturelles, issues de pelures de fruits tels que des oranges et des pommes. Le séquençage de son génome a permis la reclassification de CCMM B940 précédemment identifiée comme *B. aerius* en *Bacillus paralicheniformis*. L'analyse du génome

a montré la présence de plus de 50 gènes codant pour des enzymes appartenant à différentes familles de CAZymes impliquées dans la dégradation des fibres végétales.

Ce premier article a permis de montrer expérimentalement, et à travers l'analyse du génome, la capacité d'une souche de *B. paralicheniformis* à produire un grand nombre d'enzymes extracellulaires variées, impliquées dans la dégradation des fibres végétales. J'ai pris en charge la partie expérimentale de cette étude (croissance en milieu chimiquement défini supplémenté en fibres, activités enzymatiques qualitatives et quantitatives, extraction d'ADN génomique) et l'analyse in silico des gènes de CAZymes. J'ai également contribué à la rédaction de l'article. Ce travail préliminaire a ouvert la voie à l'exploration du potentiel enzymatique de cette espèce qui était jusque-là très peu étudiée. Les résultats de ce travail ont été publiés dans le journal à comité de lecture « 3 Biotech » (Springer).

HEMICELLULOSIC BIOMASS CONVERSION BY MOROCCAN HOT SPRING BACILLUS PARALICHENIFORMIS CCMM B940 EVIDENCED BY GLYCOSIDE HYDROLASE ACTIVITIES AND WHOLE GENOME SEQUENCING

Soufiane Maski^{1,4}, Serigne Inssa Ngom^{1,2}, Bahia Rached^{1,3}, Taha Chouati¹, Mohamed Benabdelkhalek⁴, Elmostafa El Fahime⁵, Mohamed Amar^{1,3}, Christel Béra-Maillet^{1,2*}

¹Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Maroc.

²Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France.

³Collections Coordonnées Marocaines de Microorganismes, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Maroc.

⁴Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat, Maroc

⁵Unité d'Appui Technique à la Recherche Scientifique, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Maroc.

Running Title: Hemicellulosic potential of *Bacillus paralicheniformis* CCMM B940 emphasized by whole genome sequencing

*Address correspondence to Dr. Christel Béra-Maillet, christel.maillet@inrae.fr

ORCID numbers: 0000-0002-4023-9230 for Serigne Inssa Ngom; 0000-0001-7812-0641 for Elmostafa El Fahime; 0000-0002-6987-6751 for Christel Béra-Maillet; Research gate links: https://www.researchgate.net/publication/313853436_Antimicrobial_Resistance_and_Detection_of_Biofilm_in_Staphylococcus_aureus_Isolates_from_Casablanca for Taha Chouati; https://www.researchgate.net/profile/Mohamed_Amar2 for Mohamed Amar.

Accession numbers: The assembled genome and all relevant sequences were deposited in NCBI's GenBank on November 24, 2020 under the following accession numbers, BioProject [PRJNA680612](#); BioSample [SAMN16895636](#); Genome [JADRJL000000000](#).

Acknowledgments: Funding for this research was provided by Belgian Cooperation FRAB/CCMM2, the National Center for Scientific and Technical Research (CNRST) and the National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE). Maski Soufiane is a PhD student at Faculty of Science, Mohammed V University, Rabat, Morocco. Serigne Inssa Ngom is a recipient of a grant for doctoral research allocated by the French ministry of higher education and research (doctoral school 569, University of Paris-Saclay).

Statements:

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflict of interest in the publication.

Author contributions: MA, EE, MB and CBM conceived the study. SM, SIN, MA, EE, CBM designed the experiments. SM, SIN did genomic and enzymatic analyses, respectively. SIN, BR, TC prepared the samples and extracted DNA. SM performed nucleic Blast, the assembly and the annotation of the genome, and performed the map of functional categories. SIN performed all the enzymatic assays. MA, EE, MB, BR, CBM analyzed the data. SM, SIN, CBM, MA wrote the manuscript with the help of all authors. All authors have read and approved the final manuscript.

ABSTRACT

Thermophilic bacteria, especially from the genus *Bacillus*, constitute a huge potential source of novel enzymes that could be relevant for biotechnological applications. In this work, we described the cellulose and hemicellulose-related enzymatic activities of the hot spring *Bacillus aerius* CCMM B940 from the Moroccan Coordinated Collections of Microorganisms (CCMM), and revealed its potential for hemicellulosic biomass utilization. Indeed, B940 was able to degrade complex polysaccharides such as xylan and lichenan and exhibited activity towards carboxymethylcellulose. The strain was also able to grow on agriculture waste such as orange and apple peels as the sole carbon source. Whole-genome sequencing allowed the reclassification of CCMM B940 previously known as *B. aerius* into *Bacillus paralicheniformis* since the former species name has been rejected. The draft genome reported here is composed of 38 contigs resulting in a genome of 4,315,004 bp and an average G+C content of 45.87%, and is an important resource for illuminating the molecular mechanisms of carbohydrate metabolism. The annotated genomic sequences evidenced more than 52 genes encoding glycoside hydrolases and pectate lyases belonging to 27 different families of CAZymes that are involved in the degradation of plant cell wall carbohydrates. Genomic predictions in addition to *in vitro* experiments have revealed broad hydrolytic capabilities of the strain, thus reinforcing its relevance for biotechnology applications.

Keywords: *Bacillus paralicheniformis*, whole genome, hemicellulose, glycoside hydrolase, lichenan, xylan

GENOME RESEARCH REPORTS

Lignocellulosic biomass, mainly composed of cellulose, hemicelluloses and lignin is the most abundant complex biopolymer in the nature. It is of major interest for biotechnology as this feedstock is used for the production of renewable biofuels and other high-value chemicals, through an enzymatic saccharification process (Zhang *et al.*, 2018). However, depolymerization of lignocellulose is challenging and it requires high-performance enzymes that act in synergy (Houfani *et al.*, 2020). Therefore, enzymes produced by microorganisms, such as bacteria, are used for the deconstruction of the complex polysaccharides of cellulose and hemicelluloses which are tightly bound together in plant cell walls (Zeng *et al.* 2017).

Xylan is the main component of hemicelluloses and consists of a β -1,4-D-xylan backbone with short side chains of O-acetyl, β -L-arabinofuranosyl, D- α - glucuronic acid and phenolic acid (Biely *et al.* 2016). Other polysaccharides such as xyloglucan, lichenan and mannans are part of the hemicellulolytic fraction of plant cell walls. Xylanases, xyloglucanases, lichenases, and endoglucanases are necessary to completely degrade these polysaccharides into simple sugars in order to allow glycolytic fermentation to produce energy. These enzymes belong to one of the glycoside hydrolase (GH) families, a subgroup of the carbohydrate-active enzymes (CAZymes) (Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Pedro M Coutinho, *et al.*, 2014) and very often associated with carbohydrate-binding modules (CBM) that facilitate adhesion of enzymes to cellulose or hemicelluloses.

Most microorganisms living in extreme environmental habitats such as hot springs have been considered attractive producers of lignocellulolytic enzymes for industrial bioconversion processes (Thapa *et al.*, 2020). Morocco has more than twenty hot springs distributed in different regions (Cidu and Bahaj 2000; Bouchaou *et al.* 2017) which are suitable habitats for thermophilic microorganisms growing optimally between 55 and 80°C. In addition, thermophilic bacteria are known for their ability to produce thermostable enzymes of biotechnological interest (Knapik *et al.* 2019). Previously, Anniz *et al.* (2015) investigated the diversity of thermophilic bacteria in four different hot springs in Morocco, which enabled the isolation of seventy-nine bacterial strains belonging to the genus *Bacillus* (www.cmm.ma). Some of these strains were identified as *Bacillus aerius*. They grow optimally at 55°C and exhibit amylolytic, proteolytic or cellulolytic activity (Aanniz *et al.*, 2015). However, strains belonging to *B. aerius* species should be reclassified as this species name has been rejected since 2015 (Dunlap, 2015). For this reason, we chose the CCMM B940 strain as the representative of the *B. aerius* group isolated by Aanniz *et al.* (2015) from a hot spring for

biological characterization of its potential hemicellulolytic and cellulolytic activities and whole-genome sequencing analysis.

B940 strain was grown twice on Luria-Bertani (LB) agar medium (BD Difco, Sparks, Maryland, USA) for 18h at 37°C under aerobic conditions. Individual colonies were then picked from LB plates and cultivated at 37°C for 18h in LB agar medium supplemented with 0,5% Icelandic moss Lichenan (Megazyme, Wicklow, Irlande), beechwood Xylan (Megazyme, Wicklow, Irlande), or medium viscosity Carboxymethylcellulose (Sigma, MO, USA), respectively. A second bacterial strain (CCMM B945) from the same *B. aerius* group, known for inability to degrade lichenan and xylan (data not shown) was used as a negative control for degradation of hemicellulose and following the same experimental protocol as for CCMM B940. Both strains grew well on LB agar medium supplemented with purified fibres (Fig.1A).

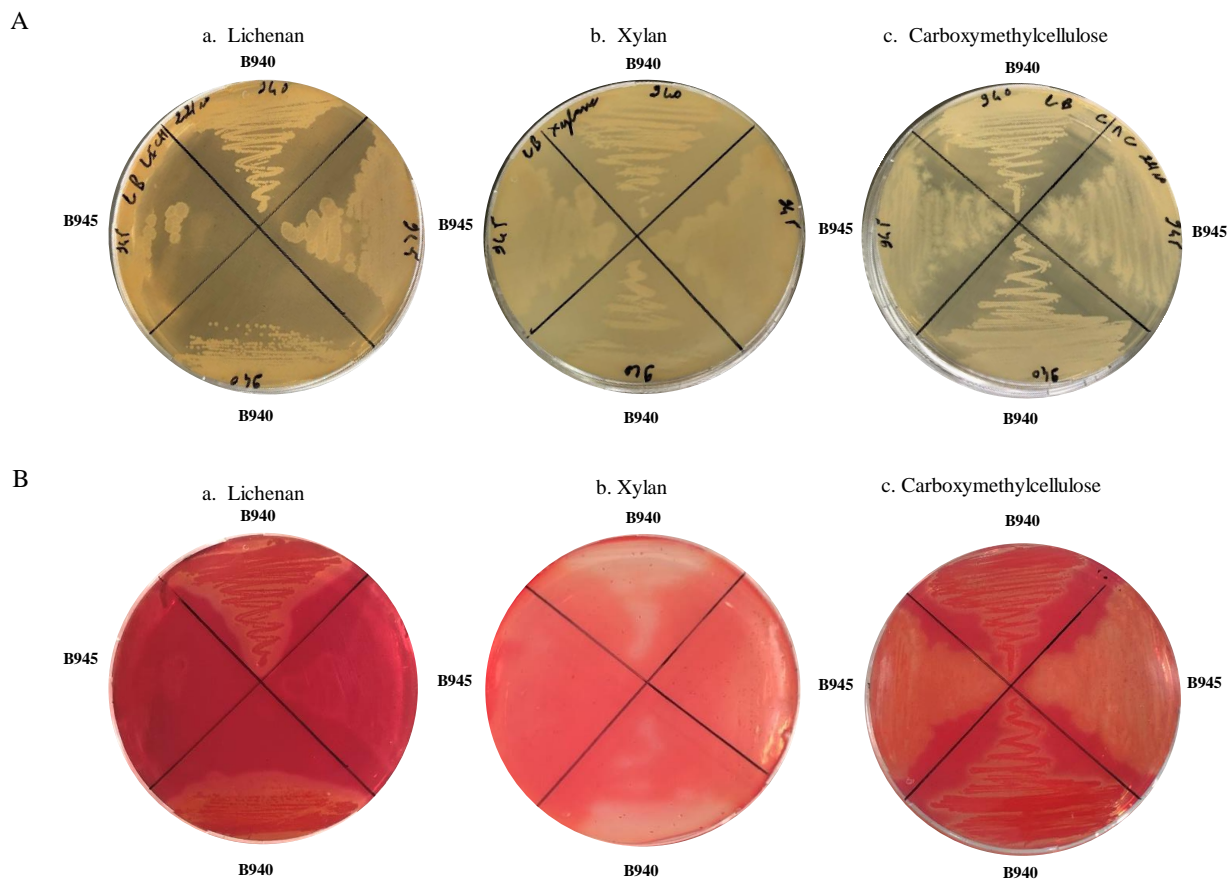


Figure 1: Growth (A) and detection of lichenase (a), xylanase (b) and carboxymethylcellulase (c) activities (B) of *Bacillus* CCMM B940 and CCMM B945 strains cultivated in LB agar streak-plates supplemented with 0.5% (w/v) lichenan, xylan or carboxymethylcellulose (CMC), respectively. Plates were incubated 18h at 37°C. Congo red staining was performed as described in Patrascu et al., 2017. Clear halos around the streaks indicate the degradation of the corresponding polysaccharide.

To reveal whether the strains were able to degrade the complex polysaccharides added into the medium, the plates were stained with 0,1 % Congo red as previously described (Patrascu *et al.*, 2017). Clear halos around the streaks indicated that B940 strain can degrade all three polysaccharides, and thus capable of producing the appropriate enzymes. As expected, lichenases and xylanases were only produced by the CCMM B940 strain (Fig.1B). Strain CCMM B945 exhibited significant activity against Carboxymethylcellulose (CMC), indicating production of endoglucanases, similarly to the CCMM B940 strain.

The Congo red test demonstrated that live cells of the B940 strain exhibited lichenase and xylanase activities and also produced endoglucanases for glucan-polymer degradation. However, to evaluate biomass utilization potential of this strain for biotechnology applications, we searched for the presence of those enzymes in the rather easily accessible B940 strain supernatants. For this purpose, the strain was cultivated in the Basal Salt Solution (BSS), a chemically defined medium modified from Parab *et al.* (2017), with a lower salt concentration ($\text{NaCl } 6\text{g.L}^{-1}$). The medium was supplemented with fruits peels (orange or apple) as the sole source of carbon and then sterilized 15min at 121°C . Fruit peels are a rich source of cellulose, hemicellulose, lignin and pectin (Rivas *et al.* 2008; Joglekar *et al.* 2019). Orange peel is rich in structural polysaccharides, including cellulose (18–20%), hemicellulose (14–16%), pectin (20–22%) and lignin (5–7%) (de la Torre *et al.*, 2019). Apple residues typically contain 7.2-43.6% cellulose, 4.3-24.4% hemicellulose, 15.2-23.5% lignin and 3.5-14.32% pectin (Dhillon *et al.* 2013). Both substrates were chosen because of their abundance as industrial waste around the world (de la Torre *et al.* 2019).

A single colony of CCMM B940 and CCMM B945 from LB agar medium was picked to inoculate 5mL of LB Broth (Difco) and incubated overnight at 37°C (with continuous stirring at 170 rpm), followed by second culture in 5 mL of BSS medium supplemented with 0.5 % apple or orange peels and inoculated at 1%. Before adding them in the medium, apple and orange peels were dried for 24h at 60°C and crumbled finely using an electric grinder. After 48 h of incubation at 37°C with stirring (170 rpm), both of the strains grew well in the BSS supplemented with fruit peels representing agro-industrial wastes as shown in Figure S1. Additionally, this test confirmed the ability of CCMM B940 and CCMM B945 strains to break down fibres from the peels and use the degradation products.

Protein samples from B940 and B945 strains cultivated for 48h at 37°C in 30 mL BSS medium supplemented with 0.5% orange and apple peels were prepared to detect and quantify hemicellulolytic and cellulolytic activities in the extracellular fluids. Briefly, cultures were centrifuged for 15 min at $5000\times g$ and 4°C , supernatants were filtered through a $0,22 \mu\text{m}$

Millipore filter, and then concentrated 25-fold in a Spin-X UF10K concentrator following the supplier's protocol (Corning B.V., Amsterdam, The Netherlands).

Agar-well plate enzymatic assays were performed to detect xylanase, lichenase and endoglucanase activities using concentrated extracellular proteins. Concentrated extracellular proteins from CCMM B940 and control strain CCMM B945 were prepared in the same way. The samples were loaded (60 μ L/well) in Petri dishes containing BSS medium supplemented with either 0.1% chromogenic AZCL-Xylan (Megazyme, Wicklow, Ireland), 0.5% non-chromogenic CMC (Sigma-Aldrich, MO, USA) or lichenan (Megazyme) polysaccharides. The plates were incubated overnight at 37°C and those with non-chromogenic polysaccharide were stained with Congo red as described above. Clear and blue halos around the wells indicated that the CCMM B940 cultivated with apple peels was able to produce lichenase (Fig. 2a), endoglucanase (Fig. 2c, although weakly in the tested conditions), and xylanase (Fig.2b). The same results were obtained with orange peels (not shown).

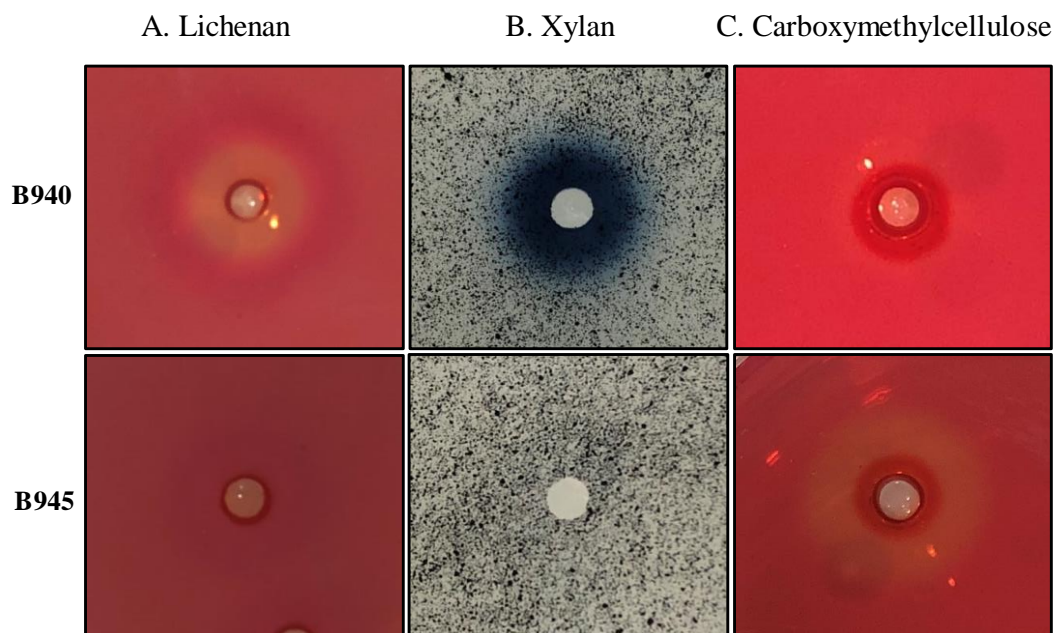


Figure 2: Detection of lichenase (A), xylanase (B) and carboxymethylcellulase (C) activities of *Bacillus* CCMM B940 and B945 strains, using agar-well plate assays with concentrated extracellular proteins of BSS cultures with 0.5% apple. Agar plate BSS medium was supplemented with 0.5% (w/v) lichenan, carboxymethylcellulose (CMC), or 0.1 % AZCL beechwood xylans. Plates were incubated overnight at 37°C. Clear and blue halos around the wells indicate a positive sample for the corresponding glycoside hydrolase activity.

The strain is able to grow at 55°C in Tryptic Soy broth (Aanniz et al. 2015) and we also observed that the strain is capable of growing in BSS medium supplemented with lichenan and xylan at the same temperature (data not shown), thus reinforcing the interest of its characteristics for industrial applications requiring thermostable enzymes.

In contrast to CCMM B940 strain results, the control strain CCMM B945 was not able to produce xylanase or lichenase when cultivated in the presence of apple or orange peels (Fig. 2). Moreover, extracellular hemicellulolytic activities of the strain CCMM B940 were quantified using the dinitrosalicylic acid (DNS) spectrophotometric method for reducing sugars as described by Miller (1959). Protein concentration was determined by the Bradford protocol (Bradford, 1976) with bovine serum albumin (BSA) as the standard. The amount of protein samples and the incubation time were chosen to provide assay conditions in which the measured activity was proportional to these two parameters. The enzymatic assays were all carried out at 55°C in order to quantify the activities under conditions close to those of industrial processes using thermostable enzymes. Reducing sugars that were released after enzyme-substrate incubations were quantified in triplicates using glucose or xylose as a standard. One international unit (IU) was defined as the amount of enzyme, which produced 1µmol of reducing sugars in 1min. The xylanase and lichenase activities of the extracellular proteins from BSS cultures with 0.5% apple and orange peels are listed in Table 1. Strain CCMM B945 was again used as a control. No reducing sugars was detectable for strain CCMM B945 proteins incubated with xylan or lichenan. The lichenase activity of CCMM B940 was approximately 2 times higher than the xylanase activity in the cultures with natural peels. Both activities were higher in apple peel cultures than in orange peels, suggesting that the produced enzymes were either more numerous or more active in metabolizing carbohydrates in apple peels. This could be due to the nature of fibres present in the peel (sugar composition and types of glycosidic bonds) and/or to differential induction of glycoside hydrolases encoding gene expression. Strain CCMM B940 exhibited xylanase activities approximately 2-fold and over 10-fold higher in apple peel cultures than thermophilic strains *B. licheniformis* 2D55 (Kazeem *et al.*, 2017) and *Bacillus sp.* 275 (Gong *et al.*, 2017), respectively.

Table 1: Lichenase and xylanase specific activities of extracellular proteins from Bacillus CCMM B940 and CCMM B945 cultivated in BSS medium supplemented with 0.5% apple and orange peels. Specific activities are given as μmol of glucose (incubation with lichenan) or xylose (incubation with xylans) equivalent produced per min and per mg of protein. Each value is the mean of three different assays ($\pm\text{SD}$). nd: not detectable.

Strains	Apple		Orange	
	CCMM B940	CCMM B945	CCMM B940	CCMM B945
Lichenase activity (IU/mg)	4.06 \pm 1.1	nd	1.6 \pm 0.2	nd
Xylanase activity (IU/mg)	2.39 \pm 0.29	nd	0.98 \pm 0.2	nd

In order to further investigate the putative functions of the CCMM B940 strain and to achieve its reclassification within the genus *Bacillus*, we sequenced and examined the whole genome of this strain. Thus, genomic DNA was extracted with Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). The concentration and quality were determined using Nanodrop and Qubit spectrophotometers. Genomic DNA was sequenced at Eurofins Genomics (Cologne, Germany) using Illumina HiSeq technology. The library was prepared with 2×150 -bp paired-end read length, including DNA fragmentation, adapter ligation, amplification, and size selection. All of the steps were performed according to Eurofins Genomics protocols, producing 7,612,190 reads.

The raw reads were then trimmed using Trimmomatic v0.39 (Bolger et al. 2014) with the following parameters : SLIDINGWINDOW:4:20; ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE.fa:2:30:20:2: LEADING:3, TRAILING:3 and MINLEN:60. We verified the presence/absence of phix sequences using bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) with the following parameters: --trim-to 80 --end-to-end --no-unal --no-sq --no-head -p 12. Processed reads were then assembled using the SPAdes *de novo* assembler v3.13.1 (Bankevich et al. 2012) testing assemblies with k-mer values: 21,33,55,77 using the parameter: --careful. Depending on the size of insert, scaffolds smaller than 350bp were filtered out. Assembly quality was assessed using in-house script and QUAST v5.0.0 (Gurevich *et al.*, 2013). We estimated genome

completeness at 99.59% and checked that no contamination was detected using CheckM v1.1.3 (Parks *et al.*, 2015).

After eliminating low coverage and small contigs (<350bp), we obtained a total of 38 contigs and 34 scaffolds resulting in a genome of 4,315,004 bp and an average G+C content of 45.87% which is close to other genomes from the *Bacillus subtilis* group (Rey *et al.* 2004; Du *et al.* 2019). The *N*50 of the draft genome is 440,121 bp, with an average of 126,912 bp and a notable four gap region (Fig. 3). Species identity was confirmed by comparing the genome reference sequences of *B. licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* available in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using the BLAST service deployed on local servers with the genome obtained sequences and fastANI (Jain *et al.* 2018). The draft genome was most closely related to *B. paralicheniformis* Bac84 (accession number ASM299392v1) living in sea

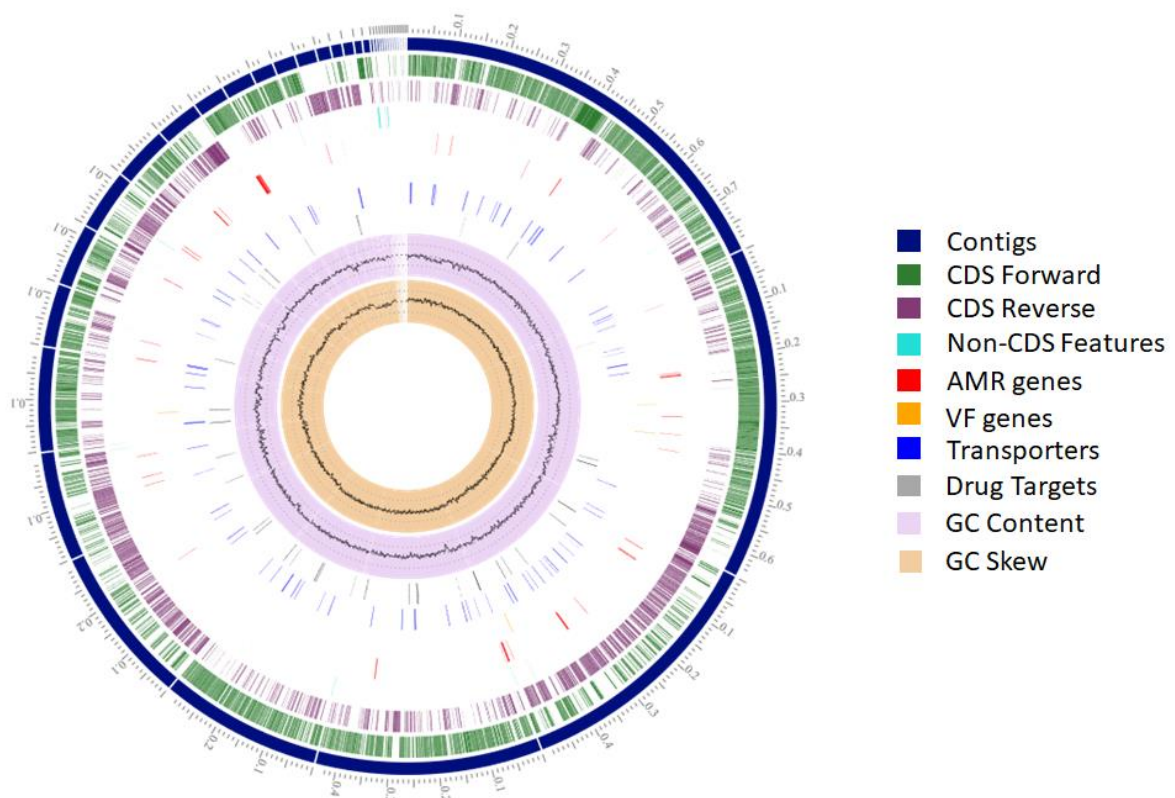


Figure 3: Circular representation of the B. paralicheniformis CCMM B940 chromosome using PATRIC based on 34 assembled scaffolds. From outer to inner ring— contigs (scale—x1Mbp), CDS on the forward strand, CDS on the reverse strand, RNA genes, homologous CDS to known antimicrobial resistance (AMR) genes, CDS with homology to known virulence factors (VF), GC content and GC skew

environment (Othoum *et al.*, 2019) with an ANI value of 98.94%, and shared only 94.36% identity with *Bacillus licheniformis* DSM 13^T (NC_006270.3). *B. aerius* CCMM B940 was therefore reclassified as *B. paralicheniformis* CCMM B940, placing it in the *B. subtilis* group;

a group known for its wide array of uses in biotechnology mainly through species like *B. subtilis* and *B. licheniformis* (Fan *et al.*, 2017). Taxonomic identity of the CCMM B940 strain was also confirmed using the GTDB-Tk tool for genome classification (Chaumeil *et al.*, 2020) with 98.95% identity to the *B. paralicheniformis* KJ-16 genome (accession number ASM104248v2). The genome was then annotated using the default parameters of Prokka 1.14 (Seemann 2014) showing 4,259 protein-coding genes, 51 tRNAs and 4 complete rRNAs.

We further used eggNOG-mapper v2.0.1 (Huerta-Cepas *et al.*, 2017) to assign proteins sequences into functional categories. More than 76% of the predicted proteins were attributed to functional subsystems. Proportions of genes with known functions (3047 CDS) were assigned to each category as presented in Fig.4. Interestingly, a high proportion of CCMM B940 genes was assigned to the carbohydrate transport and metabolism (11.3%) as well as amino acid transport and metabolism (12.5%) proteins. In a study conducted on *Bacillus velezensis*, *Bacillus safensis* and *Bacillus altitudinis* genomes, only 6.1% of the predicted proteins were assigned to carbohydrate transport and metabolism (Datta *et al.*, 2020), while in *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus siamensis*, it represents a maximum of 8% in the pan and the core genomes (Chun *et al.*, 2019). *B. paralicheniformis* has not been thoroughly studied for carbohydrate metabolism yet, but is phylogenetically very close to the *B. licheniformis* that has been widely used in the fermentation industry for production of enzymes, antibiotics and other chemicals (Madslie *et al.*, 2012).

Hereafter, we focused on CCMM B940 glycoside hydrolases related to hemicellulose, cellulose and pectin degradation, comparing their protein sequences to the sequences of GH and pectate lyase (PL) of seven strains of *B. paralicheniformis* (A4-3, ATCC 9945a, BL-09, CBMAI 1303, FA6, MDJK30, ZAP17) available in the CAZY database (Lombard *et al.* 2014; database release 22 November 2020). Blast results was obtained using default parameters. Best hits with almost 90% amino-acid identity and 50% length alignment were selected and illustrated in Table 2 (the corresponding sequences are provided in Fig S2). Among 74 GH and PL sequences from CCMM B940 showed homology to other strains of *B. paralicheniformis*, 52 are dedicated to the degradation of carbohydrates in plant cell walls, representing 27 different CAZymes families according to the classification of B. Henrissat (Lombard *et al.* 2014). Thirty-two sequences of GH1, GH3, GH5, GH8, GH11, GH16, GH26, GH30, GH31, GH32, GH42, GH43, GH51, GH53, GH68, GH73 were linked to the degradation of hemicellulose, four sequences of GH5, GH9, GH12, GH48 for cellulose metabolism, one sequence (GH5) either for hemicellulose or cellulose degradation, and eleven sequences of GH (GH28, GH105) and PL (PL1, PL3, PL9,

PL11, PL2) were attributed to pectin degradation (Table 2). Four sequences corresponded to enzymes (GH1, GH4) involved in glycolytic pathways. The remaining sequences were mainly related to the hydrolysis of starch and peptidoglycan (not shown).

Table 2: Annotated genes encoding lignocellulose-degrading enzymes in B. paralicheniformis CCMM B940

Enzymes	Accession number	Activity	CAZyme Family	Reference genes				
				Accession number	Species	Identity (%)	Subject sequence length (bp)	Alignment Length (bp)
<i>Hemicellulose related</i>	EOOONOAK_01749	Aryl-phospho-beta-D-glucosidase BglC	GH1	ARA87766.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.78	472	472
	EOOONOAK_03335	Aryl-phospho-beta-D-glucosidase BglH	GH1	AGN35231.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> ATCC 9945a	100	100	100
	EOOONOAK_03002	Aryl-phospho-beta-D-glucosidase BglC	GH1	AJO16530.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	100	491	478
	EOOONOAK_01773	Aryl-phospho-beta-D-glucosidase BglH	GH1	QEO05069.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	99.57	469	469
	EOOONOAK_03715	Endo-1,4-beta-xylanase A	GH11	QEO05734.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	100	213	213
	EOOONOAK_02553	Beta-glucanase	GH16	ARA86799.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.59	243	243
	EOOONOAK_03322	Mannan endo-1,4-beta-mannosidase	GH26	QFY39913.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	98.89	360	360
	EOOONOAK_03205	Beta-hexosaminidase	GH3	QEO05378.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	99.69	644	643
	EOOONOAK_02186	Glucuronoxylanase XynC	GH30	AJO20016.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	100	420	420
	EOOONOAK_01418	Oligosaccharide 4-alpha-D-glucosyltransferase	GH31	QFY38704.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	99.75	802	802
	EOOONOAK_02225	Alpha-xylosidase	GH31	AJO19971.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	99.61	769	769
	EOOONOAK_02112	Levanbiose-producing levanase	GH32	ARA87316.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.8	515	495
	EOOONOAK_01584	Sucrose-6-phosphate hydrolase	GH32	AJO20434.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	99.37	478	478
	EOOONOAK_01729	Sucrose-6-phosphate hydrolase	GH32	AJO20595.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	98.98	492	492
	EOOONOAK_00085	Levanase	GH32CB M66	QFY38018.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	100	677	677
	EOOONOAK_02224	hypothetical protein	GH3CB M6	AJO19972.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	100	980	980
	EOOONOAK_03904	Beta-galactosidase BglY	GH42	ARA84401.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.42	690	690
EOOONOAK_04173	Beta-galactosidase YesZ	GH42	QFY39293.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	100	665	665	

	EOOONOAK_01837	Beta-galactosidase GanA	GH42	QFY40673.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	99.56	684	684
	EOOONOAK_03858	Beta-xylosidase	GH43	ARA84797.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.62	532	532
	EOOONOAK_03859	Non-reducing end alpha-L-arabinofuranosidase	GH43	ARA84798.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.03	515	515
	EOOONOAK_03489	Extracellular endo-alpha-(1->5)-L-arabinanase 1	GH43	ARA85201.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	100	316	316
	EOOONOAK_00089	Beta-xylosidase	GH43	ARA86580.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	100	533	533
	EOOONOAK_01777	Extracellular endo-alpha-(1->5)-L-arabinanase 2	GH43	ARA88110.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.79	469	469
	EOOONOAK_02586	Extracellular endo-alpha-(1->5)-L-arabinanase 1	GH43	QFY37786.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	99.69	320	320
	EOOONOAK_02185	Arabinoxylan arabinofuranohydrolase	GH43CB M6	QFY37223.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	100	515	515
	EOOONOAK_01157	hypothetical protein	GH5	ARA85656.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.82	560	560
	EOOONOAK_02594	Intracellular exo-alpha-(1->5)-L-arabinofuranosidase	GH51	ARA86758.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.80	502	502
	EOOONOAK_01836	Arabinogalactan endo-beta-1,4-galactanase	GH53	AGN38579.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> ATCC 9945a	98.58	437	424
	EOOONOAK_02113	Levansucrase	GH68	ARA87315.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	100	481	481
	EOOONOAK_04229	hypothetical protein	GH73	QEO06161.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	98.95	570	570
	EOOONOAK_03432	Reducing-end xylose-releasing exo-oligoxylanase Rex8A xylanase probable	GH8	QFY39429.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	99.77	434	434
<i>Cellulose-related</i>	EOOONOAK_03622	Endoglucanase S	GH12	ARA86997.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	100	261	261
	EOOONOAK_01156	Exoglucanase-2	GH48	AJO18128.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	100	717	704
	EOOONOAK_01385	Endoglucanase	GH5, CBM3	AJO18373.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	99.81	518	518
	EOOONOAK_01155	Endoglucanase A	GH9CB M3	AJO18127.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	100	653	653
<i>Glucose metabolism</i>	EOOONOAK_00372	6-phospho-beta-glucosidase GmuD	GH1	AJO18923.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	100	471	471
	EOOONOAK_01723	6-phospho-beta-glucosidase GmuD	GH1	AJO20590.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	99.16	478	478
	EOOONOAK_03054	putative 6-phospho-beta-glucosidase	GH4	ARA84298.1 0	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.55	444	444
<i>Hemicellulose or cellulose related</i>	EOOONOAK_01655	putative 6-phospho-beta-glucosidase	GH4	ARA87677.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	100	442	442

	EOOONOAK_01158	hypothetical protein	GH5	QEO07050.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	100	395	395
<i>Pectin degradation</i>	EOOONOAK_04163	Unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase YesR	GH105	AJO17709.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	99.71	344	344
	EOOONOAK_02457	Unsaturated rhamnogalacturonyl hydrolase YteR	GH105	AJO19596.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	99.73	373	373
	EOOONOAK_02256	Exo-poly-alpha-D-galacturonosidase	GH28	QFY37288.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	100	436	434
	EOOONOAK_02563	hypothetical protein	PL1	QFY37765.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> FA6	100	494	494
	EOOONOAK_04252	Pectate lyase	PL1	AJO17744.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> BL-09	99.53	428	428
	EOOONOAK_01685	Pectate trisaccharidylase	PL1	QEO04986.1]	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	99.71	341	341
	EOOONOAK_04170	Rhamnogalacturonan exolyase YesX	PL11	QEO06607.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	100	628	628
	EOOONOAK_04168	Rhamnogalacturonan endolyase YesW	PL11	QEO08401.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	100	622	622
	EOOONOAK_04174	hypothetical protein	PL26	QEO06610.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	99.07	886	863
	EOOONOAK_02080	Pectate lyase C	PL3	ARA87346.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MDJK30	99.55	222	221
	EOOONOAK_01392	hypothetical protein	PL9	QEO07258.1	<i>Bacillus paralicheniformis</i> A4-3	100	468	468

These predictions first confirmed the experimental observations in this study for the degradation of xylan, lichenan and CMC as the CCMM B940 genome carries glycoside hydrolases from GH5, GH9, GH11 and GH16 families of CAZymes known to target these substrates. They also provided additional information on the carbohydrate metabolism of CCMM B940 such as pectinase activity as well as the presence of carbohydrate binding modules (CBM3, CBM6, CBM66) associated with GHs helping them to bind to cellulose or hemicellulose polysaccharides to improve their efficiency. A few other studies (Wang et al. 2017; Chen et al. 2018) examined the genomic sequences of *B. paralicheniformis* and predicted their CAZymes, but without the experimental validation. To our knowledge, this is the first report that combines *in silico* genomic analysis and *in vitro* experiments to study the carbohydrate metabolism of *B. paralicheniformis*. These combined analyses reinforce the practical and potential use of CCMM B940 strain for industrial purposes. *Indeed*, *Bacillus* species are known to produce 60% of commercially available enzymes, mostly being homologous proteins that are naturally secreted in the growth medium (Westers et al. 2004). The strain CCMM B940 exhibits cellulolytic and

hemicellulolytic activities at high temperature and produces extracellular thermostable enzymes.

Based on whole-genome sequencing we demonstrated that the *B. aerius* strain CCMM B940 could be reclassified as *B. paralicheniformis*. Genomic analysis confirmed the fibrolytic potential of the strain CCMM B940 observed *in vitro* using purified and natural substrates and provided information on its ability to degrade pectins. This statement reinforces the strain's interest especially in agro-waste bioconversion. To our knowledge, this is the first report of lichenase and xylanase activities by a thermophilic strain of *B. paralicheniformis* isolated from a hot spring. The CCMM B940 strain is part of the large Coordinated Moroccan Collections of Microorganisms (CCMM), which comprise more than 1800 isolates of bacteria, yeasts and fungi. Many of these microorganisms have also been isolated from extremophile environments (Berrada et al. 2012; Aanniz et al. 2015) and they may harbor beneficial attributes such as production of heat-resistance enzymes as already observed in *B. amyloliquefaciens* (Beladjal et al., 2018) and *B. subtilis* (den Besten et al., 2017) strains. For this purpose, complete genome sequencing not only enables accurate identification and reclassification of CCMM isolates, i.e. the thermophilic strains of the *B. aerius* group, but also opens the door to the field of biotechnological applications such as production of second- and third-generation biofuels from raw or pre-treated biomass, medical and nutraceutical fields and food processing (Benedetti et al., 2019), in the favor of the fibrolytic potential (CAZymes) of these strains. Enzymatic activities of these strains should be further studied in order to determine the most suitable markets in biotechnology (agro-waste bioconversion, depollution, health, pharmaceuticals etc...).

References

- Aanniz T et al (2015) Thermophilic Bacteria in Moroccan Hot Springs, Salt Marshes and Desert Soils. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(2): 443–53.
- Bankevich A et al (2012) SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455–77.
- Beladjal L et al (2018) Life from the Ashes: Survival of Dry Bacterial Spores after Very High Temperature Exposure. *Extremophiles* 22(5): 751–759.
- Benedetti M et al (2019) Green Production and Biotechnological Applications of Cellwall Lytic Enzymes. *Applied Sciences (Switzerland)* 9(23): 5012.
- Berrada I et al (2012) Diversity of Culturable Moderately Halophilic and Halotolerant Bacteria in a Marsh and Two Salterns a Protected Ecosystem of Lower Loukkos (Morocco). *African Journal of Microbiology Research* 6(10): 2419–34.
- den Besten HMW, Berendsen EM, Wells-Bennik MHJ, Straatsma H, Zwietering MH (2017) Two Complementary Approaches to Quantify Variability in Heat Resistance of Spores of *Bacillus Subtilis*. *International Journal of Food Microbiology* 253: 48–53.
- Biely P, Singh S, Puchart V (2016) Towards Enzymatic Breakdown of Complex Plant Xylan Structures: State of the Art. *Biotechnology Advances* 34(7): 1260–74.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30(15): 2114–20.
- Bouchaou L, Warner NR, Tagma T, Hssaisoune M, Vengosh A (2017) The Origin of Geothermal Waters in Morocco: Multiple Isotope Tracers for Delineating Sources of Water-Rock Interactions. *Applied Geochemistry* 84: 244–53.
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72(1–2): 248–54.
- Chaumeil PA, Mussig AJ, Hugenholtz P, Parks DH (2020) GTDB-Tk: A Toolkit to Classify Genomes with the Genome Taxonomy Database. *Bioinformatics* 36(6): 1925–27.
- Chen L et al (2018) Comparative Genome Analysis of *Bacillus Velezensis* Reveals a Potential for Degrading Lignocellulosic Biomass. *3 Biotech* 8(5): 253.
- Chun BH, Kim KH, Jeong SE, Jeon CO (2019) Genomic and Metabolic Features of the *Bacillus Amyloliquefaciens* Group— *B. Amyloliquefaciens*, *B. Velezensis*, and *B. Siamensis*— Revealed by Pan-Genome Analysis. *Food Microbiology* 77: 146–57.

Cidu R, Bahaj S (2000) Geochemistry of Thermal Waters from Morocco. *Geothermics* 29(3): 407–30.

Datta S, Saha D, Chattopadhyay L, Majumdar B (2020) Genome Comparison Identifies Different *Bacillus* Species in a Bast Fibre-Retting Bacterial Consortium and Provides Insights into Pectin Degrading Genes. *Scientific Reports* 10(1): 1–15.

Dhillon GS, Kaur S, Brar SK (2013) Perspective of Apple Processing 401 Wastes as Low-Cost Substrates for Bioproduction of High Value Products: A Review. *Renewable 402 and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.046>.

Du Y et al (2019) Comparative Genomic Analysis of *Bacillus Paralicheniformis* MDJK30 with Its Closely Related Species Reveals an Evolutionary Relationship between *B. Paralicheniformis* and *B. Licheniformis*. *BMC Genomics* 20(1): 283.

Dunlap CA (2015) The Status of the Species *Bacillus Aerius*. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65(7): 2341.

Fan B, Blom J, Klenk H-P, Borriss R (2017) *Bacillus Amyloliquefaciens*, *Bacillus Velezensis*, and *Bacillus Siamensis* Form an ‘Operational Group *B. Amyloliquefaciens*’ within the *B. Subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology* 8: 22.

Gong G et al (2017) Complete Genome Sequence of *Bacillus* Sp. 275, Producing Extracellular Cellulolytic, Xylanolytic and Ligninolytic Enzymes. *Journal of Biotechnology* 254: 59–62.

Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUASt: Quality Assessment Tool for Genome Assemblies. *Bioinformatics* 29(8): 1072–75.

Houfani AA et al (2020) Insights from Enzymatic Degradation of Cellulose and Hemicellulose to Fermentable Sugars– a Review. *Biomass and Bioenergy* 134: 105481.

Huerta-Cepas J et al (2017) Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by EggNOG-Mapper. *Molecular Biology and Evolution* 34(8): 2115–22.

Jain C et al (2018) High-Throughput ANI Analysis of 90K Prokaryotic Genomes Reveals Clear Species Boundaries. *Nat Comm* 9, 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>.

Joglekar SN, Pathak PD, Mandavgane SA, Kulkarni BD (2019) Process of Fruit Peel Waste Biorefinery: A Case Study of Citrus Waste Biorefinery, Its Environmental Impacts and Recommendations. *Environmental Science and Pollution Research* 26(34): 34713–22.

Kazeem MO, Shah UKM, Baharuddin AS, AbdulRahman NA (2017) Prospecting Agro-Waste Cocktail: Supplementation for Cellulase Production by a Newly Isolated Thermophilic *B. Licheniformis* 2D55. *Applied biochemistry and biotechnology* 182(4): 1318–40.

Knapik K, Becerra M, González-Siso MI (2019) Microbial Diversity Analysis and Screening for Novel Xylanase Enzymes from the Sediment of the Lobios Hot Spring in Spain. *Scientific reports* 9(1): 11195.

de la Torre I et al (2019) Utilisation/Upgrading of Orange Peel Waste from a Biological Biorefinery Perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(15): 5975–91.

Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast Gapped-Read Alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9(4): 357–59.

Lombard V et al (2014) The Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013. *Nucleic acids research* 42(Database issue): D490-5.

Madslie EH, Olsen JS, Granum PE, Blatny JM (2012) Genotyping of *B. Licheniformis* Based on a Novel Multi-Locus Sequence Typing (MLST) Scheme. *BMC Microbiology* 12(1): 230.

Miller GL (1959) Determination of Reducing Sugar by DNS Method. *Anal chem* 31: 426–28.

Othoum G et al (2019) Comparative Genomics Study Reveals Red Sea *Bacillus* with Characteristics Associated with Potential Microbial Cell Factories (MCFs). *Scientific Reports* 9(1): 23955–900.

Parab P, Khandeparker R, Amberkar U, Khodse V (2017) Enzymatic Saccharification of Seaweeds into Fermentable Sugars by Xylanase from Marine *Bacillus* Sp. Strain BT21. *3 Biotech* 7(5): 296.

Parks DH et al (2015) CheckM: Assessing the Quality of Microbial Genomes Recovered from Isolates, Single Cells, and Metagenomes. *Genome Research* 25(7): 1043–55.

Patrascu O et al (2017) A Fibrolytic Potential in the Human Ileum Mucosal Microbiota Revealed by Functional Metagenomic. *Sci Rep* 7:40248.

Rey MW et al (2004) Complete Genome Sequence of the Industrial Bacterium *Bacillus Licheniformis* and Comparisons with Closely Related *Bacillus* Species. *Genome biology* 5(10): R77.

Rivas B et al (2008) Submerged Citric Acid Fermentation on Orange Peel Autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(7): 2380–87.

Seemann T (2014) Prokka: Rapid Prokaryotic Genome Annotation. *Bioinformatics* 30(14): 2068–69.

Thapa S et al (2020) Microbial Cellulolytic Enzymes: Diversity and Biotechnology with Reference to Lignocellulosic Biomass Degradation. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 19(3): 621–48.

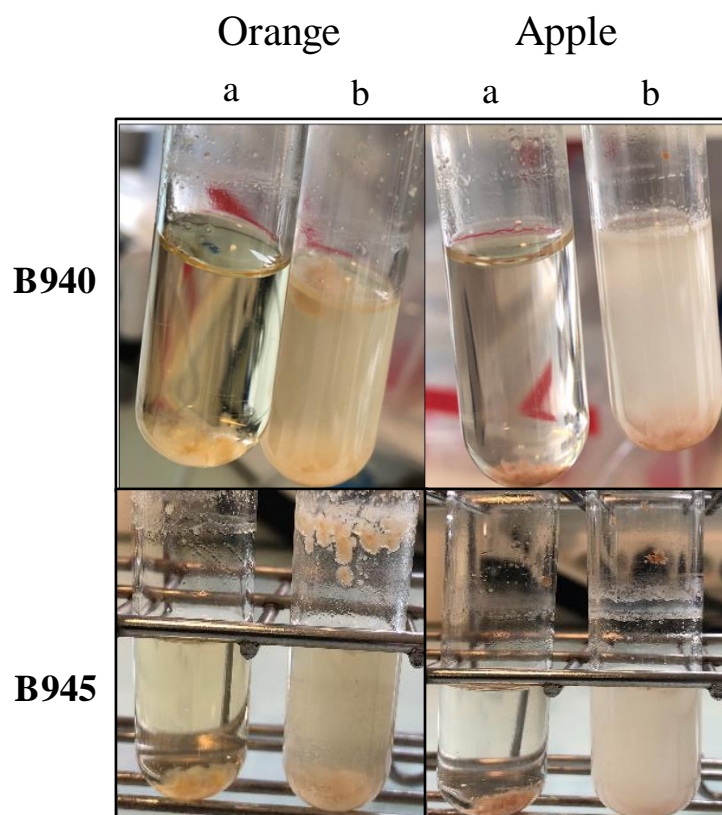
Wang Y et al (2017) Complete Genome Sequence of *Bacillus Paralicheniformis* MDJK30, a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Antifungal Activity. *Genome Announcements* 5(25): 577–94.

Westers L, Westers H, Quax WJ (2004) *Bacillus Subtilis* as Cell Factory for Pharmaceutical Proteins: A Biotechnological Approach to Optimize the Host Organism. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1694(1-3 SPEC.ISS.): 299–310.

Zeng Y, Himmel ME, Ding SY (2017) Visualizing Chemical Functionality in Plant Cell Walls Mike Himmel. *Biotechnology for Biofuels* 10(1): 263.

Zhang Z-Y et al (2018) Complete Genome Sequence of *Bacillus Velezensis* ZY-1-1 Reveals the Genetic Basis for Its Hemicellulosic/Cellulosic Substrate-Inducible Xylanase and Cellulase Activities. *3 Biotech* 8(11): 465.

Fig.S1 Cultures of the CCMM B940 and CCMM B945 *Bacillus* strains in BSS medium supplemented with 0.5% orange or apple peels for 48h at 37°C. a. negative control without bacteria; b. growth (turbidity) is observed for cultures on both substrates.



Article 2: Characterisation of hemicellulolytic *Bacillus paralicheniformis* CCMM strains as future fibrolytic probiotics

Les résultats obtenus dans le précédent article ont démontré l'existence d'une **fonction fibrolytique** au sein d'un isolat de *B. paralicheniformis* des CCMM, et ont posé les bases pour une exploration approfondie du potentiel enzymatique de cette espèce bactérienne récemment décrite et peu étudiée. Par conséquent, le criblage pour les activités fibrolytiques a été étendu à d'autres souches appartenant à l'espèce *B. aerius*, toutes thermophiles mais capables de pousser à des températures modérées. Sur 40 souches testées, 9 ont démontré une aptitude à dégrader différentes fibres purifiées au cours du criblage fonctionnel. Nous les avons reclassifiées en *B. paralicheniformis* et *Bacillus licheniformis*. En intégrant des méthodes biochimiques, génomique et protéomique, nous avons analysé les modifications, dépendantes du substrat, des enzymes extracellulaires sécrétées par ces souches, et ce à partir de cultures bactériennes sur fibres naturelles de carotte, pomme et orange. Une des souches les plus actives a été observée au microscope électronique à balayage, révélant la présence d'exopolysaccharide à la surface des bactéries.

Ces travaux ont donc permis de valider le potentiel fibrolytique d'une dizaine de souches de *Bacillus* et leur capacité à dégrader des fibres végétales variées que nous pouvons retrouver dans notre régime alimentaire.

Les caractéristiques du genre *Bacillus*, bactérie sporulante, en font un candidat intéressant pour sa résistance à des environnements acides, comme l'intestin par exemple. Certaines études récentes suggèrent qu'une réduction de la production d'AGCC et la déplétion des membres bactériens producteurs d'AGCC et dégradant les fibres sont associés à des maladies métaboliques chez l'Homme (Zhao *et al.*, 2018; Myhrstad *et al.*, 2020; Agus, Clément and Sokol, 2021). Ainsi, la modulation du microbiote intestinal par des membres bactériens dégradant les fibres pourrait être une approche prometteuse pour restaurer l'homéostasie intestinale. Partant de ce constat, nous avons émis l'hypothèse qu'une souche de *B. paralicheniformis* pourrait être une **candidate probiotique** intéressante qui pourrait apporter des fonctions fibrolytiques dans le colon et augmenter potentiellement la production d'AGCC par effet de cross-feeding. Les probiotiques appartenant au genre *Bacillus* sont utilisés depuis des décennies pour lutter contre les troubles métaboliques, mais très peu d'espèces sont utilisées, et souvent en mélange avec d'autres bactéries. Nous avons donc souhaité, dans la deuxième partie de ce travail, proposer l'une des souches fibrolytiques des CCMM comme

candidate probiotique chez l'Homme, afin d'étudier par la suite son innocuité (selon les recommandations de l'EFSA), sa capacité à « dialoguer » avec les cellules de l'hôte, et son impact sur le microbiote intestinal.

Ce deuxième article, dont je suis premier auteur, nous a permis de caractériser et de proposer une souche candidate probiotique fibrolytique appartenant à *B. paralicheniformis*, et a été soumis au journal « Scientific reports » (groupe Nature).

**CHARACTERISATION OF HEMICELLULOLYTIC *BACILLUS*
PARALICHENIFORMIS CCMM STRAINS AS FUTURE FIBROLYTIC
PROBIOTICS**

Serigne Inssa Ngom¹, Soufiane Maski^{2,3}, Bahia Rached^{4,5,6}, Taha Chouati^{4,5}, Lydie Oliveira Correia⁷, Catherine Juste¹, Thierry Meylheuc⁸, Bernard Henrissat^{9,10}, Elmostafa El Fahime⁵, Mohamed Amar^{2,4} & Christel Béra-Maillet^{1,*}

¹Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France.

²Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Morocco.

³Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, Rabat, Morocco.

⁴Collections Coordonnées Marocaines de Microorganismes, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Morocco.

⁵Unité d'Appui Technique à la Recherche Scientifique, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Morocco.

⁶Laboratoire de Chimie-Physique et Biotechnologies des Biomolécules et matériaux/ Equipe Microbiologie Biomolécules et Biotechnologies, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Morocco.

⁷Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, PAPPSO, 78350, Jouy-en-Josas, France.

⁸Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, MIMA2, 78350, Jouy en Josas, France.

⁹Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, Centre National de la Recherche Scientifique, Aix-Marseille Université, 13288, Marseille, France.

¹⁰Department of Biological Sciences, King Abdulaziz University, Jeddah, Saudi Arabia.

Running Title: *Bacillus paralicheniformis*, as future fibrolytic probiotics

*Address correspondence to Dr. Christel Béra-Maillet, christel.maillet@inrae.fr

ABSTRACT

Fibrolitic activities have been evidenced in *Bacillus* strains from the Moroccan Coordinated Collections of Microorganisms (CCMM) towards complex polysaccharides representative of dietary fibres entering the colon. We demonstrated hemicellulolytic activities for nine strains of *Bacillus aerius*, re-identified as *Bacillus paralicheniformis* and *Bacillus licheniformis*, on xylan, xyloglucan and lichenan when grown on purified polysaccharides as well as on natural substrates, with strain- and substrate-dependent production of glycoside hydrolases (GHs). Our combined methods, based on enzymatic assays, secretome, and genome analyses, highlighted the hemicellulolytic activities of *B. paralicheniformis* and the secretion of specific glycoside hydrolases. Genomic features of these strains revealed a complete set of GH genes dedicated to the degradation of various polysaccharides from dietary fibres.

B. paralicheniformis could therefore act as a major primary fibre degrader to modulate altered interactions within a dysbiotic gut microbiota, and is proposed as a future probiotic. This is an original and important finding as it opens new perspectives on fibrolitic probiotics for human health.

Keywords: *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus licheniformis*, plant cell wall polysaccharides, hemicelluloses, CAZymes, MLST, secretome, probiotics, EPS.

Introduction

The human gastrointestinal tract harbours trillions of microorganisms, commonly referred as “gut microbiota”. The gut microbiota maintains a symbiotic relationship with the host by performing various functions such as metabolizing undigested food components and influencing fundamental processes essential for health (Makki *et al.*, 2018; van de Guchte, Blottière and Doré, 2018). Among food components, dietary fibres (DFs) from fruits, vegetables, legumes, and cereals include resistant starch and hemicellulose-rich plant cell wall carbohydrates that are not digested by host enzymes. Therefore, complex polysaccharides from hemicelluloses enter the colon where they serve as substrates for intestinal bacteria, and in particular for primary fibre degraders. Considered “keystone” species of a trophic network (Ze *et al.*, 2013), these bacteria initiate the digestion of a variety of polysaccharides such as xylans, xyloglucan, lichenan, β -glucans and mannans thanks to a myriad of enzymes from diverse glycoside hydrolase (GH) families. GHs such as xylanases, xyloglucanases, lichenases, and endoglucanases are necessary to completely degrade these polysaccharides into simple sugars entering the glycolytic pathways of fermentative bacteria which produce Short-Chain Fatty Acids (SCFAs). As a main source of energy in the host, SCFAs play a central role in gastrointestinal epithelial cell integrity, glucose homeostasis, lipid metabolism, appetite regulation, and immune function (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021).

Some recent pieces of evidence suggest that deficiency in SCFA production and depletion of fibre-degrading bacterial members have been associated with gut inflammatory disorders and type 2 diabetes (Zhao *et al.*, 2018; Myhrstad *et al.*, 2020; Agus, Clément and Sokol, 2021). Thus, modulating the gut microbiota through fibre-degrading bacterial members could be a promising approach for restoring gut homeostasis. Probiotics are defined by the World Health Organization (WHO) as “live micro-organisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host” (Hill *et al.*, 2014). For many years, lactic acid bacteria and Bifidobacteria have been used as common probiotics. More recently, next-generation probiotics such as *Faecalibacterium prausnitzii* and *Akkermansia muciniphila* have been proposed to target specific health issues and may outweigh the commonly used conventional probiotics strains in terms of targeted health benefits (Kumari *et al.*, 2021).

Therefore, our study aims to screen *Bacillus* sp. strains for their fibrolytic potential towards complex polysaccharides entering the colon during digestion, and, *in fine*, to propose fibrolytic probiotic candidates. *Bacillus* species like *Bacillus licheniformis* are already used as probiotics in animals and humans, although this is still a small niche market for humans. However, their

enzymatic systems have been poorly explored. Recently, we reported for the first time a thermophilic strain of *Bacillus paralicheniformis* isolated from a Moroccan hot spring, which produces extracellular lichenase and xylanase activities and whose genome encodes numerous hemicellulose-degrading enzymes belonging to nearly 20 different GH families (Maski *et al.*, 2021). Forty strains of *Bacillus aerius*, some re-identified as *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis*, were included in our study for comparative enzyme assays and genomic analyses. Functional secretomics analysis revealed substrate-dependent changes in extracellular GHs secreted by the strain selected as a future probiotic candidate.

Results

Functional screening of the *B. aerius* CCMM strains revealed hemicellulolytic activities

Forty thermophilic strains previously identified as *B. aerius* (Aanniz *et al.*, 2015) were selected from the CCMM to assess their capacities to hydrolyze and metabolize hemicellulose sources from purified polysaccharides (Table S1). Functional screening of the 40 strains for lichenase and xylanase activities was performed using the basal salt solution (BSS) agar medium supplemented with lichenan and xylan, respectively, as the sole carbon source. Depending on the nature of the polysaccharides used, the growth of *Bacillus* strains was first tested on solid media. Nine strains: CCMM B774, CCMM B940, CCMM B951, CCMM B954, CCMM B960, CCMM B966, CCMM B969, CCMM B943, and CCMM B945 were able to grow on the mentioned substrates (not shown). Colonies were irregular or circular, with different sizes and either smooth or rough, as described for *Bacillus* strains (Polonca, 2020).

Strains growing on purified polysaccharides were then assessed for enzymatic activities. Clear halos around the streaks were observed for 9 of the 40 strains. Among them, five strains: CCMM B774, CCMM B951, CCMM B966, CCMM B969 (Fig. 1), and CCMM B940 (Maski *et al.*, 2021), showed activities on both polysaccharides.

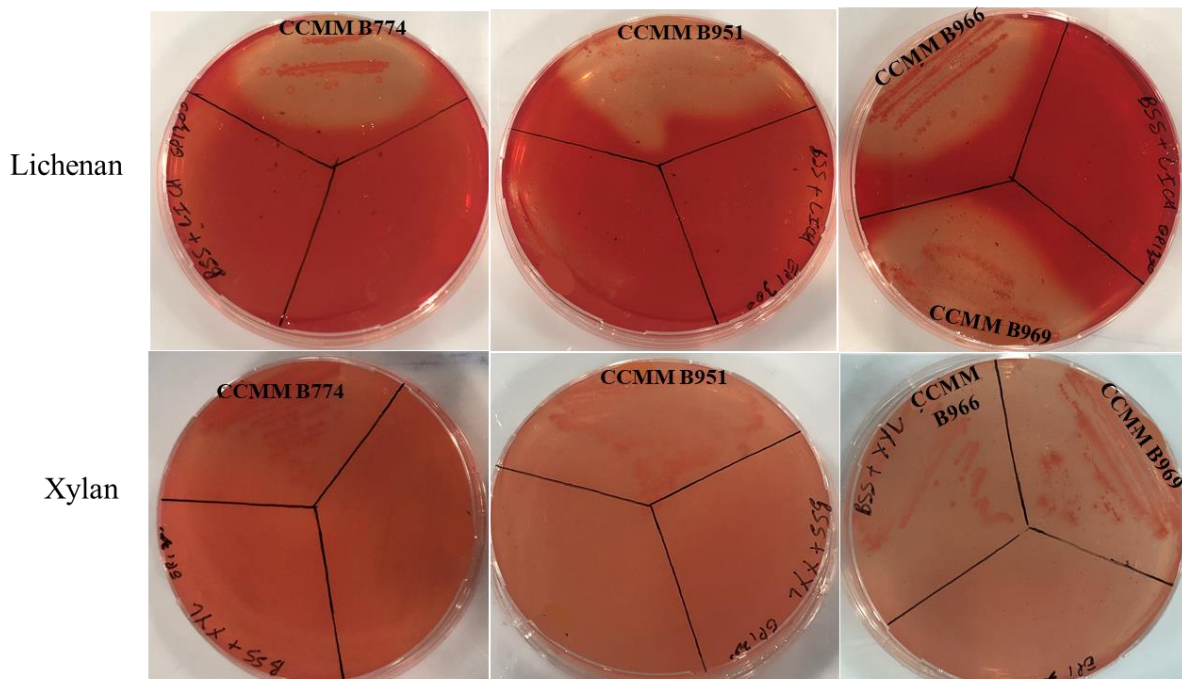


Figure 1. Detection of lichenase and xylanase activities of *Bacillus* CCMM strains grown in BSS agar medium supplemented with 0.5% (w/v) lichenan or xylan for 48h at 37 °C. Congo red staining revealed clear halos around the streaks in the presence of enzymatic activities.

Multilocus sequence typing confirmed the re-identification of *B. (para)licheniformis* hemicellulolytic strains

To assess and compare the phylogenetic classification of the nine hemicellulolytic *Bacillus* strains to other strains from the literature, we used different molecular methods based on single gene homology (16S rRNA and *gyrB* genes), multilocus sequence typing (MLST) scheme, or genome sequence comparison. The 16S rRNA gene sequences were all belonging to the genus *Bacillus*, with the highest similarity scores ranging from 99.8 to 100%. The closest species were *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis*. A Neighbor-joining phylogenetic tree, based on 16S rRNA sequences of the isolates and type-strains retrieved from the GenBank database, separated our strains into two groups: strains CCMM B774, CCMM B969, CCMM B940, CCMM B951, and CCMM B943 were close to *B. paralicheniformis*, while the strains CCMM B960, CCMM B945, CCMM B966, and CCMM B954 were closely related to *B. licheniformis* (Fig. 2).

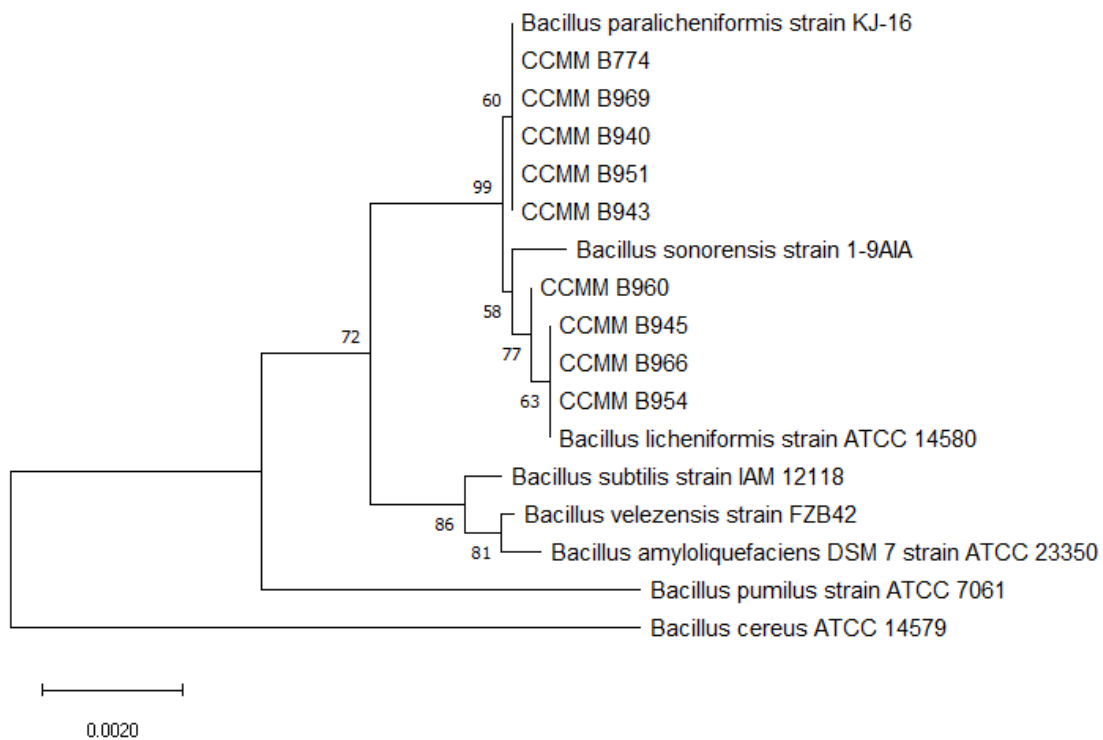


Figure 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of *Bacillus* isolates.

It has been previously described that gene *gyrB* could provide better species discrimination than 16S rRNA gene sequences in the *Bacillus subtilis* group (Wang *et al.*, 2007). For this reason, we used an intragenic fragment of *gyrB* to compare the strains using a new Neighbor-joining phylogenetic tree. The same clustering was obtained for *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis* species, except for strains CCMM B966 and CCMM B943 (Fig. S1).

We then used the recent and highly discriminant MLST method to compare the *Bacillus* strains to a more extensive set of previously published strains. Six housekeeping genes were used to discriminate between *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis* (see Methods).

Results showed that the identity of our loci ranged from 98 to 100% compared to the existing loci. A Neighbor-joining phylogenetic tree based on concatenated sequences distinctly separated all sequences into two different clades corresponding to *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis* species (Fig. 3). Hemicellulolytic strains CCMM B945, CCMM B954, CCMM B960, and CCMM B943 are classified as *B. licheniformis* while the other strains clustered with *B. paralicheniformis*. This result is coherent with the clustering based on the



Figure 3. Phylogenetic tree based on concatenated DNA sequences: The phylogenetic tree was visualized using iTOL v4 integrated in PubMLST database based on the internal fragments of six housekeeping genes of nine *Bacillus* CCMM strains.

housekeeping gene *gyrB*. We, therefore, can conclude that the strains CCMM B945, CCMM B954, CCMM B960, and CCMM B943 should be reclassified as *B. licheniformis*, and the strains CCMM B969, CCMM B940, CCMM B774, CCMM B966, and CCMM B951 as *B. paralicheniformis* (Table S1).

The re-identification of the *Bacillus* strains is fully consistent with whole-genome sequencing and species belonging to *B. paralicheniformis*: CCMM B774, CCMM B966, CCMM B969, and CCMM B940, and to *B. licheniformis*: CCMM B943 (see the genomic features described below).

***B. paralicheniformis* produced extracellular decorated filaments resembling exopolysaccharides when cultivated on natural carbohydrates**

SEM analysis was used to reveal the interactions of hemicellulolytic *Bacillus* strains with natural fibres. *B. paralicheniformis* CCMM B951 was cultured in BSS medium supplemented with apple, carrot, or orange peel fibres. Before inoculation, fibres displayed a smooth and rigid surface (Fig. 4A). Cells were identified as rod-shaped bacteria colonizing the surface of the three fibres (Fig 4B).

Upon examination of the cell surfaces, the bacteria were trapped in filamentous structures of an organised network with regular aggregates, for the three natural fibres (Fig. 4C), which is similar to extracellular polymeric substances (EPS) found in *B. subtilis* (Bridier, Meylheuc and Briandet, 2013), and mainly composed of polysaccharides. Genomic sequence analysis of CCMM B951 confirmed the presence of the 15-gene *epsA-O* operon encoding the EPS polysaccharide (contig 3, cds 110153_110905 to cds 125101_126078).

The EPS-mediated cohesive network and substrate colonisation could therefore support the presence of biofilms on apple, carrot, and orange fibres.

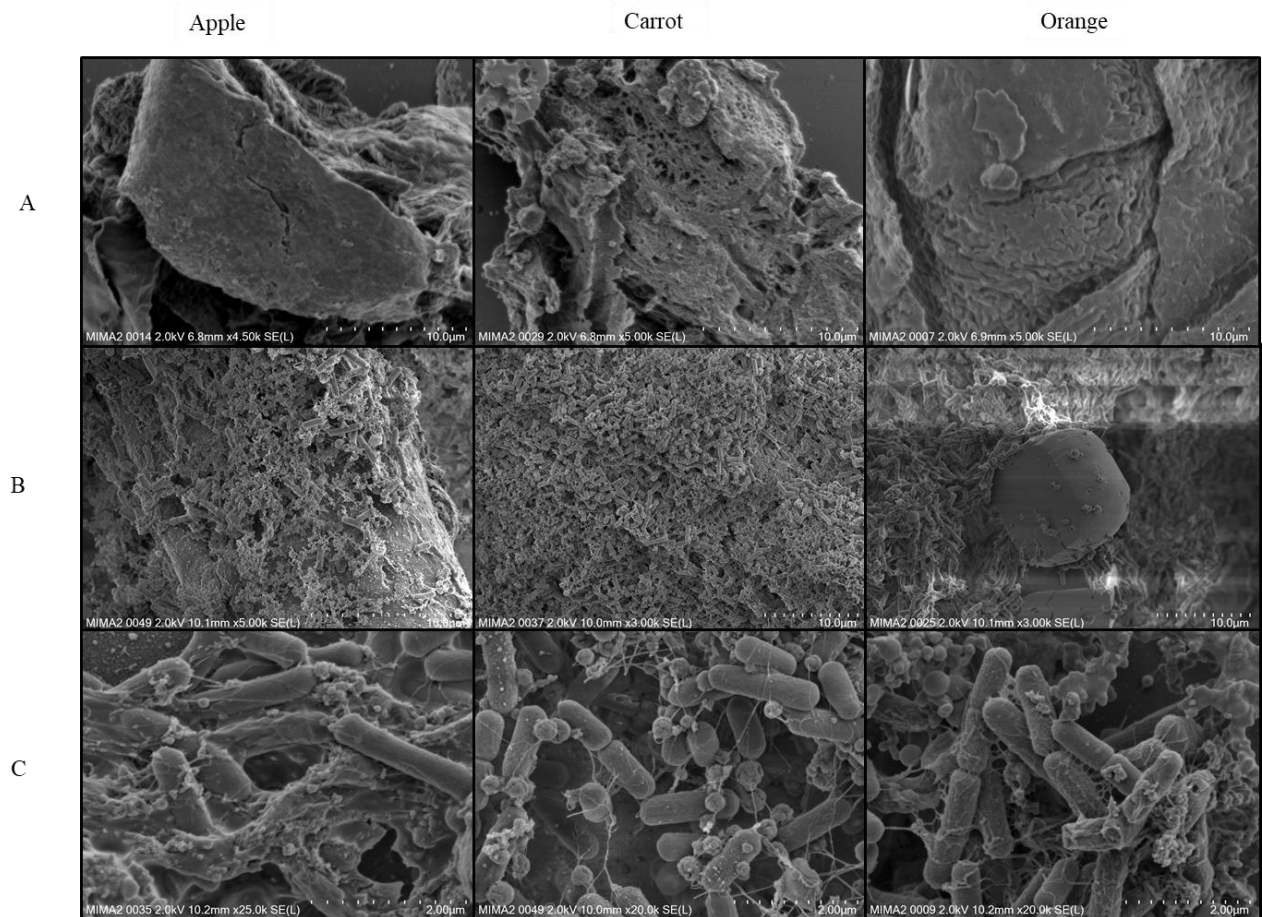


Figure 4. Scanning electron microscopy (FEG-SEM) of natural fibres without bacteria (A), and after incubation with *B. paralicheniformis* CCMM 951 for 48h at 37 °C (B and C). Photos @INRAE - Thierry Meylheuc, ISC MIMA2, MICALIS, INRAE Jouy-en-Josas, France.

B. paralicheniformis* produced xylanase, xyloglucanase, and lichenase activities on natural fibres, unlike *B. licheniformis

The nine hemicellulolytic *Bacillus* strains were investigated for various GH activities using cultures in BSS medium supplemented with carrot, orange, and apple peels. All nine strains grew well in the presence of the natural fibres. Significant and reproducible enzymatic activities were detected in extracellular proteins using agar-well plates. Interestingly, all strains produced xyloglucanase activities (moderate activity for B940) (Fig. 5), whereas only the five strains of *B. paralicheniformis* (CCMM B774, CCMM B940, CCMM B951, CCMM B966, CCMM B969) displayed xylanases and lichenases.

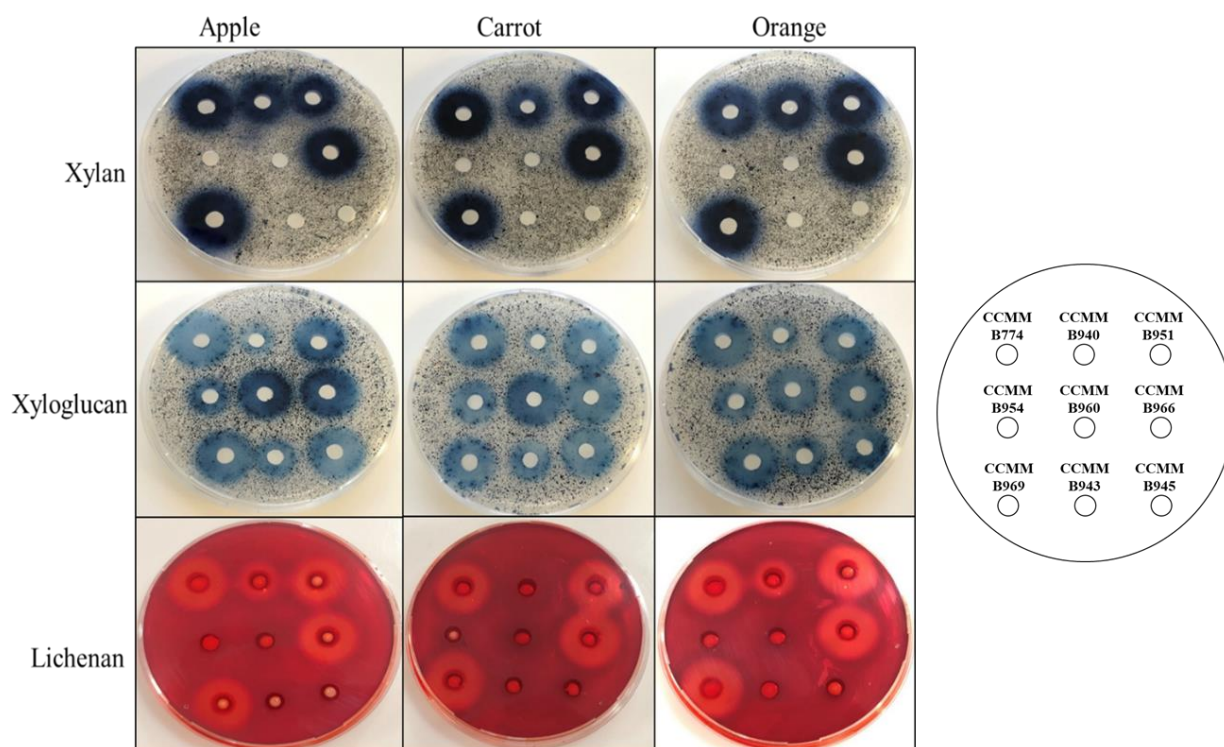


Figure 5. Detection of xylanase, xyloglucanase and lichenase activities of *Bacillus* CCMM strains, using agar-well plate assays with concentrated extracellular proteins from cultures in BSS medium and 0.5% natural substrates. Agar plate BSS medium was supplemented with 0.1% (w/v) lichenan, xylan or xyloglucan; Plates were incubated overnight at 37 °C. Clear and blue halos around the wells indicate a positive sample for the corresponding glycoside hydrolase activity.

The *B. paralicheniformis* strains were then able to degrade efficiently all three complex polysaccharides from natural substrates. No significant differences were visible for polysaccharide degradation between cultures, except for the absence of lichenase activity in B940 when grown on the carrot.

Lichenase and xylanase activities of the four most active strains (*B. paralicheniformis* CCMM B774, CCMM B951, CCMM B966, and CCMM B969) for all three polysaccharides, were then quantified (Fig. 6). GH activities were strain-dependent and varied according to the carbohydrate sources present in the culture medium. Lichenase and xylanase activities were maximal for strains cultivated on apple peels. *B. paralicheniformis* CCMM B969 produced the maximum lichenase activity with 26.64 ± 3.37 IU/mg of proteins and xylanase activity with 34.36 ± 2.90 IU/mg of proteins. The lichenase activity of strain CCMM B969 was 3 and 4 times lower when cultured in BSS carrot and BSS orange, respectively. Furthermore, the xylanase activity of B969 decreased 9 to 11 times on these substrates, compared to apple. *B. paralicheniformis* CCMM B966 had the highest xylanase activity in the BSS carrot (20.59 ± 1

IU/mg of proteins), which is ten times higher than in the BSS orange medium. Finally, the four *B. paralicheniformis* strains had higher activities than the strain CCMM B940 from our previous study (Maski *et al.*, 2021).

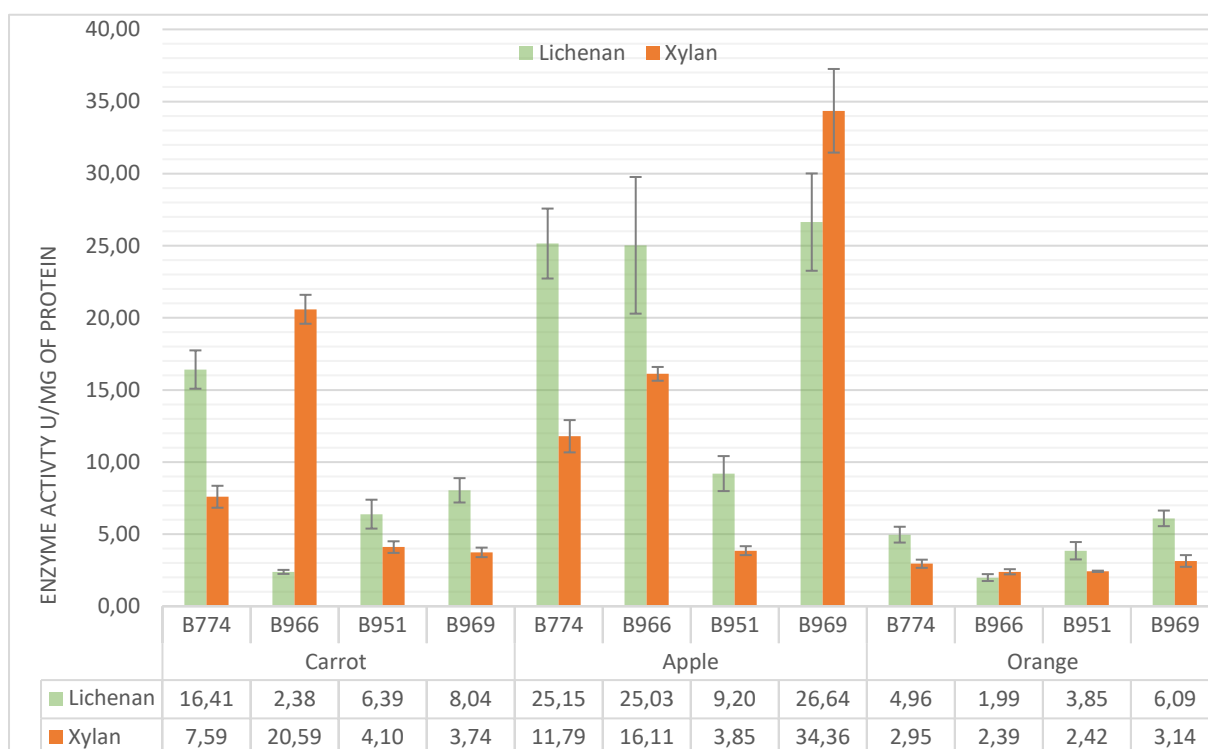


Figure 6. Enzymatic activity of extracellular proteins of *B. paralicheniformis* CCMM strains grown in BSS medium supplemented with carrot, apple and orange peels.

The carbohydrate fermentation patterns of these four hemicellulolytic strains showed that *B. paralicheniformis* used a wide variety of simple sugars, including D-glucose, D-fructose, D-lactose, sucrose, D-maltose, D-cellobiose, D-ribose, D-xylose, trehalose, L-arabinose, mannose, as well as sugar alcohols, glycosides, starch, and glycerol (Table S2), suggesting versatile metabolic abilities.

***B. paralicheniformis* encodes multiple GH genes for efficient plant polysaccharide degradation**

We compared the genomes of *B. paralicheniformis* CCMM B774, CCMM B940, CCMM B951, and CCMM B969 to that of *B. licheniformis* CCMM B943 for CAZyme annotation. The genome sequences of the four *B. paralicheniformis* encoded 125 CAZymes, including 1 Auxiliary Activity (AA), 68 GHs belonging to 33 GH families, 13 Carbohydrate Esterases (CEs), 7 Polysaccharide Lyases (PLs), and 36 Glycoside Transferases (GTs). In comparison, only 59 GHs were encoded by the *B. licheniformis* strain CCMM B943 (Fig. 7).

The GH families include genes encoding enzymes potentially involved in the degradation of various complex carbohydrates found in DFs in humans. Cellulases such as GH5_2, GH5_4, GH9, GH12, and GH48 were observed indeed in all strains (Fig. 7). Genes involved in hemicellulose breakdown and belonging to families GH5_7, GH18, GH23, GH25, GH26, GH32, GH68, and GH73 were abundant in all genomes, whereas other hemicellulolytic genes from families GH8, GH11, GH30_8, GH16 dedicated to the degradation of xylans and lichenan were only found in *B. paralicheniformis*, Genes belonging to families GH1, GH3, GH4, GH31, and GH42 observed in all sequenced strains, could be involved in the metabolism of simple sugars.

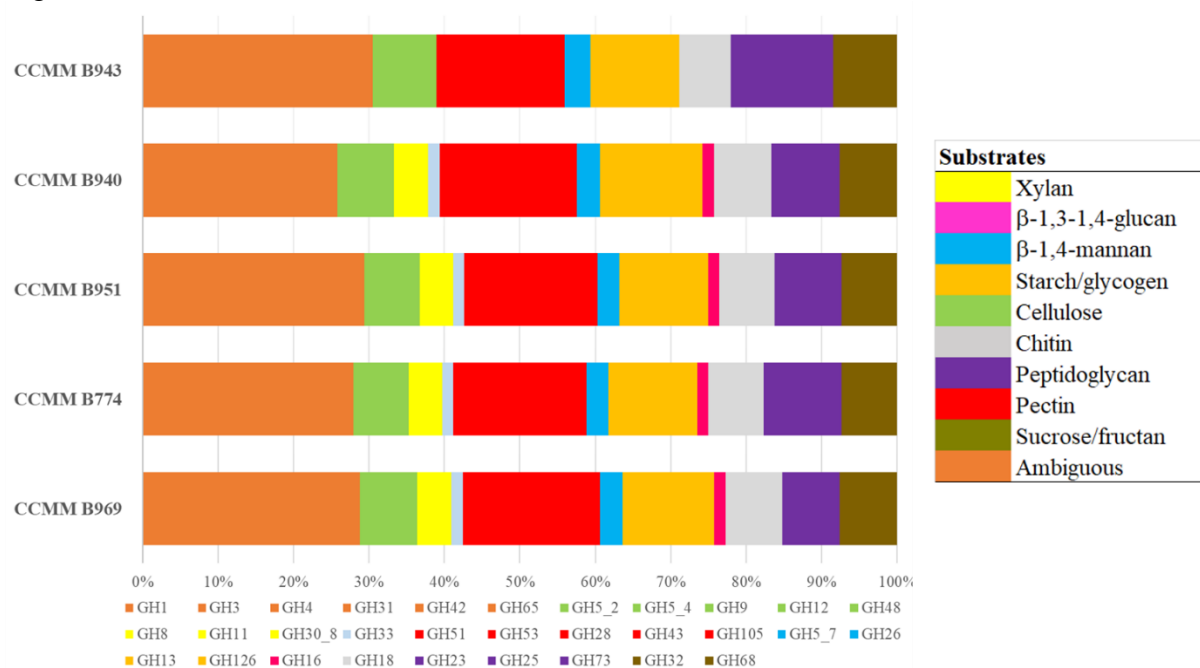


Figure 7. Genes encoding glycoside hydrolases (GH) of different families in the genomes of 5 CCMM strains of *B. (para)licheniformis*.

***B. paralicheniformis* secretome is mediated by the nature of plant carbohydrate sources**

The secretomes of *B. paralicheniformis* CCMM B969 grown on different carbon sources, namely apple, carrot, and orange, were analyzed by LC–MS/MS (Fig. 8). We identified 84 extracellular proteins as significantly abundant, and the secretome profile was substrate-dependent (Fig. 8A and 8B).

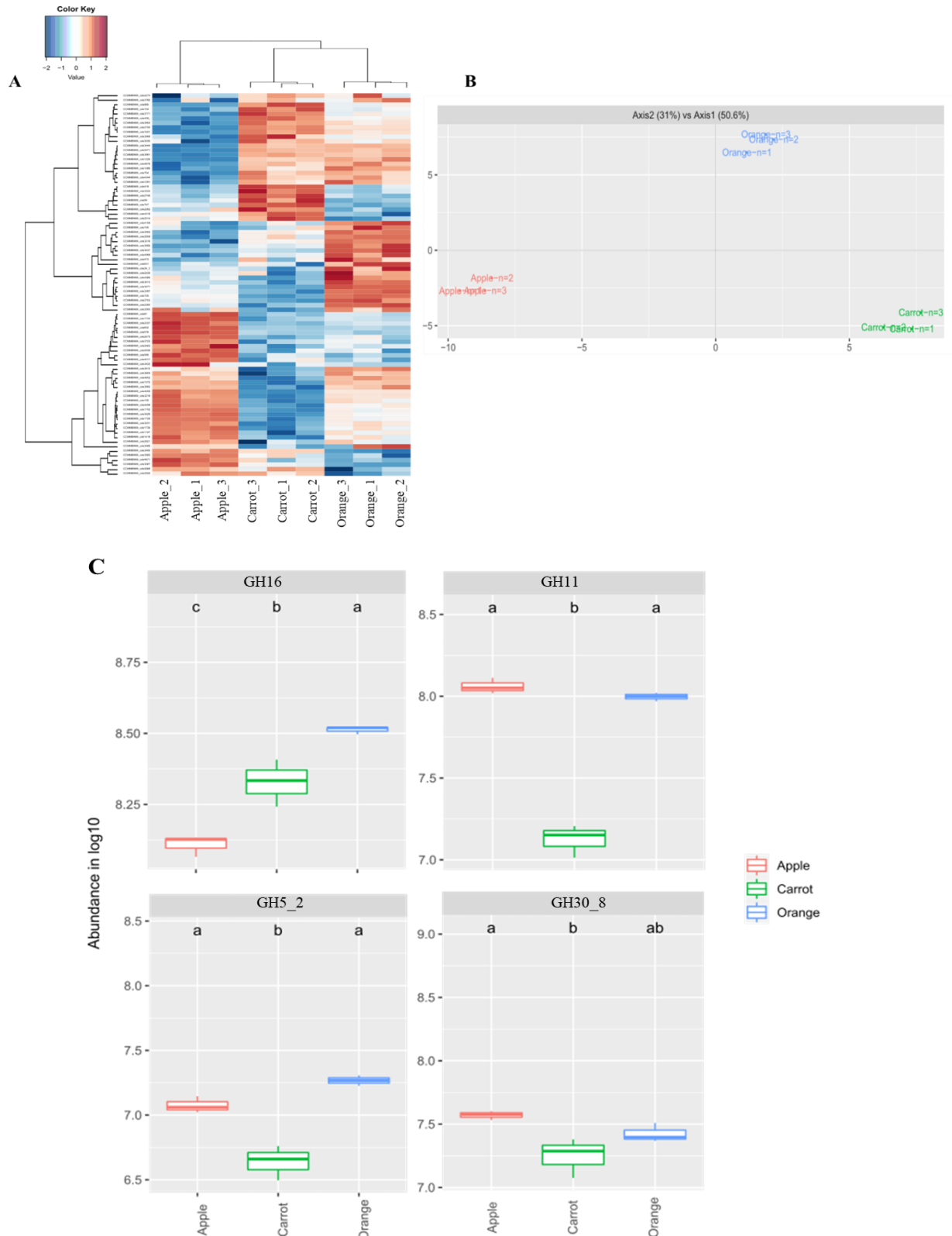


Figure 8. Heat map comparison (A), Principal Component Analysis (B) of expression patterns and abundance of selected CAZymes (C) detected in the secretomes of *B. paralicheniformis* CCMM969 during growth on different carbon sources. Groups with different letters exhibit significantly different growth rates at a 95% confidence interval according to a Kruskal–Wallis rank sum test, followed by a Dunn posthoc pairwise comparison test.

Nineteen CAZymes were produced in all conditions including 14 GHs, 3 PLs, 1 AA, and a

carbohydrate-binding module. GH11 and GH30_8 that degrade xylans were more abundant in the culture supplemented with apple (Fig. 8C), which is coherent with the highest xylanase-specific activity we noticed with this substrate. GH5_2 and GH16, rather involved in lichenan degradation, were more abundant with orange. All four enzymes have a signal peptide for secretion. Natural fibres induced the secretion of these different CAZymes according to their GH families and substrate specificity for the degradation of complex polysaccharides such as xylans and lichenan.

Discussion

In this study, 40 thermophilic bacterial strains of the genus *Bacillus*, previously identified as *B. aerius*, were screened for their ability to degrade DFs. Among them, nine strains were able to grow on selected purified fibres representative of complex plant polysaccharides.

We thus performed molecular analyses for the re-identification of these strains as *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis*, as was previously done for *B. paralicheniformis* CCMM B940 (Maski *et al.*, 2021). We compared common and easy-to-use methods with more expensive and time-consuming analyses to determine a reliable, fast and cheap method for identifying strains belonging to these two closely related *Bacillus* species. Our phylogenetic analyses confirmed that the 16S rRNA genes were not discriminating enough, for both *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis* strains (Jeong *et al.*, 2018). Compared to MLST and genomic sequences, our results confirmed that the partial sequence of the *gyrB* housekeeping gene could be a useful and easy tool to separate these species. The *gyrB* gene sequences have been used in phylogenetic studies of the *Bacillus anthracis–cereus–thuringiensis* group (La Duc *et al.*, 2004). Results from these studies indicated that *gyrB* is a suitable phylogenetic marker for species-level taxonomic relationships (Wei *et al.*, 2018). If some are not confident enough with a single gene analysis, MLST using six housekeeping genes based on the MLST schemes developed by Madslie et al (2012) used in this study, could strongly discriminate *B. paralicheniformis* from *B. licheniformis*. Our results corroborate and complement previous studies showing that the two lineages, *B. paralicheniformis* and *B. licheniformis*, are genotypically distinct (De Clerck and De Vos, 2004; Madslie *et al.*, 2012; Dunlap *et al.*, 2015). The remaining *Bacillus* strains of the CCMM, including unidentified *Bacillus* sp. isolates, can be re-identified according to these validated methods.

The main objective of this work was to find a *Bacillus* isolate with fibrolytic properties close to those of commensal gut bacteria, i.e., capable of degrading various sources of complex fibres entering the colon for food digestion. Nine hemicellulolytic strains were identified based on a

preliminary screening with purified fibres (lichenan and xylan), of which four belonged to *B. licheniformis* and five to *B. paralicheniformis*. Then, using natural fibres from the apple, carrot, and orange in the chemically defined BSS medium, we showed that all nine strains were able to grow on these natural substrates. Growth might be fueled by simple sugars easily available in fruit and vegetable peels. Orange peels are thought to contain 16.9% soluble sugars versus 9.2% cellulose, 10.5% hemicelluloses, and 42.5% pectin (Rivas *et al.*, 2008). Apple peels typically contain less than 13% soluble sugars (Filip *et al.*, 2016) versus 7.2-43.6% cellulose, 4.3-24.4% hemicelluloses, 15.2-23.5% lignin, 3.5-14.3% pectin (Dhillon, Kaur and Brar, 2013). Carrot peels contain less than 6% soluble sugars (Conversa *et al.*, 2022) versus 81% cellulose, 9% hemicelluloses, 2.5% lignin, and 7.5% pectin (Siqueira *et al.*, 2016). However, since they also grew on purified xylans and lichenan, we explored the enzymatic systems of these strains and how they allowed the bacteria to degrade complex polysaccharides from natural plant fibres through the production of specific enzymes, and use the released sugars for growth.

Some studies have already reported the presence of cellulases and hemicellulases in various strains of *B. licheniformis* (van Dyk *et al.*, 2010; Kazeem *et al.*, 2017). However, no information was available concerning *B. paralicheniformis*, except for the strain CCMM B940 of our previous study (Maski *et al.*, 2021). We evidenced here varied and strong strain-specific activities on plant cell wall polysaccharides using complementary biochemical experiments such as agar well plates supplemented with xylans, xyloglucan, and lichenan, quantification of released reducing sugars, and analysis of secretomes of *B. paralicheniformis* grown on natural substrates. Five strains of *B. paralicheniformis* produced extracellular xylanases, lichenases, and xyloglucanases when cultured in the BSS medium supplemented with natural fibres (carrot, orange, or apple peels), with production regulated by the available sugars in the medium. Apple induced the highest activities. All strains had higher specific activities than our reference strain CCMM B940 (Maski *et al.*, 2021), suggesting that *B. paralicheniformis* species bears a significant function in fibre degradation. This finding was confirmed by the genomic features of these strains, which revealed a complete set of GH genes dedicated to the degradation of various polysaccharides from DFs, such as xylans, mixed-linkage polysaccharides, pectin, mannans, fructans, starch, and even cellulose that no commensal human gut bacteria are so far able to degrade. According to the CAZy database classification (Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Pedro M Coutinho, *et al.*, 2014), nearly 68 GH genes and 7 PL genes dedicated to plant cell wall carbohydrate degradation, representing 33 GH families and 5 different PL families, respectively, were detected in *B. paralicheniformis*. The presence of different genes encoding

CAZymes was previously predicted from the genome sequence of *B. paralicheniformis* MDJK30, isolated from soil (Wang *et al.*, 2017), but with 2 times fewer GH genes and no experimental validation. To date, 14 sequences of *B. paralicheniformis* genomes annotated for CAZymes genes are listed in the CAZy database, all from unpublished works (www.cazy.org, updated 2022/10/18).

Our studies using CCMM strains combined *in silico* genomics and *in vitro* experiments to demonstrate the efficiency of *B. paralicheniformis* in degrading complex DFs. Genomics can provide information on the functional potential of microorganisms, but it does not imply that the predicted phenotype is expressed. Here, we confirmed the presence of CAZymes in the secretome of *B. paralicheniformis* CCMM B969, the most active strain, by mass spectrophotometry. The expression of different GHs in the secretome, particularly xylanases, lichenases, and cellulases involved in DF degradation, supports the synergistic activity of various glycosidases required for the breakdown of complex DFs to fermentable monosaccharides (Cui *et al.*, 2019). Interestingly, the enzyme abundance was regulated by carbon sources, as often observed for glycoside hydrolases from bacteria (Mirande *et al.*, 2010; Flint *et al.*, 2012; Despres *et al.*, 2016). This is the first time the fibrolytic function of *B. paralicheniformis* has been evidenced at both the genomic and secretomic levels, with enzyme production regulated according to the fibre present in the culture medium. This is also the first time EPS has been observed for *B. paralicheniformis* using SEM, supported by genomic analysis. Previous works have evidenced EPS in *Bacillus* species, including its closest phylogenetic relative, *B. licheniformis* (Vinothkanna *et al.*, 2021). EPS from probiotic bacteria are Generally Regarded As Safe (GRAS). Depending of their chemical structure (sugar composition, glycosidic linkages), they may confer beneficial properties such antimicrobial, anti-tumor, anti-inflammatory, anti-diabetic, cholesterol lowering and immunomodulatory activities. Microbial EPS are, thus, of increasing interest for health-promoting effects as they could be natural substitutes for synthetic drugs in therapeutic applications (Kook *et al.*, 2019; Angelin and Kavitha, 2020). It is therefore particularly interesting to find EPS in *B. paralicheniformis* probiotic candidates.

Using different fruits and vegetables as unique carbon sources, we showed that 4 strains of *B. paralicheniformis*, especially the strain CCMM B969, can produce different GHs specialized in complex DFs breakdown. These fruits and vegetables are essential foods in the daily diet and are rich in DFs (Sharoba, Farrag and Abd El-Salam, 2013; Cui *et al.*, 2019). It is well established now that DFs provide substrates to gut microbiota for the production of different

metabolites that could significantly impact the host's health. Species belonging to Firmicutes and Actinobacteria are the main responders to DFs, although they contain relatively few fibre-metabolizing enzymes per organism (Deehan *et al.*, 2017; Makki *et al.*, 2018). However, they generally have more specialized roles, such as initiating complex substrate degradation (Makki *et al.*, 2018). These species are considered “specialists” in contrast with “generalists” such as *Bacteroides* species that encode between 100 to over 300 CAZymes (Ye *et al.*, 2022). Primary degraders play a crucial role in the cross-feeding network, and they are the first bacteria to colonize and initiate the degradation of complex carbohydrates (Payling *et al.*, 2020). The present strain CCMM B969 contains more GHs and PLs than the mean (75 compared to 39.6) per genome in the Firmicutes phylum (Kaoutari *et al.*, 2013). Likewise, it contains more CAZymes than the *Butyrivibrio fibrisolvens* 16/4 and *Ruminococcus champanellensis* 18P13 (125 compared to 115, and 87, respectively) isolated from the human intestine (Flint *et al.*, 2012). The CCMM B969 strain could be considered a "specialist" as it secretes specific GHs such as GH11, GH16, and GH30 which can be effective in initiating the deconstruction of complex DFs.

Considering the results described here and the potential ability of *B. paralicheniformis* to degrade DFs, we propose strain CCMM B969 as a fibre-degrading probiotic candidate. We hypothesize that in the context of metabolic syndrome, characterized by the depletion of fibre-degrading bacteria in the gut microbiota, the present fibre-degrading probiotic candidate could initiate the degradation of complex DFs and release oligosaccharides to secondary degraders that will produce beneficial SCFAs for host health. Finally, the safety of *B. paralicheniformis* CCMM B969 is under investigation, as recommended by the European Food Safety Authority, EFSA, which recently declared *B. paralicheniformis* as Qualified Presumption of Safety (QPS) species in the absence of toxigenic activity (Koutsoumanis *et al.*, 2021).

Methods

Bacterial strains, fibres, and culture conditions

Bacillus strains, previously identified as *B. aerius* from Moroccan extremophilic ecosystems (desert, hot springs, salt marshes), were obtained from the CCMM (www.ccmm.ma) (Aanniz *et al.*, 2015). Strains are listed in Table S1. Forty (40) strains cryopreserved at -80 °C were aerobically cultivated twice on Luria-Bertani (LB) agar medium (BD Difco, Sparks, Maryland, USA) for 18h at 37 °C. Individual colonies were then picked and grown at 37 °C in BSS agar or broth supplemented with purified or natural fibres (0.5%) as the sole carbon source, as described in Maski *et al.* (2021). The BSS medium (w/v) from Parab *et al.* (2017) was modified

as follows: NaCl, 6.0g; MgSO₄, 7.0g; NH₄Cl, 1.0g; K₂HPO₄ (10%), 35 mL; KH₂PO₄ (10%), 10 mL; trace metal solution mix A5 with Co (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) 1.0 mL.

Natural fibre sources and Polysaccharides

For pure bacterial cultures, Icelandic moss lichenan, Tamarind xyloglucan, and beechwood xylan (Megazyme, Wicklow, Ireland) were chosen as representative polysaccharides of hemicelluloses, the main constituents of plant cell walls. Natural fibres were prepared from certified organic fruits and vegetables. Briefly, the orange, apple, and carrot were peeled and dried for at least 24h at 60 °C and crumbled finely using an electric grinder. The dried peels were crushed and then sieved to obtain a homogeneous powder.

The chromogenic AZCL-Xyloglucan (Tamarind) and AZCL-Xylan (Beechwood) polysaccharides from Megazyme (Wicklow, Ireland) were used for enzyme assays.

Functional screening of the *Bacillus sp.* CCMM strains

Functional screening for xylanase and lichenase activities was performed as follows: after growth in LB broth, bacteria were striated on the surface of Petri dishes containing two layers of medium: a first one of 20 mL BSS agar medium without any antibiotics and a second one, spread out in overlay, of 15 mL BSS agar medium supplemented with 0.5% (wt/v) of purified polysaccharide.

Cells grew into colonies at 37 °C for 2 days, and then colonies were softly removed from the agar surface. The plates were then flooded with 10 mL of 0.1% Congo red (Sigma Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 30 min. and washed off three times with 10 mL of 1M NaCl for 15 min. Clear zones appeared around polysaccharidolytic colonies.

Protein samples and enzyme assays

To prepare protein samples, each strain was cultivated twice at 37 °C for 48h in BSS medium supplemented with natural fibres of apple, carrot, or orange as described above. The cultures (30 mL) were then centrifuged at 5,000g for 15 min at 4 °C. The supernatants were filtered through a 0,22 µm Millipore filter and concentrated 25-fold with a Corning Spin-X UF 10K MWCO concentrator at 4 °C following the manufacturer's protocol (Corning B.V., Amsterdam, The Netherlands). Samples were stored at -20 °C before use.

Agar-well plate enzymatic assays were performed to detect xylanase, lichenase, and xyloglucanase activities of 25-fold concentrated extracellular proteins. Samples were loaded (60 µL/well) in Petri dishes containing 35 mL of BSS medium supplemented with 0.1% chromogenic AZCL-Xyloglucan, AZCL-Xylan, or 0.1% non-chromogenic lichenan (all from Megazyme, Wicklow, Ireland). The plates were incubated overnight at 37 °C, and those with

non-chromogenic polysaccharides were stained with Congo red as described for the functional screening. Clear or blue halos revealed substrate degradation around wells containing polysaccharidolytic enzymes.

Protein concentration was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), with bovine serum albumin as the standard. Extracellular hemicellulolytic activities of the strains were quantified using the dinitrosalicylic acid (DNS) colorimetric method to determine reducing sugars as described by Miller (Miller, 1959). The number of enzymes and the incubation time were chosen to provide assay conditions in which the measured activity was proportional to these two parameters. Reducing sugars released after enzyme-substrate incubations were quantified in triplicate using glucose or xylose as standard. One international unit (IU) was defined as the amount of enzyme which produced 1 μ mol of reducing sugars in 1 min.

The API50CHB system (BioMérieux, Craponne, France), including strips for 49 miniature enzyme assays and inoculation medium, was used to determine the carbohydrate fermentation pattern of *Bacillus* strains grown on LB agar plates at 37 °C for 24h. Selected colonies of the pure culture were suspended in API50CHB medium according to the manufacturer's recommendations, and the resulting suspension was used for inoculation of the carbohydrate-containing wells. The strips were incubated at 37 °C for 48h according to the manufacturer's instructions. The experiment was performed twice per strain.

Scanning electron microscopy

The strain *B. paralicheniformis* CCMM B951 was cultured for 48h at 37 °C in BSS with various natural fibres as described above. Samples immersed in a fixative solution (2.5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4) were deposited on sterile cover-glasses discs (Marienfeld, VWR, France) and stored for 1 h at room temperature and overnight at 4°C. The fixative was removed, and samples were rinsed three times for 10 min in the sodium cacodylate solution (pH 7.4). The samples underwent progressive dehydration by soaking in a graded series of ethanol (50 to 100%) before critical-point drying under CO₂. Samples were mounted on aluminum stubs (15 mm diameter) with carbon adhesive discs (Agar Scientific, Oxford Instruments SAS, Gometz-la-Ville, France) and sputter coated with platinum (Polaron SC7640, Milexia, Verrières-le-Buisson, France) for 220 s at 10 mA. Samples were visualized by field emission gun scanning electron microscopy (SEM FEG). They were viewed as secondary electron images (2 kV) with a Hitachi SU5000 instrument (Milexia, Verrières-le-Buisson, France). Samples preparation and scanning Electron Microscopy analyses were performed at the Microscopy and Imaging Platform MIMA2 (MIMA2, INRAE, 2018. Microscopy and

Preparation and analysis of *B. paralicheniformis* CCMM B969 secretome

The secretome was prepared from the 25-fold concentrated extracellular proteins of *B. paralicheniformis* CCMM B969 cultures, as described in protein samples and enzyme assays section. The concentrated secretome was purified after short migration on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After the excision of gel bands, proteins were identified at PAPPSO platform facilities (<http://pappso.inra.fr/>). Briefly, gel bands were washed with 10 mM dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) and 55 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich). In-gel tryptic digestion was performed overnight with 200 ng of trypsin (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) in 50 mM bicarbonate (Sigma-Aldrich) buffer at 37 °C. Peptides were extracted with 0.5 % trifluoroacetic acid (TFA) in 50 % acetonitrile (ACN), dried and re-suspended in 60 µL of 0.1 % TFA in 2 % ACN for analysis in high-resolution mass spectrometry.

Four µL of each sample were injected into an Ultimate 3000 RSLC system (Thermo Fisher Scientific) coupled to an Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ (Thermo Fisher Scientific) by nanoelectrospray ion source. Protein digest was injected and preconcentrated on a precolumn (Acclaim PepMap C18 particle 5 µm size, 5 mm length, 300 µm i.d., Thermo Fisher Scientific) at 20 µL/min with 0.08 % TFA in 2 % ACN in 2 min, followed by a separation on reverse phase separating column (Acclaim PepMap RSLC nanoViper, C18 particle 3 µm size, 500 mm length, 75 µm i.d., Thermo Fisher Scientific). Buffers were 0.1 % formic acid in 98 % water (solvent A) and 0.1 % formic acid in 80 % ACN (solvent B). The peptides were eluted with a multi-step gradient from 1 to 45 % of solvent B for 55 min at 300 nL/min for a total run of 65 min. MS data acquisition included a full MS scan covering 300 to 1600 mass-to-charge ratio (m/z) with a resolution of 120000. HCD fragmentation (MS/MS) step was performed with a normalised collision energy of 30 and a resolution of 30000.

All MS/MS spectra were searched against *Bacillus (para)licheniformis* database using X!TandemPipeline version 0.4.19 (Langella *et al.*, 2017), the open search engine developed by PAPPSO (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>). Precursor and fragment mass tolerance was 10 ppm. Data filtering was achieved according to a peptide E-value < 0.01, protein E-value < 10e-4 and to a minimum of two identified peptides per protein. Contaminant peptides were discarded following identification using a standard proteomics contaminant database. MassChroQ software (v. 2.2.27) was employed to perform alignment and ion

chromatograms extraction (XIC) defined as the sum of the MS1 intensities of all peptides associated with a protein for quantification (Valot *et al.*, 2011).

Relative quantification of the proteins was calculated using R scripts by analyzing peptide intensities obtained from XIC. Firstly, reliable peptides were selected according to the criteria described in Belouah *et al.* (2019), i.e., shared peptides, uncorrelated peptides, peptides showing retention time instability, and peptides showing missing data were filtered out. Protein relative abundances were computed as the sum of the peptide intensities. Proteins showing a p value corrected for multiple comparisons < 0.05 were considered as showing a significant variation.

DNA isolation, PCR amplification, and sequencing of 16S rRNA and *gyrB* genes

Genomic DNA was isolated from *Bacillus* cells harvested as described above, using Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the supplier's protocol. PCR amplification of the complete 16S rRNA gene (approx. 1,500 bp) was performed using the FD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and RP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') universal primers (Weisburg *et al.*, 1991). PCRs were carried out with genomic DNA (150 ng) and 1X Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) following the supplier's instruction with the annealing temperature of 55 °C (25 cycles).

The amplified 16S rRNA encoding genes were sequenced full length in both directions using Sanger-technology (Eurofins Genomics, Cologne, Germany).

The taxonomic assignment of complete 16S rRNA encoding gene sequences was based on nucleic sequence similarity using the microbial nucleotide Basic Local Alignment and Search Tool (Blast) at NCBI facilities with either representative genomes, complete genomes, or the non-redundant nucleotide database nt (identity percentage $> 97\%$). The MEGA X software was used for phylogenetic analysis and tree construction using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987; Kumar *et al.*, 2018).

The partial sequence of the gene encoding the subunit B protein of DNA gyrase (*gyrB*) was included in the phylogenetic analysis for comparative purposes. The *gyrB* fragments of approximately 400 bp were amplified from *Bacillus* genomic DNA using specific PCR primers (Madslien *et al.*, 2012), and sequenced at Eurofins (Cologne, Germany).

MLST analysis

Intragenic regions of six housekeeping genes of the *Bacillus* genus (*adk*, *ccpA*, *recF*, *rpoB*, *spo0A*, *sucC*) were selected for MLST analysis (Madslien *et al.*, 2012). All primers were synthesized by Eurofins (Constance, Germany). PCR amplifications were performed using Phusion Green Hot Start II high fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Illkirch,

France) as described previously. Purified PCR products were sequenced by Eurofins (Cologne, Germany). The sequences were aligned and concatenated with MEGA X software. The PubMLST database was used to construct the MLST phylogenetic tree (Letunic and Bork, 2019) using the *B. licheniformis* database.

Genomic analyses

Genomic DNAs were sequenced at Eurofins Genomics (Constance, Germany) using Illumina HiSeq technology for whole genome sequencing. The libraries were prepared with 2 × 150-bp paired-end read length, including DNA fragmentation, adapter ligation, amplification, and size selection. All the steps were performed according to Eurofins Genomics protocols, producing between 5 to 7 million reads depending on the strain. Trimming, assembly, and quality assessment of the genome sequences were done as described previously (Maski *et al.*, 2021). The genomes were then annotated using the default parameters of Prokka 1.14 (Seemann, 2014).

Assignment of ORFs to CAZy families was done as for the daily updates of the CAZy database (Lombard, Golaconda Ramulu, Drula, Pedro M. Coutinho, *et al.*, 2014). Functional annotations were performed according to Blastp hits against sequences of biochemically characterized enzymes listed in the CAZy database (Drula *et al.*, 2022). Function assignments were made using the function of the best hit with at least 50% identity and >95% coverage.

Data availability: The assembled genomes generated during this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB58735 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB58735>). The associated BioSamples are SAMEA112306458, SAMEA112306457, SAMEA112306425, and SAMEA112306424 for *B. paralicheniformis* CCMM B943, CCMM B774, CCMM B969, and CCMM B951, respectively. For the strain CCMM B940, see Project PRJNA680612 by Maski *et al.* (Maski *et al.*, 2021).

References

Aanniz, T. et al. (2015) 'Thermophilic bacteria in moroccan hot springs, salt marshes and desert soils', *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), pp. 443–453. doi: 10.1590/S1517-838246220140219.

Agus, A., Clément, K. and Sokol, H. (2021) 'Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders', *Gut*. BMJ Publishing Group, pp. 1174–1182. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323071.

Angelin, J. and Kavitha, M. (2020) 'Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential', *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, pp. 853–865. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.190.

Belouah, I. et al. (2019) 'Peptide filtering differently affects the performances of XIC-based quantification methods', *Journal of Proteomics*, 193, pp. 131–141. doi: 10.1016/j.jprot.2018.10.003.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Bridier, A., Meylheuc, T. and Briandet, R. (2013) 'Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM)', *Micron*, 48, pp. 65–69. doi: 10.1016/j.micron.2013.02.013.

De Clerck, E. and De Vos, P. (2004) 'Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources', *FEMS Microbiology Letters*, 231(1), pp. 91–98. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00935-2.

Conversa, G. et al. (2022) 'Peeling affects the nutritional properties of carrot genotypes', *Foods*, 11(1), p. 45. doi: 10.3390/FOODS11010045/S1.

Cui, J. et al. (2019) 'Dietary Fibers from Fruits and Vegetables and Their Health Benefits via Modulation of Gut Microbiota', *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1514–1532. doi: 10.1111/1541-4337.12489.

Deehan, E. C. et al. (2017) 'Modulation of the Gastrointestinal Microbiome with Nondigestible Fermentable Carbohydrates To Improve Human Health', *Microbiology Spectrum*, 5(5). doi: 10.1128/microbiolspec.bad-0019-2017.

Despres, J. et al. (2016) 'Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level', *BMC Genomics*, 17(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12864-016-2680-8.

Dhillon, G. S., Kaur, S. and Brar, S. K. (2013) 'Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, pp. 789–805. doi: 10.1016/j.rser.2013.06.046.

Drula, E. et al. (2022) 'The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature', *Nucleic Acids Research*, 50(D1), pp. D571–D577. doi: 10.1093/NAR/GKAB1045.

La Duc, M. T. et al. (2004) 'gyrB as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group', *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), pp. 383–394. doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.004.

Dunlap, C. A. et al. (2015) '*Bacillus paralicheniformis* sp. Nov., isolated from fermented soybean paste', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10), pp. 3487–3492. doi: 10.1099/ijsem.0.000441.

van Dyk, J. S. et al. (2010) 'Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1', *Enzyme and Microbial Technology*, 47(3), pp. 112–118. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.05.004.

Filip, M. et al. (2016) 'Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method', *Food Chemistry*, 199, pp. 653–659. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.060.

Flint, H. J. et al. (2012) 'Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut', *Gut Microbes*. Taylor & Francis, pp. 289–306. doi: 10.4161/gmic.19897.

van de Guchte, M., Blottière, H. M. and Doré, J. (2018) 'Humans as holobionts: implications for prevention and therapy', *Microbiome*. NLM (Medline), p. 81. doi: 10.1186/s40168-018-0466-8.

Hill, C. et al. (2014) ‘The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic’, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), pp. 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

Jeong, D. W. et al. (2018) ‘Urease characteristics and phylogenetic status of *Bacillus paralicheniformis*’, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12), pp. 1992–1998. doi: 10.4014/jmb.1809.09030.

Kaoutari, A. El et al. (2013) ‘The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota’, *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), pp. 497–504. doi: 10.1038/nrmicro3050.

Kazeem, M. O. et al. (2017) ‘Prospecting Agro-waste Cocktail: Supplementation for Cellulase Production by a Newly Isolated Thermophilic *B. licheniformis* 2D55.’, *Applied biochemistry and biotechnology*, 182(4), pp. 1318–1340. doi: 10.1007/s12010-017-2401-z.

Kook, S. Y. et al. (2019) ‘Immunomodulatory effects of exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Korean kimchi’, *Journal of Functional Foods*, 54, pp. 211–219. doi: 10.1016/j.jff.2019.01.003.

Koutsoumanis, K. et al. (2021) ‘Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 14: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2021’, *EFSA Journal*, 19(7), p. e06689. doi: 10.2903/J.EFSA.2021.6689.

Kumar, S. et al. (2018) ‘MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms’, *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

Kumari, M. et al. (2021) ‘Fostering next-generation probiotics in human gut by targeted dietary modulation: An emerging perspective’, *Food Research International*. Elsevier, p. 110716. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110716.

Langella, O. et al. (2017) ‘X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification’, *Journal of Proteome Research*, 16(2), pp. 494–503. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00632.

Letunic, I. and Bork, P. (2019) 'Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments', *Nucleic Acids Research*, 47(W1). doi: 10.1093/nar/gkz239.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, Pedro M., et al. (2014) 'The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013.', *Nucleic acids research*, 42(Database issue), pp. D490-5. doi: 10.1093/nar/gkt1178.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, Pedro M., et al. (2014) 'The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013', *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. D490–D495. doi: 10.1093/nar/gkt1178.

Madslien, E. H. et al. (2012) 'Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme', *BMC Microbiology*, 12(1), p. 230. doi: 10.1186/1471-2180-12-230.

Makki, K. et al. (2018) 'The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease', *Cell Host and Microbe*. Cell Press, pp. 705–715. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.012.

Martin-Gallausiaux, C. et al. (2021) 'Scfa: Mechanisms and functional importance in the gut', *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), pp. 37–49. doi: 10.1017/S0029665120006916.

Maski, S. et al. (2021) 'Hemicellulosic biomass conversion by Moroccan hot spring *Bacillus paralicheniformis* CCMM B940 evidenced by glycoside hydrolase activities and whole genome sequencing', *3 Biotech*, 11(8), p. 379. doi: 10.1007/s13205-021-02919-0.

Miller, G. L. (1959) 'Determination of reducing sugar by DNS method.', *Anal chem*, 31, pp. 426–428.

Mirande, C. et al. (2010) 'Characterization of Xyn10A, a highly active xylanase from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), pp. 2097–2105. doi: 10.1007/s00253-010-2694-0.

Myhrstad, M. C. W. et al. (2020) 'Dietary fiber, gut microbiota, and metabolic regulation—current status in human randomized trials', *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 859. doi: 10.3390/nu12030859.

Parab, P. et al. (2017) 'Enzymatic saccharification of seaweeds into fermentable sugars by xylanase from marine *Bacillus* sp. strain BT21', *3 Biotech*, 7(5), p. 296. doi: 10.1007/s13205-017-0921-4.

Payling, L. et al. (2020) 'The effects of carbohydrate structure on the composition and functionality of the human gut microbiota', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, pp. 233–248. doi: 10.1016/j.tifs.2020.01.009.

Polonca, S. (2020) 'Environment Shapes the Intra-species Diversity of *Bacillus subtilis* Isolates', *Microbial Ecology*, 79(4), pp. 853–864. doi: 10.1007/s00248-019-01455-y.

Rivas, B. et al. (2008) 'Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), pp. 2380–2387. doi: 10.1021/jf073388r.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.', *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp. 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Seemann, T. (2014) 'Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation', *Bioinformatics*, 30(14), pp. 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

Sharoba, A., Farrag, M. and Abd El-Salam, A. (2013) 'UTILIZATION OF SOME FRUITS AND VEGETABLES WASTES AS A SOURCE OF DIETARY FIBERS IN CAKE MAKING', *Journal of Food and Dairy Sciences*, 4(9), pp. 433–453. doi: 10.21608/jfds.2013.72084.

Siqueira, G. et al. (2016) 'Re-dispersible carrot nanofibers with high mechanical properties and reinforcing capacity for use in composite materials', *Composites Science and Technology*, 123, pp. 49–56. doi: 10.1016/j.compscitech.2015.12.001.

Valot, B. et al. (2011) 'MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification', *Proteomics*, 11(17), pp. 3572–3577. doi: 10.1002/PMIC.201100120.

Vinothkanna, A. et al. (2021) 'Structural characterization, functional and biological activities of an exopolysaccharide produced by probiotic *Bacillus licheniformis* AG-06 from Indian polyherbal fermented traditional medicine', *International Journal of Biological Macromolecules*, 174, pp. 144–152. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.117.

Wang, L. T. et al. (2007) 'Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), pp. 1846–1850. doi: 10.1099/ijs.0.64685-0.

Wang, Y. et al. (2017) ‘Complete genome sequence of bacillus paralicheniformis MDJK30, a plant growth-promoting rhizobacterium with antifungal activity’, *Genome Announcements*, 5(25), pp. 577–594. doi: 10.1128/genomeA.00577-17.

Wei, S. et al. (2018) ‘Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods (lettuce, spinach, and kimbap) using quantitative real-time PCR targeting *groEL* and *gyrB*’, *Microbial Pathogenesis*, 115, pp. 312–320. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.079.

Weisburg, W. G. et al. (1991) ‘16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study’, *Journal of Bacteriology*, 173(2), pp. 697–703. doi: n.a.

Ye, S. et al. (2022) ‘A critical review on interplay between dietary fibers and gut microbiota’, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, pp. 237–249. doi: 10.1016/j.tifs.2022.04.010.

Ze, X. et al. (2013) ‘Some are more equal than others’, *Gut Microbes*, 4(3), pp. 236–240. doi: 10.4161/GMIC.23998.

Zhao, L. et al. (2018) ‘Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes’, *Science*, 359(6380), pp. 1151–1156. doi: 10.1126/science.aao5774.

Acknowledgments: Funding for this research was provided by the National Research Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE) and the National Center for Scientific and Technical Research (CNRST). Serigne Inssa NGOM is a recipient of a grant for doctoral research allocated by the French ministry of higher education and research (doctoral school 569, University of Paris-Saclay). Soufiane MASKI is a PhD student at Faculty of Science, Mohammed V University, Rabat, Morocco.

The authors would like to thank Mrs Zehra Esra ILHAN for English improvement of the manuscript.

Author contributions: MA, EEF, and CBM conceived the study. SIN, SM, MA, EEF, and CBM designed the experiments. MA and BR provided the strains of *Bacillus* from the CCMM. SIN, and SM did enzymatic experiments and genomic analyses, respectively. LOC and CJ performed and analysed the proteomic experiment. TM performed SEM experiments. BH performed CAZymes analyses for all genomes. SIN, BR, and TC performed MLST. All authors analysed the data. SIN, CBM, and MA wrote the manuscript with the help of all authors. All authors have read and approved the final manuscript.

Additional Information: the authors declare that they have no conflict of interest in the publication.

SUPPLEMENTARY

CCMM strain number	Bacterial species (previous name¹)	Re-identified bacterial species²	Original sample site	Moroccan region	Growth temp (°C)
B770	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B773	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B774	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	desert sand	Merzouga	30-55
B776	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B780	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B792	<i>Bacillus aerius</i>	ND	salt marsh	Sidi Abed El-Jadida	30-55
B821	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B837	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B844	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B937	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Ain Allah Fez	30-55
B938	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Ain Allah Fez	30-55
B939	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Ain Allah Fez	30-55
B940	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	hot spring	Ain Allah Fez	30-55
B941	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B942	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B943	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	desert sand	Merzouga	30-55
B945	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	desert sand	Merzouga	30-55

B946	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B947	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B949	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Ain Allah Fez	30-55
B950	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Ain Allah Fez	30-55
B951	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	hot spring	Abaynou Guelmim	30-55
B952	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Abaynou Guelmim	30-55
B953	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Ain Jerry Meknes	30-55
B954	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	salt marsh	Sidi Moussa El-Jadida	30-55
B955	<i>Bacillus aerius</i>	ND	hot spring	Abaynou Guelmim	30-55
B956	<i>Bacillus aerius</i>	ND	salt marsh	Sidi Abed El-Jadida	30-55
B957	<i>Bacillus aerius</i>	ND	salt marsh	Sidi Moussa El-Jadida	30-55
B958	<i>Bacillus aerius</i>	ND	salt marsh	Sidi Moussa El-Jadida	30-55
B959	<i>Bacillus aerius</i>	ND	salt marsh	Sidi Abed El-Jadida	30-55
B960	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	salt marsh	Sidi Abed El-Jadida	30-55
B961	<i>Bacillus aerius</i>	ND	salt marsh	Sidi Moussa El-Jadida	30-55
B962	<i>Bacillus aerius</i>	ND	salt marsh	Sidi Abed El-Jadida	30-55
B963	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55

B964	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B965	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B966	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	desert sand	Merzouga	30-55
B967	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B968	<i>Bacillus aerius</i>	ND	desert sand	Merzouga	30-55
B969	<i>Bacillus aerius</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	desert sand	Merzouga	30-55

Table S1. Description of *Bacillus aerius* strains from CCMM, sample sites, growth temperature, and re-identified species name.

modified from Aanniz et al.(Aanniz *et al.*, 2015), and the CCMM website (www.ccmm.ma)

¹ according to Aanniz et al.(Aanniz *et al.*, 2015)

² this study (except for B940, from Maski et al.(Maski *et al.*, 2021))

ND: Not determined

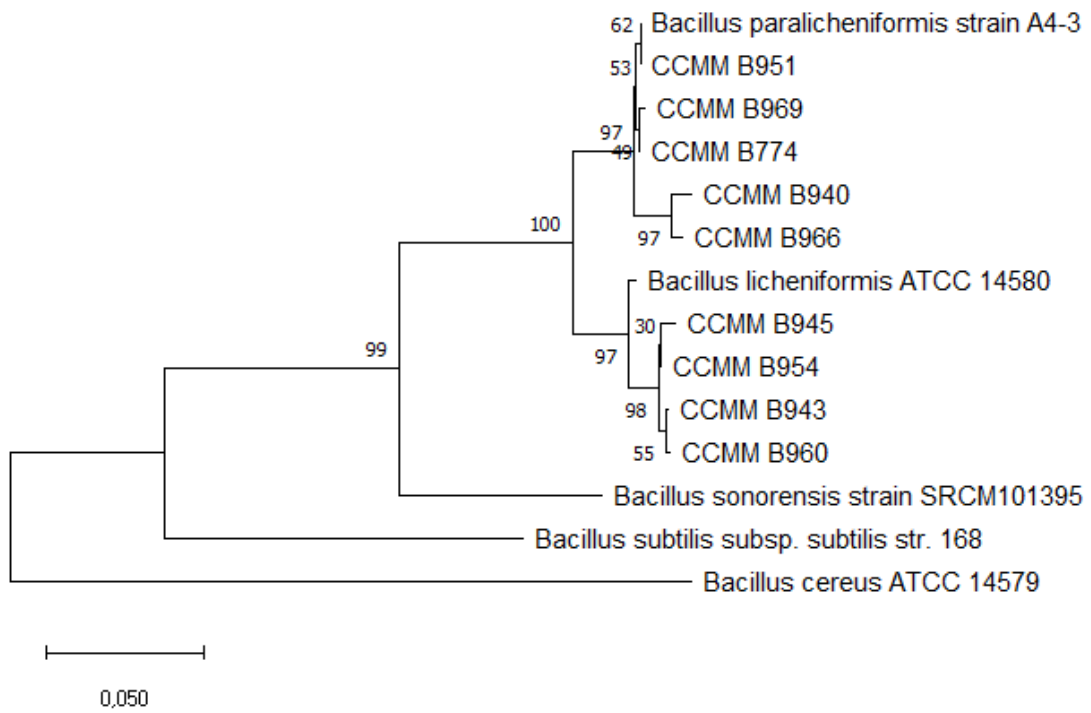


Figure S1. Neighbor-joining phylogenetic tree based on the housekeeping gene *gyrB* sequences of *Bacillus* isolates.

1 **Table S2.** Carbohydrate fermentation patterns of four *B. paralicheniformis* CCMM strains using API50CHB. Red: negative; orange: intermediary; yellow: positive

	CCMM B774				CCMM B951				CCMM B966				CCMM B969			
	1		2		1		2		1		2		1		2	
Sucres	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	Témoïn	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
1	Glycérol	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
2	Erythritol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
3	D-arabinose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
4	L-arabinose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
5	D-ribose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
6	D-xylose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
7	L-xylose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
8	D-adonitol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
9	Méthyl-βD-Xylopyranoside	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
10	D-galactose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
11	D-glucose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
12	D-fructose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
13	D-mannose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
14	D-sorbose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
15	L-rhamnose	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red
16	Dulcitol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
17	Inositol	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
18	D-mannitol	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
19	D-sorbitol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
20	Méthyl-αD-Mannopyranoside	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
21	Méthyl-αD-Glucopyranoside	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
22	N-AcétyleGlucosamine	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
23	Amygdaline	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
24	Arbutine	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
25	Esculine citrate de fer	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
26	Salicine	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
27	D-cellobiose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
28	D-maltose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
29	D-lactose (origine bovine)	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red
30	D-melibiose	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red	Yellow	Red
31	D-saccharose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
32	D-trehalose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
33	Inuline	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
34	D-mélézitose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
35	D-raffinose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
36	Amidon	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
37	Glycogène	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
38	Xylitol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
39	Gentiobiose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
40	D-turanose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
41	D-lyxose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
42	D-tagatose	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
43	D-fucose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
44	L-fucose	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
45	D-arabitol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
46	L-arabitol	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
47	Potassium gluconate	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
48	Potassium 2-cétogluconate	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
49	Potassium 5-cétogluconate	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red

Résultats complémentaires de l'article 2 : Innocuité et dialogue avec les cellules de l'hôte des souches de *Bacillus* des CCMM

Tests de résistance aux antibiotiques

Pour déterminer si une nouvelle souche microbienne destinée à être utilisée comme probiotique est sans danger pour la consommation humaine, un certain nombre de règles et des arbres décisionnels scientifiques ont été publiés afin de répondre à cet objectif (Koutsoumanis *et al.*, 2021). L'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a publié des recommandations pour l'évaluation de la sécurité de certains micro-organismes qui : a) ont une longue histoire d'utilisation dans l'industrie alimentaire, et ; b) pour lequel il existe un large corpus de preuves caractérisant les membres du genre. Diverses espèces de *Bacillus* ont ainsi été évaluées par l'EFSA et ont obtenu le statut QPS pour « Qualified Presumption of Safety », attestant de leur innocuité pour une consommation humaine (Andreoletti *et al.*, 2015). Ces souches doivent être : i) identifiées au niveau de la souche et de l'espèce ; ii) dépourvues de résistances antimicrobiennes transférables ; et iii) exemptes d'activité toxigène (EFSA, 2012; Andreoletti *et al.*, 2015; Lefevre *et al.*, 2017).

Comme évoqué dans l'article précédent, la souche candidate probiotique CCMM B969 a été identifiée par la MLST et le séquençage de son génome comme étant une souche de *B. paralicheniformis*. Cette étape réalisée, la présence de gènes conférant une résistance aux antibiotiques a été vérifiée en utilisant la base de données CARD <https://card.mcmaster.ca/> (Alcock *et al.*, 2020). Avec le paramétrage par défaut, donnant une homologie de séquence parfaite ou stricte (supérieur à 90% d'identité), 4 gènes ont été identifiés pour la souche B969 (Figure 1.a) alors qu'un seul gène est identifié pour la souche B960 appartenant à *B. licheniformis* (Figure 1.b). Le gène *ErmD* identifié chez les deux souches confère la résistance à l'érythromycine. Celui-ci serait également impliqué dans la résistance à la clindamycine (Jeong *et al.*, 2020). Les trois autres gènes (*bcrA*, *bcrB* et *bcrC*) identifiés chez la souche candidate probiotique sont impliqués dans la résistance à la bacitracine. Avec une stringence plus faible, 282 gènes ont été identifiés avec des pourcentages d'identité compris entre 19 et 79%. Du fait de la faible homologie de séquences, plusieurs de ces gènes identifiés ne sont pas impliqués dans une quelconque résistance aux antibiotiques. Cependant les gènes *cat/aph* et *aadk*, réduisant respectivement la susceptibilité au chloramphénicol et à la streptomycine chez

Bacillus, sont aussi présents dans le génome de la souche candidate probiotique (>50% d'identité).

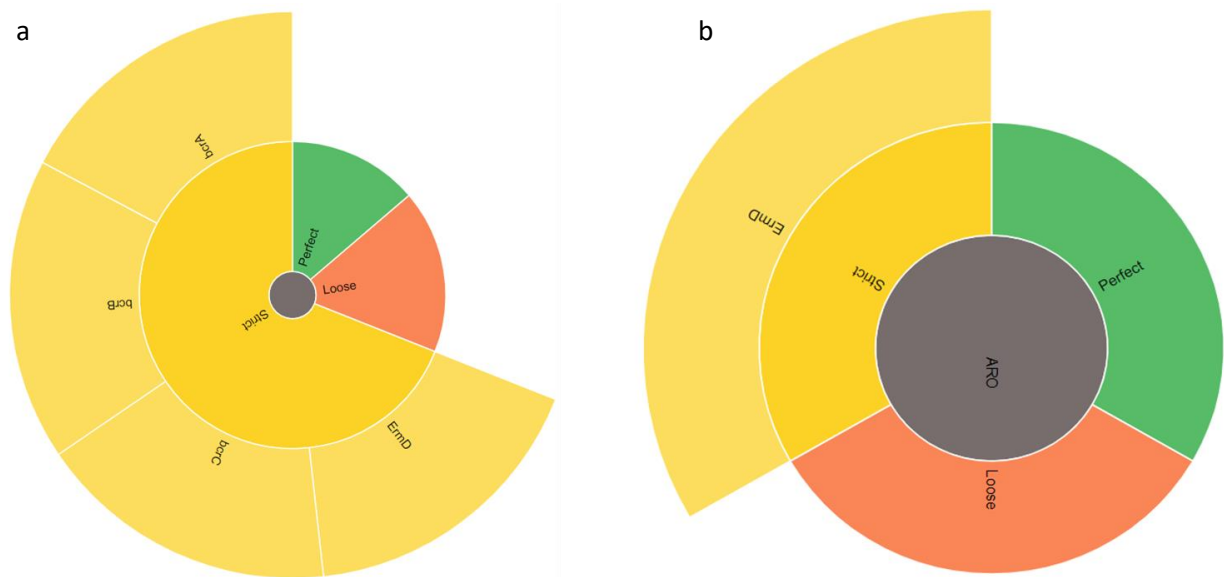


Figure 1 : Gènes de résistance aux antibiotiques détectés dans les souches CCMM B969 (a) et CCMM B960 (b)

La sensibilité de la souche candidate probiotique, ainsi que celle des 8 autres souches de *B.paralicheniformis* et *B.licheniformis* a été testée sur 8 antibiotiques cliniquement importants [chloramphénicol, clindamycine, érythromycine, gentamicine, kanamycine, streptomycine, tétracycline et vancomycine] sélectionnés sur la base des recommandations de l'EFSA pour tester la sensibilité antimicrobienne des espèces de *Bacillus* (EFSA, 2012). Le test de résistance aux antibiotiques a été réalisé en utilisant la méthode de micro-dilution en bouillon comme décrite par Lefevre et al. (2017). Cependant, les souches ont été cultivées dans du LB pendant 18h à 37°C avant d'être diluées dans le même milieu afin d'avoir une concentration à 10⁶ UFC/ml. Les plaques contenant les souches diluées et différentes concentrations d'antibiotiques ont été incubées à 37°C pendant 24h. Par la suite, les concentrations minimales inhibitrices, correspondant à la plus petite concentration de l'antibiotique inhibant la croissance d'une souche donnée, ont été déterminées et comparées avec les seuils de CMI établis par l'EFSA. Une souche est sensible à un antibiotique si sa CMI est inférieure ou égale à celle définie par l'EFSA. Les résultats montrent une sensibilité de toutes les souches à la gentamicine, la vancomycine ainsi que la tétracycline. Une sensibilité à la kanamycine a été également observée pour les souches CCMM B951, CCMM B966 ainsi que pour la souche candidate probiotique

CCMM B969. Toutes les souches sont résistantes à l'érythromycine, la clindamycine, la streptomycine et le chloramphénicol (Tableau 1).

Tableau 1 : Concentration minimale inhibitrice de 8 antibiotiques testés sur des souches de *Bacillus*

Concentration minimale inhibitrice (CMI) (mg/L)								
Souche	Kana	Clinda	Strept	Chlo	Vanco	Eryth	Genta	Tétra
CCMM B774	32	512	32	64	1	512	1	1
CCMM B940	32	512	512	32	1	512	4	4
CCMM B951	8	512	512	64	2	512	4	8
CCMM B954	32	128	512	512	1	64	4	1
CCMM B960	64	512	512	128	2	64	4	1
CCMM B966	8	512	128	128	2	512	1	4
CCMM B969	8	8	512	32	1	512	1	8
CCMM B943	32	512	128	128	4	512	4	1
CCMM B945	64	128	32	32	1	512	4	1
EFSA	8	4	8	8	4	4	4	8

Les données de la littérature scientifique montrent que ces résistances ont déjà été décrites chez des espèces de *B. paralicheniformis* et *B. licheniformis* (Adimpong *et al.*, 2012; Agersø *et al.*, 2019; Jeong *et al.*, 2020). Ces données suggèrent que les résistances aux antibiotiques observées chez les souches de *Bacillus paralicheniformis* seraient intrinsèques et ne se situeraient pas sur des éléments génétiques mobiles (Agersø *et al.*, 2019). Ces résultats nous permettent donc de conclure quant à la résistance naturelle de notre souche candidate probiotique à la clindamycine, l'érythromycine, la streptomycine, et le chloramphénicol.

Présence de gènes de virulence et de toxicité

La présence de gènes de virulence et de gènes de toxicité a été vérifiée dans le génome des souches de *B. paralicheniformis* en utilisant la base de données VFDB (Virulence Factor Data Base) <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>. Les résultats pour la souche probiotique candidate CCMM B969, comparés à d'autres souches de *B. anthracis*, *B. clausii* ou encore *B.*

licheniformis, sont présentés dans le tableau 2. L'Hémolysine III a été le seul gène de toxicité identifié dans les génomes des 4 souches de *B. paralicheniformis* des CCMM. D'autres gènes impliqués dans des fonctions cellulaires et d'adaptation de la bactérie ont été également identifiés par la base de données. Mais en l'absence de mécanismes de pathogénicité confirmés, ces derniers peuvent être vus comme bénéfiques dans le sens où ils permettent à la bactérie de mieux s'adapter à son environnement (Chokesajjawatee *et al.*, 2020).

Le gène de l'hémolysine III a été également identifié chez des probiotiques commercialisés et reconnus comme étant sûrs, tels que des souches de *Lactobacillus plantarum* ou encore *Bacillus clausii* (Chokesajjawatee *et al.*, 2020). Ce gène a été aussi identifié dans d'autres souches de *Bacillus subtilis*, *B. amyloquefaciens* mais ces dernières n'ont montré aucune activité hémolytique (Kim *et al.*, 2021, 2022). Ces résultats suggèrent ainsi l'**absence d'activité toxigénique** pour la souche candidate probiotique CCMM B969.

Tableau 2 : Gènes de virulence et de toxicité détectés chez la souche CCMM B969

VFclass	Facteur de virulence	Related genes	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	<i>B.anthraxis</i> str. Sterne(pXO1! pXO2-)	<i>B.clausii</i> KSM-K16	<i>B.licheniformis</i> DSM 13 (ATCC 14580)
			CCMM B969	Chromosome (NC_005945)	Chromosome (NC_006582)	Chromosome (NC_006322)
Immune evasion	Polyglutamic acid capsule	capA	CCMMB969_cds3140	-	-	BLi03837
		capB	CCMMB969_cds3142	-	-	BLi03839
		capC	CCMMB969_cds3141	-	-	BLi03838
		capD	CCMMB969_cds445	-	-	BLi01364
Iron acquisition	Bacillibactin	dhbA	CCMMB969_cds3214	BAS2204	-	BLi03902
		dhbB	CCMMB969_cds3211	BAS2207	-	BLi03899
		dhbC	CCMMB969_cds3213	BAS2205	-	BLi03901
		dhbE	CCMMB969_cds3212	BAS2206	-	BLi03900
		dhbF	CCMMB969_cds3210	BAS2208	-	BLi03898

Toxin	Hemolysin III	hlyIII	CCMMB969_cds1 456	BAS2087	ABC2532	BLi02317
Acid resistance	Urease(Helicobacter)	ureB	CCMMB969_cds3 739	-	-	-
		ureG	CCMMB969_cds3 736	-	-	-
Anaerobic respiration	Nitrate reductase(Mycobacteri um)	narG	CCMMB969_cds2 183	-	-	-
		narH	CCMMB969_cds2 182	-	-	-

Propriétés immunomodulatrices des souches de *Bacillus*

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) sont la première ligne de contact avec le microbiote intestinal et jouent un rôle fondamental dans la régulation des processus immunitaires intestinaux en lien avec certaines pathologies (cancer, maladies inflammatoires chroniques, maladies métaboliques). Les propriétés immunomodulatrices des souches de *B. paralicheniformis* et *B. licheniformis* ont été étudiées à l'aide de cribles cellulaires associant la technologie de gènes rapporteurs à des régions promotrices de différents gènes et facteurs de transcription des CEI (De Wouters *et al.*, 2014). En effet, des cellules épithéliales humaines HT-29 transfectées avec le gène rapporteur de la phosphatase alcaline sécrétée (SEAP) pour le suivi de l'activation du facteur de transcription NF- κ B (HT-29/kb-seap-25) ont été utilisées pour des essais d'immunomodulation (Lakhdari *et al.*, 2010). Les cellules rapporteuses HT-29/kb-seap-25 ont été cultivées dans un milieu RPMI-Glutamine (Sigma-Aldrich), supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (Corning), 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate de sodium, 1 % tampon HEPES (Thermofisher Scientific), et 1% pénicilline-streptomycine (Lonza), comme décrit par Lakhdari et al.(2010). Par la suite, les cellules HT-29/kb-seap-25 ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à 3×10^4 cellules/puits et incubées pendant 24 h à 37 °C sous 5 % de CO₂ avant la stimulation.

Avec l'objectif d'évaluer la capacité des souches à activer NF- κ B, les systèmes rapporteurs contenant les CEI ont été stimulés avec des lysats bactériens. Ils ont aussi été stimulés avec les culots non-traités, ainsi que les surnageants des souches de *Bacillus* cultivées dans du LB. Quant à leur capacité à inhiber NF- κ B, elle a été étudiée en stimulant les systèmes rapporteurs avec du TNF α pendant 1h avant de stimuler avec les culots traités, non-traités ainsi que les surnageants. L'activation ou l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B a été quantifiée par dosage au Quanti-blue (Invivogen) de la phosphatase alcaline sécrétée.

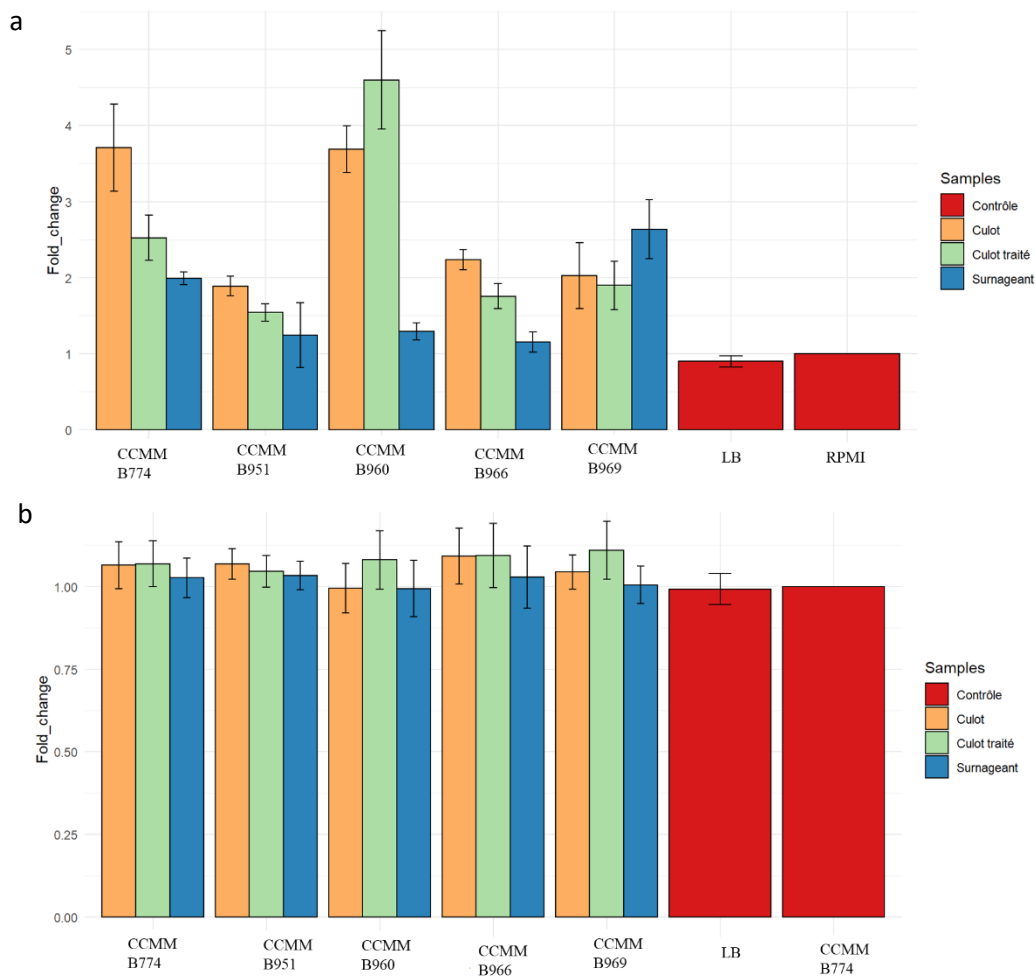


Figure 2 : Activation (a) ou inhibition (b) de NF- κ B par des souches de *Bacillus*. $n \geq 3$, les valeurs sont exprimées en moyennes et écart-type

Nos résultats montrent une activation modérée de NF- κ B par toutes les souches testées, à des niveaux différents, alors que le milieu de culture ne montre aucune activité (Figure 2a). Le surnageant de la souche candidate probiotique CCMM B969 active NF- κ B 2,6 fois par rapport au contrôle (RPMI), les souches B774 et B960 présentent un ratio supérieur d'environ 4 et 4,5 respectivement. Cette activation modérée de NF- κ B est également maintenue, mais avec une moindre intensité (Figure 3), après stimulation par les souches cultivées en anaérobie dans un

milieu minimum supplémenté en fibres (Macfarlane, Macfarlane and Gibson, 1998). Aucune des souches testées n'a montré d'inhibition de NF- κ B (Figure 2b).

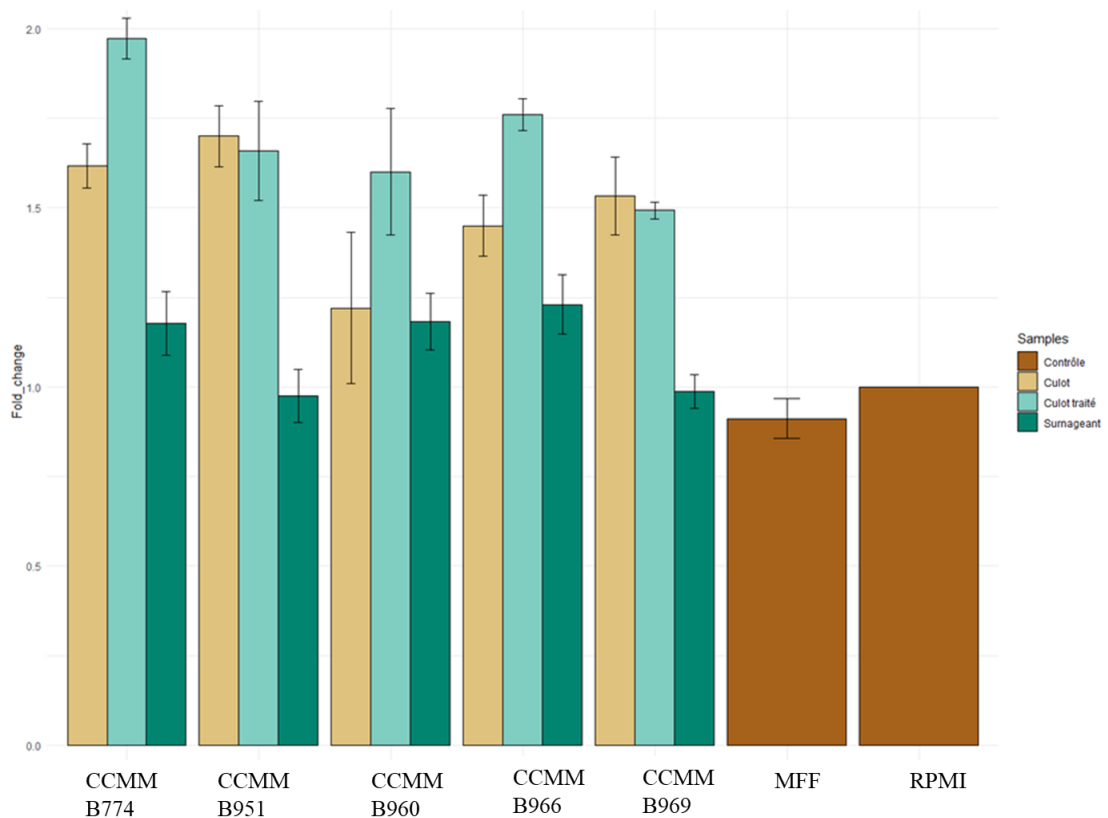


Figure 3 : Activation de NF- κ B par des souches de *Bacillus* cultivées dans un milieu minimum avec fibres. MFF: Milieu Macfarlane avec fibres. $n \geq 3$, les valeurs sont exprimées en moyennes et écart-type

En utilisant des systèmes rapporteurs HT-29, il a été montré qu'une souche d'*Akkermansia muciniphila* isolée de l'intestin humain pouvait augmenter l'activation de NF- κ B plus de 2 fois par rapport au contrôle (Martin-Gallausiaux *et al.*, 2022). *A. muciniphila* a un impact positif sur la santé de l'hôte, notamment en favorisant l'intégrité de la barrière intestinale (Cani and de Vos, 2017; Derrien, Belzer and de Vos, 2017). Notre souche probiotique candidate active NF- κ B à des niveaux comparables à l'activation par *A. muciniphila*. Ce résultat préliminaire nous permet de capturer une première image de l'interaction de notre souche candidate probiotique avec les CEI, et ne montre pas d'activation excessive, ni d'inhibition de NF- κ B. Néanmoins, le profil pro ou anti-inflammatoire de la souche candidate probiotique devra être étudié par des expérimentations supplémentaires, notamment le dosage des cytokines.

Modulation de la perméabilité intestinale dans un modèle cellulaire

La capacité des souches à influencer la perméabilité transépithéliale a été évaluée en mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) en utilisant des cellules Caco-2 (Chamignon *et al.*, 2020). Les lignées cellulaires d'adénocarcinome colorectal humain Caco-2 ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplémenté de 20 % de sérum bovin fœtal inactivé par la chaleur, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% de pyruvate de sodium, 1 % tampon HEPES (Thermofisher Scientific), et 1% pénicilline-streptomycine (Lonza). Les cellules Caco-2 ont été cultivées à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 10% de CO₂ (Marinelli *et al.*, 2019). Les cellules ont été par la suiteensemencées à une concentration de 3.10⁴ cellules/puits dans une plaque à 24 puits (Transwell, 0.33 cm², 0.4 µm, Corning) et cultivées comme décrit précédemment jusqu'à atteindre une valeur de TEER > 900 ohms.cm⁻². Les valeurs TEER ont été mesurées avec un voltmètre-ohmmètre Evom2 avant l'ajout de bactéries (t = 0 h) et après 24 h d'incubation. La suspension bactérienne a été ajoutée à un rapport de bactéries par cellule de 40:1 (Chamignon *et al.*, 2020). Le milieu DMEM a été utilisé comme contrôle négatif. Le ratio TEER a été calculé comme suit, et l'impact de la souche sur la perméabilité cellulaire a été étudiée par comparaison avec le contrôle :

$$\text{ratio TEER} = \frac{\text{TEER traitement t24}/\text{TEER traitement t0}}{\text{TEER contrôle t24}/\text{TEER contrôle t0}}$$

Nous avons évalué si les souches de *Bacillus paralicheniformis*, dont la souche candidate probiotique CCMM B969, ainsi qu'une souche de *B. licheniformis* CCMM B960 pouvaient maintenir l'intégrité de la barrière intestinale dans un modèle cellulaire *in vitro* en mesurant la résistance électrique transépithéliale (TEER) dans les cellules Caco-2. Nos résultats montrent un effet souche-dépendante sur l'intégrité de la barrière intestinale. Aucune des souches testées n'a augmenté l'intégrité de la barrière intestinale. La souche *B. licheniformis* B960 et la souche candidate probiotique *B. paralicheniformis* CCMM B969 maintiennent l'intégrité de la barrière (Figure 4). Les autres souches à l'exception de la B960 montrent une tendance vers un effet impactant de la barrière, mais ces résultats sur la perméabilité intestinale des cellules Caco-2 ne sont pas significatifs.

Dans cette partie complémentaire, l'innocuité de la souche candidate probiotique *B. paralicheniformis* CCMM B969 a été évaluée par des techniques génomiques et phénotypiques. Les analyses *in silico* de son génome et les tests d'antibiorésistance ont révélé que la souche ne présentait aucun problème d'innocuité important, tel que la toxicité pour une consommation

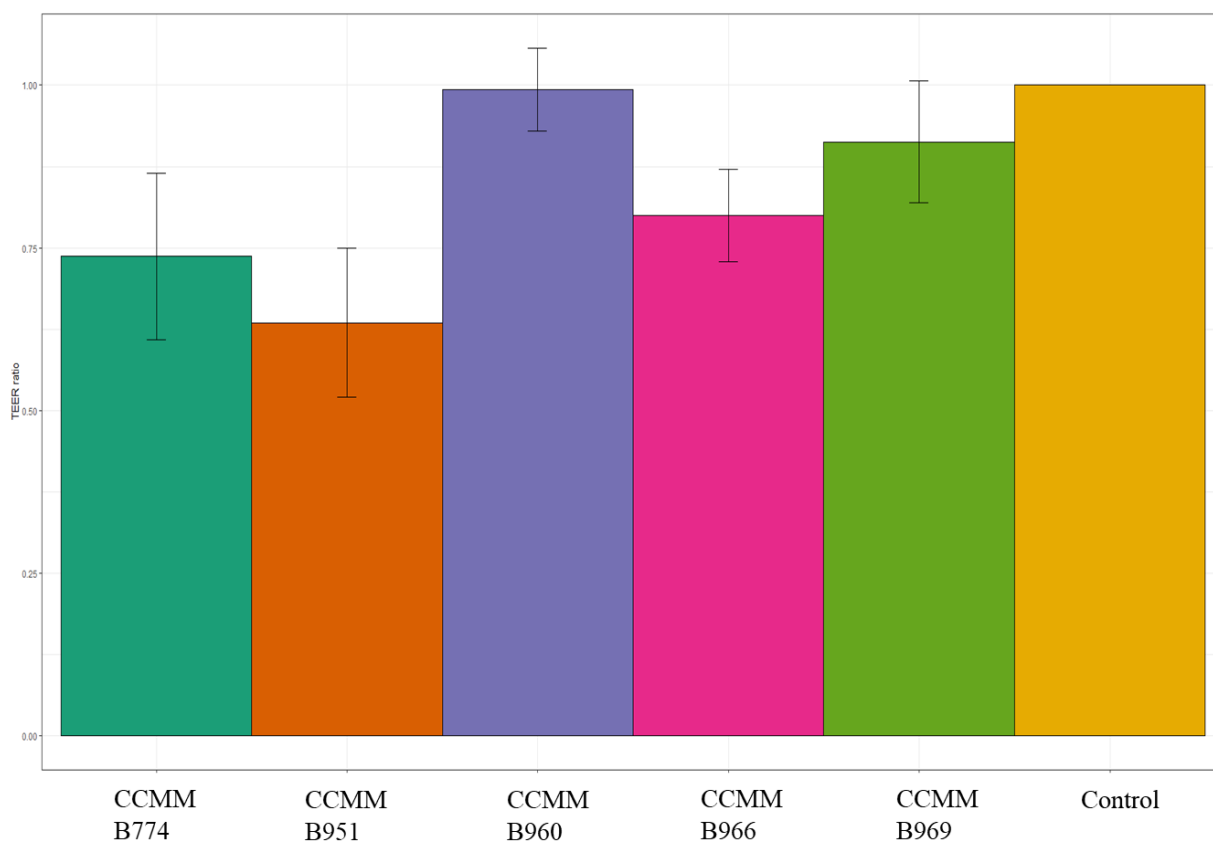


Figure 4 : Impact des souches de *Bacillus* sur la perméabilité des cellules épithéliales intestinales

humaine et le transfert de résistance aux antibiotiques au microbiote intestinal. Les expériences menées avec différentes lignées de cellules épithéliales intestinales indiquent une activation modérée voire faible de NF- κ B après stimulation par la souche CCMM B969 et le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale. A la lumière de ces résultats et de la longue histoire de consommation sûre de *B. paralicheniformis* dans les aliments traditionnels à base de soja fermenté, nous pouvons conclure que la souche CCMM B969 ne présente pas de danger potentiel à ce stade de notre étude. Pour valider pleinement l'innocuité de cette souche probiotique, des études *in vivo* seront nécessaires pour confirmer notamment sa tolérance chez l'Homme et l'absence d'effets indésirables.

Nous validons donc la souche CCMM B969 comme probiotique candidate pour une étude d'impact en modèle *in vitro* sur le microbiote intestinal.

CHAPITRE III : Impact de la souche candidate CCMM B969 en fermenteur anaérobie

Article 3: Fibre-degrading *bacillus paralicheniformis* probiotic candidate improves metabolic activity of colonic butyrate-producers in an *in vitro* obese model

Dans l'équipe « Fonctionnalités de l'Ecosystème Intestinal » (FInE), nous nous intéressons aux fonctions de dégradation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal et la compréhension des mécanismes enzymatiques à l'origine de la déconstruction de fibres alimentaires complexes. Depuis quelques années, des modèles *in vitro* de fermentation avec des microbiotes intestinaux d'individus sains sont développées dans cette équipe afin de mieux comprendre la mécanistique de la dégradation des fibres alimentaires par le microbiote intestinal, et l'impact des fibres et ingrédients fonctionnels sur les populations bactériennes. Ce modèle est intéressant pour simuler une partie du colon et permet ainsi d'étudier l'impact d'un pré ou probiotique sur la composition et la diversité du microbiote intestinal. Il permet également d'étudier l'activité métabolique du microbiote intestinal en permettant des collectes d'échantillons en temps réel sans que des considérations éthiques ne soient prises en compte (hormis les aspects réglementaires d'utilisation des selles humaines). Ainsi dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé ce modèle pour y créer des conditions dysbiotiques, et se rapprocher des conditions physiologiques potentiellement retrouvées dans le microbiote d'une personne en situation d'obésité. Ce modèle pourrait, à terme, servir de modèles précliniques pour cribler et tester des probiotiques potentiels pour leur capacité préventive ou thérapeutique dans les maladies métaboliques telles que l'obésité.

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer l'impact de la souche CCMM B969 sur le microbiote intestinal de trois individus souffrant d'obésité, en présence ou absence d'un meilleur équilibre d'apport en fibres alimentaires. Dans l'article 2, nous avons montré que la souche CCMM B969 de *B. paralicheniformis* avait la capacité à dégrader diverses fibres végétales, notamment des polysaccharides complexes, représentatifs des fibres de notre alimentation qui parviennent au colon. En accord également avec les tests d'innocuité, nous avons donc proposé cette souche comme candidate probiotique fibrolytique. L'impact de la souche CCMM B969, associée à diverses fibres végétales, sur la composition, la diversité et l'activité métabolique du microbiote intestinal de trois personnes en situation d'obésité a été évalué et rapporté dans l'article 3.

Ce dernier article est en préparation pour le journal « Gut Microbes » (Taylor & Francis).

**FIBRE-DEGRADING *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* PROBIOTIC CANDIDATE
IMPROVES METABOLIC ACTIVITY OF COLONIC BUTYRATE-PRODUCERS IN
AN *IN VITRO* OBESE MODEL**

NGOM Serigne Inssa¹, BRESSUIRE Christelle¹, BÉGUET-CRESPEL Fabienne¹, JUSTE Catherine¹, Héloïse GUIBOUT¹, THIRION Florence², RACHED Bahia^{3,4,5}, EL FAHIME Elmostafa^{3,4}, AMAR Mohamed^{3,6}, BÉRA-MAILLET Christel^{1,*}

¹Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France

²Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, MGP, Jouy-en-Josas, France

³Collections Coordonnées Marocaines de Microorganismes, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Morocco

^{4,5}Unité d'Appui Technique à la Recherche Scientifique, Plateforme de biologie moléculaire et de Génomique Fonctionnelle, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Morocco

⁵Laboratoire de Chimie-Physique et Biotechnologies des Biomolécules et matériaux/ Equipe Microbiologie Biomolécules et Biotechnologies, Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia, Morocco

⁶Laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique, Rabat, Morocco

Running Title: *Bacillus paralicheniformis* increases butyrate production in obese microbiota.

*Address correspondence to Dr. Christel Béra-Maillet, christel.maillet@inrae.fr

Data availability statement: The assembled metagenome and all relevant sequences have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI xx, 2023 under the following accession numbers: BioProject yyyyyyyy (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/yyyyyy>); BioSample zzzzzz; metagenome xxxxxxxx.

Acknowledgments: Funding for this research was provided by the National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE). Serigne Inssa NGOM is a recipient of a grant for doctoral research allocated by the French ministry of higher education and research (doctoral school 569, University of Paris-Saclay).

We thank MGP platform facilities for the DNA extraction and shotgun metagenomic sequencing. We thank Frédéric Pepke, Claire Cherbuy and Catherine Philippe who provided the material and technical resources for SCFAs measurements. We thank Marie-Thérèse Goudiaby for her help in lactate measurements.

Statements:

Conflict of interest: the authors declare that they have no conflict of interest in the publication.

Author contributions: SIN and CBM conceived the study. SIN, CBM designed the experiments. CB provided her expertise in using chemostats *in vitro* models. MA and BR provided the strain of *Bacillus*. SIN and FT performed the assembly and analyzed the metagenomes. SIN, CBM analyzed the data. SIN, CBM wrote the manuscript with the help of all authors. All authors have read and approved the final manuscript.

Abstract

Trillions of bacteria colonize our gastrointestinal tract and maintain a symbiotic relationship with the host. Disturbance in the balance of intestinal microbiota-host interactions plays a role in the onset of several metabolic diseases. The microbiota composition is influenced by our diet, particularly dietary fibres (DF) found in human food like fruits, vegetables, legumes, and cereals (Sonnenburg & Bäckhed, 2016). Unlike the human genome, the gut microbiota has a large repertoire of glycoside hydrolases capable of breaking down complex dietary carbohydrates into sugars fermented by bacteria which thus produce short-chain fatty acids (SCFAs). Type 2 diabetes is sometimes associated with impaired production of SCFA and depletion of fibre-degrading-SCFAs-producing bacterial members (Zhao et al., 2018). Modulation of the gut microbiota through fibre-degrading probiotics is a promising approach to restore gut homeostasis.

The main objective of this work was to evaluate the impact of a single or combined approach using diversified complex purified fibres associated or not with a fibrolytic *Bacillus* probiotic candidate on the composition and abundance of gut bacteria and fermentation end-products.

Fecal bacteria from obese donors were cultivated in fermenters for one week with fat-enriched medium before switching to medium supplemented with various DF for two weeks. Sampling was performed throughout the duration of the experiment. SCFAs were quantified by gas chromatography. The composition of gut bacteria was investigated by shotgun metagenomics. Our study revealed, in a first place, that switching from a high-fat diet to a high-fibre diet is associated with an increase in SCFAs and fibre-degrading-SCFA-producing bacterial members. This study also showed that intake of a candidate probiotic strain of *Bacillus*, selected for its fibrolytic properties, in combination with a high-fibre diet significantly increased butyrate production ex-vivo, especially compared to the action of DF alone. The ability of DF/Probiotic to restore the balance of gut bacteria, in the context of obesity, was characterized by the abundance of fibre-degrading and SCFA-producing bacterial members. Taken together, these observations show that the combination of functional fibres and a probiotic *Bacillus* strain could be a useful strategy to modulate the microbial community of obese individuals, by selectively stimulating different microbial groups.

Keywords: *Bacillus paralicheniformis*, Gut microbiota, Obesity, Probiotic, Dietary fibres, Butyrate, *in vitro* models.

Introduction

Remarkable progress has been made the past decade about our knowledge of gut microbiota and its symbiotic relationship with the host (Doré and Blottière, 2015; van de Guchte, Blottière and Doré, 2018). Starting at birth, these interactions are crucial for the host for numerous health promoting functions including degradation of complex dietary fibres, synthesis of Short-Chain Fatty Acids (SCFAs) metabolites as host energy, intestinal barrier functions and immunity. Most microbiome-related pathologies have increased dramatically over the past century, suggesting that a change in lifestyle could disrupt the symbiosis of the gut microbiota due to the loss of beneficial and protective microbes (Logan, Jacka and Prescott, 2016). In people with metabolic diseases such as type 2 diabetes (T2D) and obesity, fibre intake is very often reduced in favor of a higher fat diet. This correlates with a loss of microbial richness and diversity and an imbalance in gut microbiota-host interactions (Le Chatelier *et al.*, 2013; Myhrstad *et al.*, 2020; Agus, Clément and Sokol, 2021; Krautkramer, Fan and Bäckhed, 2021). The typical “Western diet”, consisting of high-fat, high-sugar foods, has also been linked to chronic low-grade inflammation, metabolic disease, and obesity. Diet rich in high animal and saturated fats could alter the gut microbiota, by increasing lipopolysaccharides (LPS), increasing trimethylamine-N-oxide (TMAO), and decreasing SCFAs (Beam, Clinger and Hao, 2021). In contrast, high-fibre diet improves the richness, stability of the gut microbiota and protects from cardiovascular disease (Cotillard *et al.*, 2013; Tap *et al.*, 2015; Ranaivo *et al.*, 2022).

Dietary fibres include different types of polysaccharides and oligosaccharides found in fruits, vegetables, legumes, and cereals in the human diet. The human genome, however, encodes only a limited number of enzymes for the digestion of carbohydrates (mainly lactose, saccharose and starch) in the small intestine (Kaoutari *et al.*, 2013; Krautkramer, Fan and Bäckhed, 2021). Nevertheless, the gut microbiota possesses a huge repertoire of Carbohydrate-Active enZymes (CAZymes) including various and numerous enzymes capable of breaking-down these complex dietary carbohydrates and hence vastly expand the host’s metabolic capacity. Bacterial metabolism of DF generates SCFAs which influence gastrointestinal epithelial cell integrity, glucose homeostasis, lipid metabolism, appetite regulation, and immune function (Holscher, 2017). To counterbalance the deficiency in SCFA production and depletion of fibre-degrading-SCFA-producing bacterial members observed in inflammatory disorders and metabolic syndrome (Zhao *et al.* 2018; Qin *et al.* 2012; Shinde *et al.* 2020b; Krautkramer *et al.* 2021), nutritional interventions and probiotics could be efficient tools to

modulate GM and restore the gut microbiota-host symbiosis (Cotillard *et al.*, 2013; Kobyliak *et al.*, 2016).

Bacillus species have been widely used as probiotic ingredient in both animals and humans as many species are adapted to survive in the gastrointestinal tract (Duysburgh *et al.*, 2019). *Bacillus* species are also known to metabolize a variety of complex dietary fibres (Shinde *et al.* 2020; Maski *et al.* 2021; Ngom *et al.*, under review), increase levels of SCFA-producing bacteria (Marzorati *et al.*, 2020; Sasaki *et al.*, 2020) and to have anti-obesity and anti-diabetic properties (Yang *et al.*, 2015). We recently proposed a *Bacillus paralicheniformis* as fibre-degrading probiotic candidate that could initiate the degradation of complex dietary fibres and release oligosaccharides to SCFA-producing gut bacteria with benefits to host health. (Ngom *et al.*, submitted). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the influence of *B. paralicheniformis* on the composition and abundance of gut bacteria from obese individuals and fermentation end-products. A single or combined approach using both complex diversified purified fibres and the fibrolytic *B. paralicheniformis* probiotic candidate, was conducted in *in-vitro* model of obese gut microbiota. The use of DF or DF and *B. paralicheniformis* modulated the production of butyrate and butyrate-producers abundance, at different levels, highlighting the beneficial role of *B. paralicheniformis* as probiotic.

Methods

Ethical statement

The experiment was conducted at INRAE of Jouy-en-Josas (France). All the experimental protocols have been approved by the French Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France III ethic committee, under the reference ID-RCB: 2022-A00293-40, with INRAE as promotor. Stool self-collection was obtained in accordance with data protection and legislation on civil liberties as stated by the National Commission of Computing and Freedoms (CNIL, Paris, France). This research project was conformed to the reference methodology MR003 (Reference 2018-154_03/05/2018). All volunteers, fully informed of the objective of the project, have given a written consent confirming their willingness to participate before entry into the study. Volunteers has no history with antibiotics or probiotic supplementation for at least 3 months before donation.

All methods in this study were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Preparation of fecal microbiota inocula

Fecal samples were self-collected by three obese French women ($33.2 < \text{BMI} < 39.5$) according to the International Human Microbiome Standards (IHMS_SOP 002 V2). Fresh stool samples were collected in hermetic box under anaerobic conditions using a catalyst (Anaerocult, Biomerieux, France), and placed at 4°C until processing in anaerobic chamber (90% N₂, 5% H₂ and 5% CO₂) within 4 hours after collection.

Fecal bacteria were then purified from stool using an original residue-free microbiota (RFM) method developed by C. Juste with an OptiPrep™ density gradient (Proteogenix, Schiltigheim, France) as described in previous studies (Juste et al. 2014; Burz et al. 2019; Henry et al. 2022; Bressuire et al., submitted). The RFMs were stored at -80 °C before use.

Preparation of *B. paralicheniformis* probiotic candidate

The probiotic candidate was cultured twice and prepared from a LB culture of 7 h at 37°C until OD 1. Cells were then harvested at 5,000g for 15min at 4°C, washed with PBS1X, resuspended in 0.05M phosphate buffer with 20 % glycerol and aliquoted into daily doses containing 10⁹ CFU/mL of *B. paralicheniformis* CCMM B969 (Ngom et al., submitted) stored at -80 °C.

Experimental design of *in vitro* single-stage colonic fermentations

The continuous fermentations were carried out for up to 21 days in six single-stage colonic fermenters run in parallel (Biostream, Doetinchem, The Netherlands). Each donor had two continuous culture systems. Each reactor was operated with conditions selected to mimic the adult distal colon (pH 6.8). Anaerobiosis was maintained through continuous headspace flushing with Bio-300 gas (90% N₂, 5% H₂, and 5% CO₂) from Air liquid (Grigny, France). All reactors were operated at a working volume of 200 mL using two successive fermentation media for nutrients supplying to microbial communities, adapted from previous studies (Agans *et al.*, 2018; Poeker *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021). The fat-enriched medium (FEM) was depleted in carbohydrates, and enriched in fats and proteins to mimic obesogenic conditions, in proportions matching the expected macronutrient distribution in colon on an average high-fat diet (Agans *et al.*, 2018). The healthy gut model medium (HGMM) was enriched in carbohydrates and proteins without dietary fatty acids (Table S1). All components of the fermentation media were from Sigma-Aldrich, except the purified polysaccharides (Megazyme, Bray, Ireland).

Following inoculation at 1% with RFM, the fermenters were run in Batch cultures for 20 h, prior to continuous feeding with fresh medium at a flow rate of 8.33 ml/h for the duration of

the experiment and a constant pH of 6.8 maintained with 3 M NaOH. An initial colonization

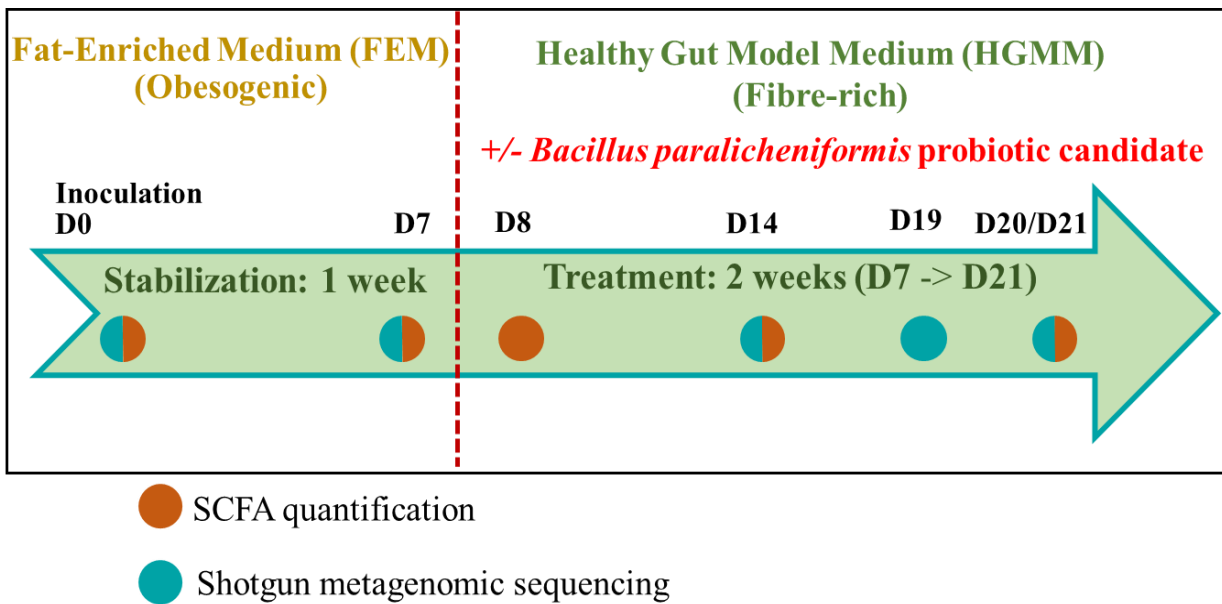


Figure 1: Experimental design of the *in vitro* single stage colonic fermentation models used in this study

and stabilization phase of 7 days was carried out using FEM. On day 7, FEM was replaced by HGMM over a 24h-period (using feed-in), and a continuous feeding was carried out for two weeks, without further modification. For each donor, one of the two HGMM fermenters was supplemented with twice-daily doses (8h interval) of the *B. paralicheniformis* probiotic candidate (Fig. 1). The second one was used as a control and received two daily doses of phosphate buffer (1 mL). Sampling was performed at different times (0, 7, 8, 14, 19, 20, and 21 days) in each fermenter throughout the fermentations for SCFAs, and Shotgun metagenomic analyses (Fig. 1).

SCFAs measurements

Samples from fermenters were centrifuged at 5,000g for 15 min at 4°C to collect the supernatants which were stored at -80 °C. Extracellular proteins were precipitated with a phosphotungstic acid saturated solution. The samples were centrifuged twice at 12,000 × g for 15 min, and the supernatant used for SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) determination by gas-liquid chromatography (GC 7890, Agilent Technologies, France) as described in Cherbuy et al.(2019). All samples were analyzed in biological duplicates with two technical replicates each. Results are expressed as means (± SEM) of these independent measures.

D and L-Lactate were measured in deproteinized samples using Biosentec D and L-lactic acid enzymatic kit (Biosentec, Toulouse, France), according to manufacturer instructions.

Microbiota analysis

Total DNA extraction of microbiota from stool samples, inocula and fermenters, and Shotgun metagenomic sequencing

DNA extraction from aliquots of fermentation samples, fresh stools and purified fecal bacteria was performed following the IHMS SOP 07 V2 (<http://www.human-microbiome.org/index.php?id=Sop&num=005>) at INRAE MetaGenoPolis (MGP) Sambo platform. DNA was quantitated using Quantit Fluorometric Quantitation (ThermoFisher Scientific, Waltham, US). Three µg of high molecular weight DNA (>10 kbp) was used to build the library. Shearing of DNA into fragments of approximately 150 bp was performed using an ultrasonicator (Covaris, Woburn, US) and DNA fragment library construction was performed using the Ion Plus Fragment Library and Ion Xpress Barcode Adapters Kits (ThermoFisher Scientific, Waltham, US). DNA of 42 samples were sequenced at MGP Metaquant platform to obtain a minimum of 1 million high-quality reads per sample.

Microbial gene count table

To create the gene count table as described by Ranaivo et al (2022), the METEOR software was used: first, reads were filtered for low-quality by AlienTrimmer (<https://forgemia.inra.fr/metagenopolis/meteor>). Reads that aligned to the human genome (identity > 95%) were also discarded. Remaining reads were trimmed to 80 bases and mapped to the Integrated Gut Catalog 2 (IGC2),^{53,54} comprising 10.4 million of genes, using Bowtie2. First, the unique mapped reads (reads mapped to a unique gene in the catalog) were attributed to their corresponding genes. Second, the shared reads (reads that mapped with the same alignment score to multiple genes in the catalog) were attributed according to the ratio of their unique mapping counts of the captured genes. The resulting count table was further processed using the R package MetaOMineR v1.31.2 It was downsized to 900,000 mapped reads to take into account differences in sequencing depth and in mapping rate across samples. Then the downsized matrix was normalized for gene length and transformed into a frequency matrix (fragments per kilobase of exon model per million reads mapped) (FPKM) normalization. Gene count was computed as the number of genes detected (i.e., whose abundance is strictly positive) in a given sample after downsizing MGP IBS.

Metagenomic Species Pan-Genomes (MSP) profiles

Metagenomic Species Pan-Genomes (MSP) profiles were constructed as described by Plaza Onate et al, (2019). The IGC2 catalog was organized into 1,990 MSPs, clusters of minimum 100 genes, using MSPminer. MSP taxonomy was assigned with the Genome Taxonomy Database. Relative abundance of an MSP was computed as the mean abundance of its 100 ‘marker’ genes (that is, the genes that correlate the most altogether). If less than 10% of ‘marker’ genes were seen in a sample, the abundance of the MSP was set to 0. Relative abundances at higher taxonomical ranks were computed as the sum of the MSP that belong to a given taxa. MSP count was assessed as the number of MSPs present in a sample (that is, whose abundance is strictly positive).

The IGC2 was also annotated for Carbohydrate-Active enZYmes (CAZy, November 2018) (<http://www.cazy.org/>). The abundance of each CAZYme group (glycoside hydrolases (GH), glycosyl-transferases (GT), polysaccharide lyases (PL), and carbohydrate esterases (CE)) was computed using the same process described in Ranaivo (2022) .

Statistical analysis

Measures of α -diversity, including species richness and diversity indices were calculated using R packages phyloseq and ggplot 2.

Bray-Curtis dissimilarity was assessed with R package vegan v2.6.4.

Differences between the control and probiotic-supplemented treatment periods in microbial community composition, SCFA, lactate, levels were analyzed using paired two-sided Student’s t-tests. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant.

All statistics were performed using R software v3.6.0. Quantitative values were expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Results

The microbial composition of the inocula is representative of the bacterial communities of the donor’s stools

The microbial composition and diversity of the fecal samples were compared to those of the RFMs microbiota before inoculation into the fermenters, using metagenomics. For all three donors, Metagenomic Species Pan-genomes (MSPs) profiles (composition and richness) in both samples showed high similarity and confirmed that the purified bacteria are representative of those in fresh stools (Fig. 2).

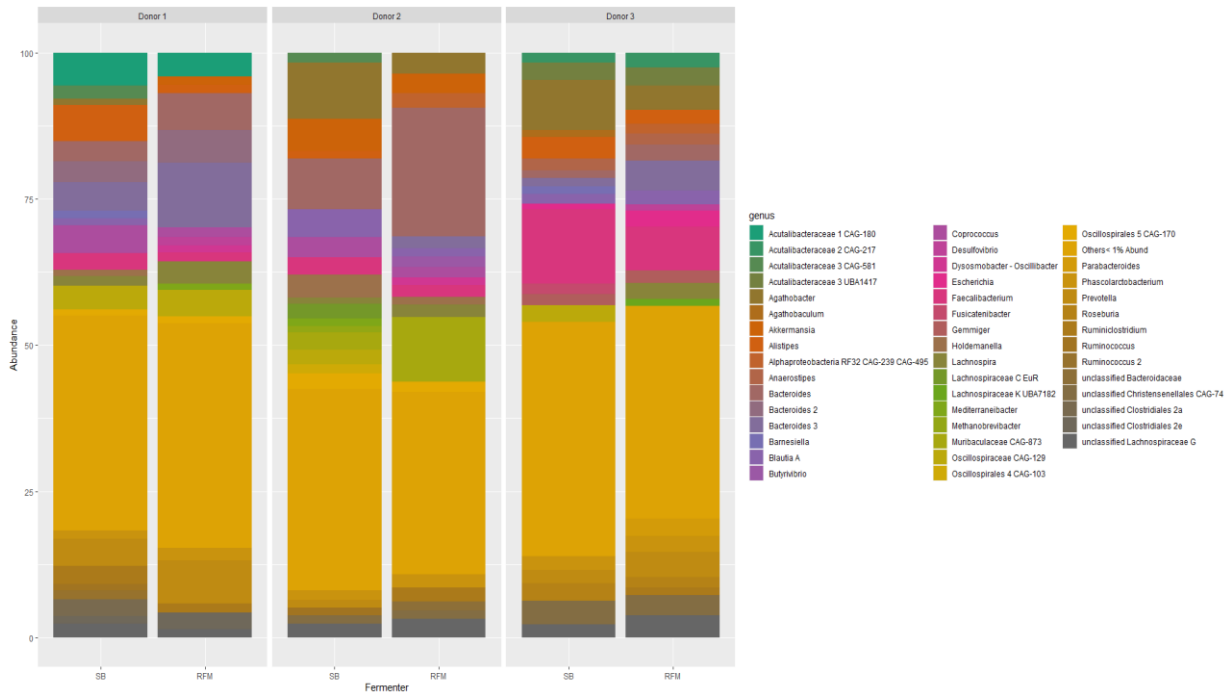


Figure 2: Relative abundance of microbial communities in fresh stools and RFM at the genus level, for the three donors.

The microbiota from the three obese donors comprised around 200 different MSPs, which is lower than those found in healthy European adults (Bressuire et al., submitted). At the phylum level, the taxonomic distribution showed MSPs from the main Bacillota (formerly Firmicutes), Bacteroidota (Bacteroidetes), and Pseudomonadota (Proteobacteria) phyla. Actinomycetota (formerly Actinobacteria) and Verrucomicrobiota (Verrucomicrobia) have limited number of MSPs in all three donors (Fig.S1.A).

At the genus level, a diverse microbiota was found in the fresh stools (SB) and RFM including *Bacteroides*, *Blautia*, *Feacalibacterium*, *Roseburia*, *Akkermansia* and *Prevotella* (Fig. 2). *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides cellulosilyticus*, *Parabacteroides distasonis*, *Prevotella marseillensis*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis*, *Agathobacter rectale*, [*Eubacterium*] sp. CAG:180 and *Akkermansia muciniphila* (Fig.S1.B) were found among the most abundant species.

DFs and *B. paralicheniformis* impacted obese microbial communities and butyrate production

- **DFs and probiotic intervention positively modified butyrate production**

For each donor, the SCFAs (acetate, butyrate, propionate) were measured during the 3 weeks-experiment in all fermenters, at different time (D0-D21). Total SCFAs reached 130/170 mM for the control experiment (without probiotic) and 135/190 mM for probiotic-supplemented microbiota at the final time of fermentations (Fig. S2).

The means of SCFAs daily produced were first examined as indicators of fermentation activities (Fig. 3). The fermenters with microbiota of the same donor (control vs probiotic-supplemented) reached approximately the same amount of SCFAs after 7 days of culture in FEM, corresponding to a stabilized period (except for butyrate form Donor 1 and Donor 3 and propionate from Donor 1). The concentrations of SCFAs increased significantly ($q < 0.05$) during the treatment period. Indeed, the treatment with the *Bacillus* probiotic resulted in significantly higher butyrate concentrations as compared to the control in all experiments. Furthermore, a trend towards increased acetate levels was observed in control fermenter for Donor 1 and 2, the reverse was observed with donor 3.

Lactate accumulation was low in all fermenters, with the maximum in F1 with 1 and 1.5 mM at D7 for L-lactate and D-lactate, respectively (not shown).

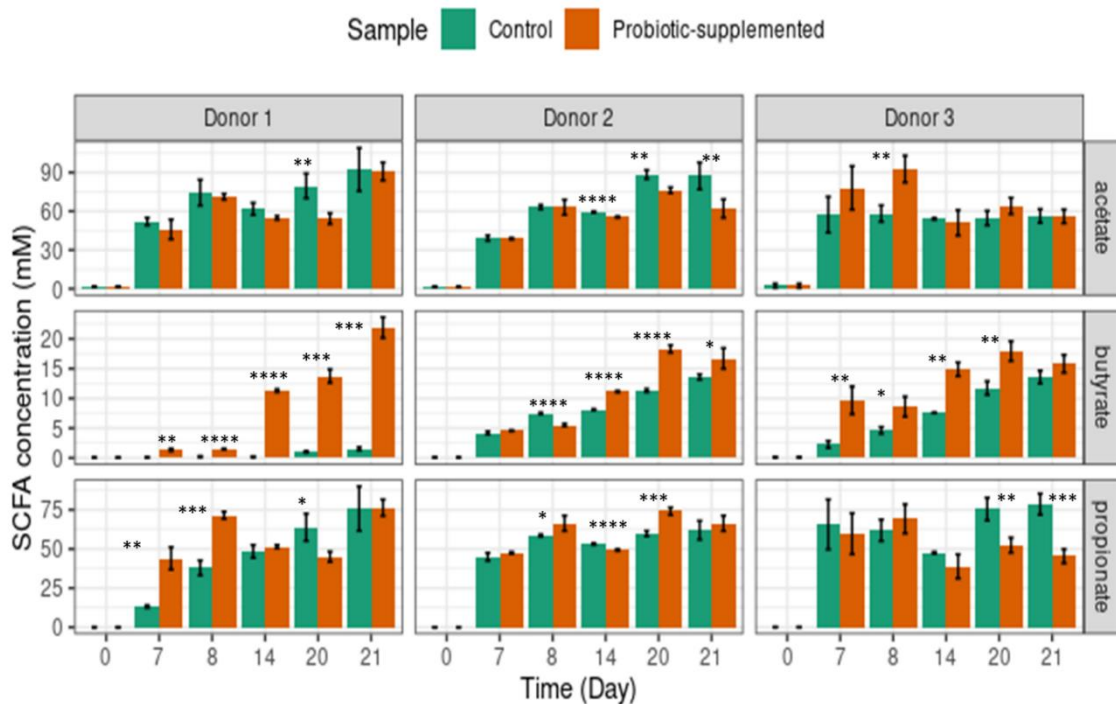


Figure 3: SCFAs production over the 3-weeks experiments for all three donors, with or without probiotic supplementation.

- **Microbial community composition of obese people was modified by DFs and probiotic to an increase of fibre-degraders**

Alpha diversity of samples was estimated using the non-parametric Shannon index (Fig. 4). For the three donors, purified microbiota (RFMs) was close to their corresponding D0 samples (4.0/4.5; small deviation in Donor3), but a loss of diversity was then observed in all samples (<

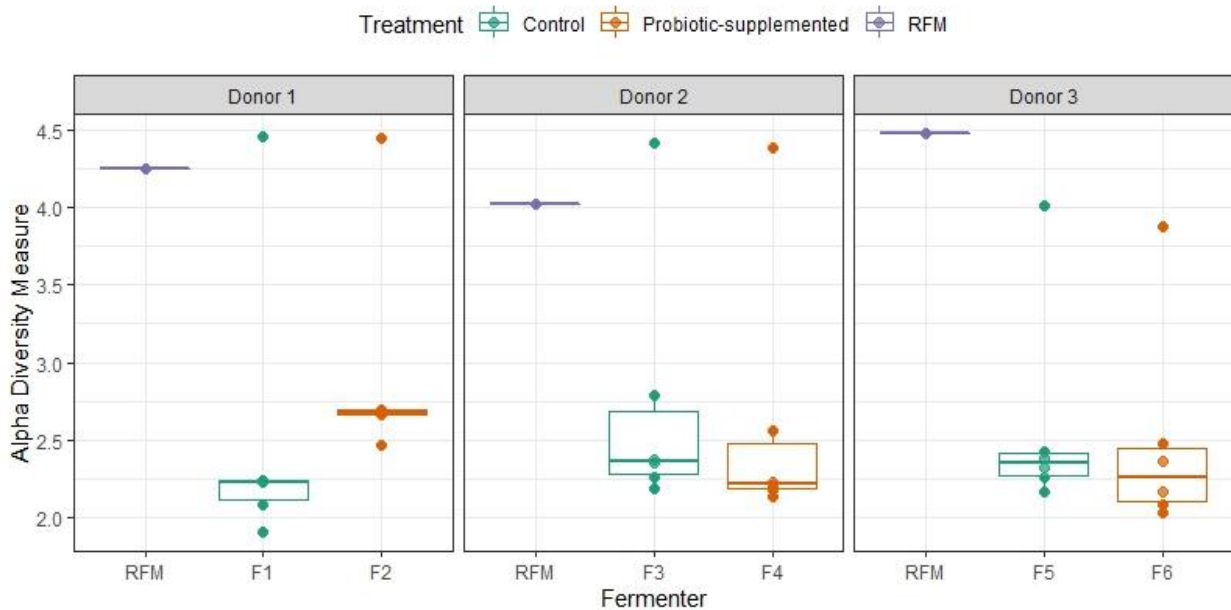


Figure 4: Shannon diversity index of all samples (inocula and fermenters) from the three donors at all sampling times

3) during fermentations (Fig. 4). The alpha-diversity was not subsequently modified by the probiotic treatment, except for Donor 1 which showed a slight increase (Fig. 4).

The beta diversity, based on Bray-Curtis dissimilarities, was illustrated in Figure 5.

The distance between purified microbiota and D0 inocula was close, confirming the efficiency of the RFM preparation method, as mentioned previously. However, the distance was greater with the fermenter samples, suggesting a remodeling of communities *in vitro* which is donor-dependent.

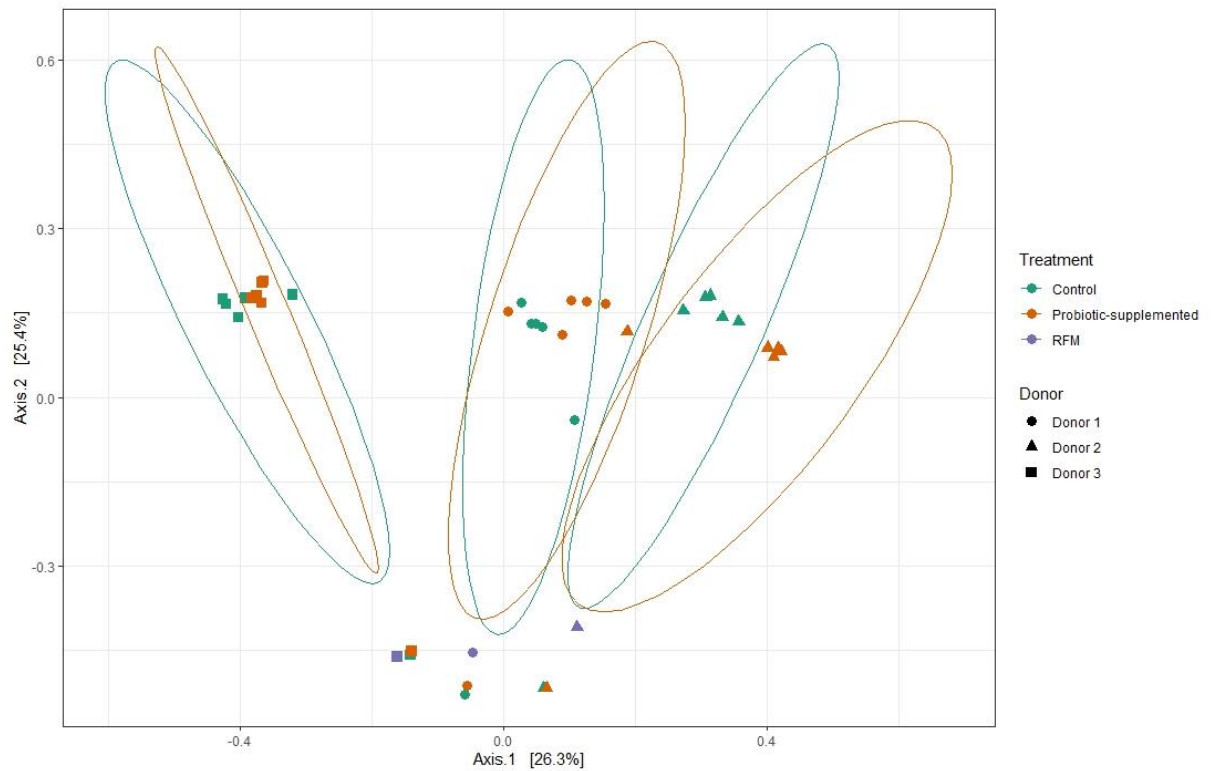


Figure 5: Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity based on MSP relative abundances.

The results demonstrated a clear separation between each donor following in-vitro fermentations. Nevertheless, no clear dissimilarity was found between the gut microbiota supplemented with or without *Bacillus* probiotics.



Figure 6: Relative abundance of microbial communities in fermenters at the genus level, for the three donors.

The MSPs composition of all donor associated microbiota was analyzed during the entire experiments (Fig. 6). The Bacillota (formerly Firmicutes) and Bacteroidota (formerly Bacteroidetes) phyla were dominant in the inocula of the three donors. Proteobacteria and Verrucomicrobiota (including *Akkermansia muciniphila*) were also represented, the latter with higher level in Donor 2 at phylum level (Fig. S3.A).

We analysed the effect of DFs and probiotic treatment on the microbial communities.

First, the D0-D7 period of fermentation, corresponding to FEM continuous feed-in, was characterized by a significant decrease in Bacillota (formerly Firmicutes), and an increase of Proteobacteria for all donors. Microbiota were dominated by *Alphaproteobacteria*, *Akkermansia*, *Flavonifractor* and *Bacteroides* (Fig. 6). The switch from obesogenic medium to the high fibre medium (HGMM) at day 7 was associated with an increase of relative abundance of species belonging mainly to Firmicutes. In contrast, the numbers of different clades of Proteobacteria decreased, except for Donor 3 with *Azospirillum sp. CAG:239* being the most abundant species. Switching to HGMM during a 2-weeks treatment was not sufficient to restore higher diversity in gut microbiota. However, the *Bacillus* probiotic intake altered gut microbiota composition by modifying the relative abundance of some MSP species. Associated to fibre-rich

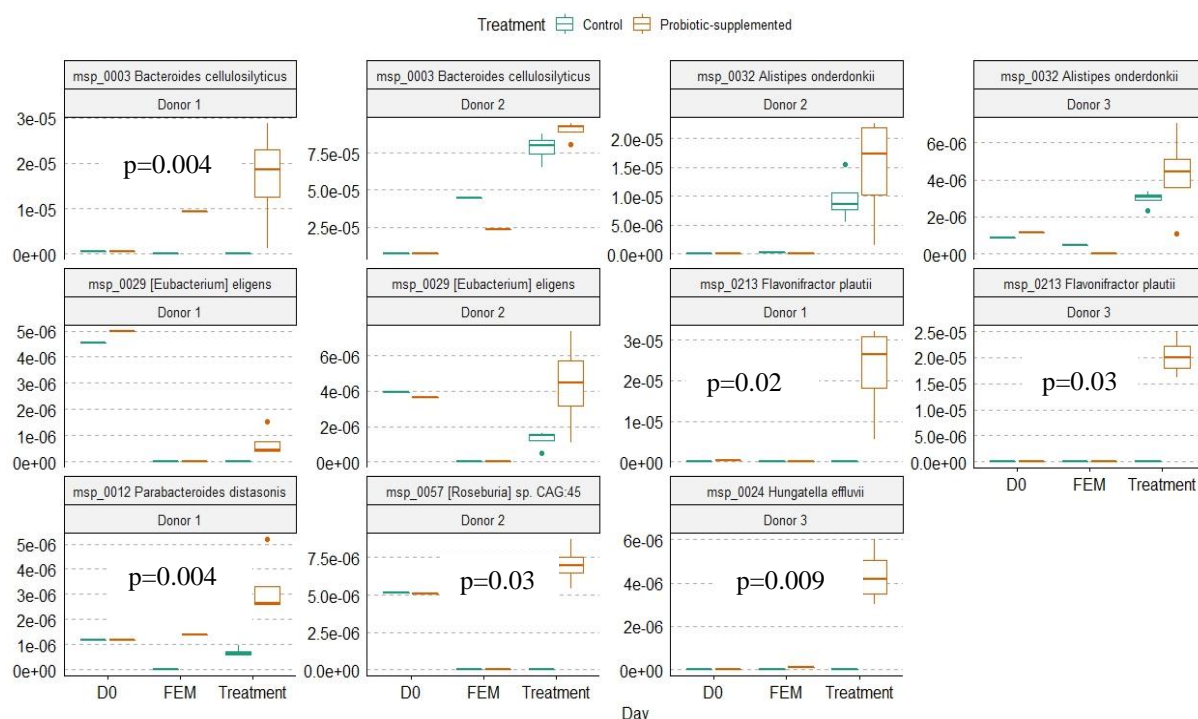


Figure 7: Comparison of the relative abundance of the MSPs stimulated by various fibres and probiotic candidate supplementation. D0: Inoculated medium; FEM: Fat Enriched Medium (D7); treatment: HGMM+/-probiotic (from Day 7 to Day 21). p-values from Wilcoxon signed-rank test between Control and probiotic-supplemented are displayed

medium, it stimulated, according to the donor, a wide spectrum of groups containing potential butyrate-producing species, such as *Eubacterium eligens*, *Flavonifractor plautii*, and *Roseburia sp.* (Fig. 7). In addition, a greater abundance of bacterial species—*Bacteroides cellulosilyticus*, *Parabacteroides distasonis*, known for degrading various polysaccharides and producing SCFA, were observed during the 2-weeks treatment.

Discussion

In this study, we aimed to evaluate *B. paralicheniformis*, exhibiting strong fibrolytic activities, as a probiotic candidate to modulate the gut microbiota from obese volunteers. We used a single-stage colonic fermentation *in vitro* model with strict/severe experimental conditions, mainly nutritive medium exacerbating fat-enriched nutrients. From this dysbiotic environment, we applied an enriched fibre nutrients in addition to *B. paralicheniformis* or not (control), and examined bacterial species and fermentation end-products impacted by the nutritive shift and the treatment. Shotgun metagenomic analysis allowed the description of bacterial communities at outstanding species level thanks to MSPs, and an estimation of their abundances. The microbial composition analysis reveals a representative composition of RFMs compared to fresh stools.

Our study revealed that switching from a high-fat diet to an enriched-fibre diet is associated with an increase in total SCFAs and fibre-degrading-SCFA-producing bacterial members. This was expected considering that fermentation of DFs to acetate, butyrate, and propionate SCFAs is a major function of healthy GM, but it confirmed that gut bacteria of obese donors benefited from these nutrients and were modulated in a more health-promoting manner (Cronin *et al.*, 2021).

Microbial SCFAs have been shown to contribute significantly to host health within the gut and in the periphery (Morrison and Preston, 2016; Fehlbaum *et al.*, 2018). Our study also showed that *B. paralicheniformis*, selected for its fibrolytic properties (Ngom *et al.*, under review), significantly increased butyrate production *in vitro* in the presence of dietary fibres. Interestingly, this butyrogenic effect was observed for all donors in probiotic supplemented fermenters. Butyrate is a major source of energy for the colonic epithelium and exerts several health-promoting properties such as anti-inflammatory activity, anti-cancer effects, promotion of satiety and reduction of oxidative stress (Hamer *et al.*, 2008). Our results suggest cross-feeding with other gut bacteria, as *Bacillus* species are not butyrate-producers. This could be mediated by nutritional interactions involving oligosaccharides from the degradation of food

polysaccharides promoting SCFA-producers or by intermediary fermentation product utilization, such as lactate-utilizing bacteria (Duncan, Louis and Flint, 2004; Tom Dieck *et al.*, 2021) . Several studies evidenced lactate production in *Bacillus* species (Gao *et al.*, 2012; Ye *et al.*, 2013).

Previous *in vitro* studies have reported that *Bacillus* probiotic altered the metabolic activity of human gut microbiota (Duysburgh *et al.*, 2019; Marzorati *et al.*, 2021). In Duysburgh *et al.* (2019), butyrate levels were enhanced using a mix of five *Bacillus* species together with Fodmaps oligosaccharides in a synbiotic formula, reaching significantly higher levels in all colonic regions from the model as compared to the control period after a 4-weeks treatment. However, it is difficult to determine the effect of probiotic from that of oligosaccharides. A second study testing the probiotic mixture alone, with a single donor, showed no significant change in butyrate concentration (Marzorati *et al.*, 2021). *B. paralicheniformis* was not included in this mixture.

It has been suggested that the mucosal environment in *in vitro* models favors Firmicutes, including SCFA-producers (Van Den Abbeele *et al.*, 2013). Although we do not have specific mucosal compartment, mucus is consistently present in our vessels, and higher rates of butyrate production were observed with *B. paralicheniformis* compared with the colonic stages of the Duysburgh and Marzorati *in vitro* models treated with the mixture of five *Bacillus* strains.

We found a donor-dependent increase in acetate and propionate production in the fermenter supplemented or not with our *Bacillus* probiotic candidate. Several *in vitro* and *in vivo* studies have reported SCFA donor-dependent production (Venkataraman *et al.*, 2016; De Paepe *et al.*, 2017; Holmes *et al.*, 2020) . It is well established that SCFA production is influenced by the composition of the donor's gut microbiome. When compared with other SCFAs, relatively limited bacteria are responsible for butyrate production in the human gut microbiota (Tanno *et al.*, 2021) . Acetate, one of the major SCFAs, is metabolized by the gut bacteria from dietary fiber fermentation and exerts a variety of physiological functions (Nicholson *et al.*, 2012). The large amount of propionate produced by the gut microbiota was likely due to the fact that this fatty acid is formed during mucin degradation, consistent with the finding that mucin-degrading *Akkermansia spp.* release more propionate than acetate during fermentation (Agans *et al.*, 2018) . It is reported that propionate has the capacity to bind to specific receptors and trigger the secretion of gut peptides such as glucagon-like peptide-1 and peptide YY which are involved in the regulation of appetite and glucose metabolism (Cani *et al.*, 2019).

At the microbial level, our study showed, first, that fecal and purified microbiota prepared from the same donor were closely related, and confirmed a good preservation of bacteria (diversity, and abundance) during the purification process. This result is consistent with those we obtained previously (Burz et al. 2019; Juste et al. 2014; Bressuire et al., under review) and reinforce this method as an interesting tool for studying food product, functional ingredients, and drugs interactions with gut bacterial communities in fermenters.

Microbiota of obese donors have a reduced diversity and abundance compared to healthy donors (Cotillard *et al.*, 2013; Le Chatelier *et al.*, 2013). We observed here about 1/3 less MSPs in the microbiota of three French obese donors compared to those of four French healthy donors (Bressuire et al., under review), using the same purification process. Alteration of bacterial species has been linked to several factors such as diet. This alteration is sometimes associated with the occurrence of metabolic syndromes such as obesity or type 2 diabetes. Therefore, a large panel of experiments has attempted to module and restore the gut bacteria of obese people, and probiotics have been shown to be a positive lever, especially using LAB and next generation probiotics (Depommier *et al.*, 2019). In this study, we chose an approach combining enriched-fibre medium, alongside the use of a fibrolytic *B. paralicheniformis* probiotic candidate. We hypothesized that both recommendations could be provided by specialists to improve gut microbiota composition and function, and indirectly the health benefits for obese people.

In line with previous data (Agans *et al.*, 2018), we used a fat-enriched medium to force a dysbiotic microbiota from obese donors through the supplementation of similar fatty acid proportions in fermenters as in a high-fat western diet, until the end of a stabilization period and before switching to an enriched-fibre diet. The FEM induced a decrease of alpha-diversity and several species were not detectable anymore, especially among the Firmicutes phylum members. On the contrary, we noticed an increased abundance of Bacteroidota and Proteobacteria phyla. Agans et al (2018) suggests that among the most FEM impacted genera, the vast majority did not possess any fatty acid oxidation enzymes, with the exception of few species encoding a putative acyl-coenzyme A (acyl-CoA) synthetase. In addition, members of the “lipophilic” microbes including many members of phylum Proteobacteria are predicted to possess the full complement of fatty acid degradation pathway genes and are thus capable of utilizing dietary fats for growth (Agans *et al.*, 2018).

Upon fibre supplementation with or without the *Bacillus* probiotic intake, the relative abundance of Firmicutes phylum was stimulated, except for F1, to different extents in all

fermenters of the *in vitro* colon model. However, this 2-weeks supplementation did not restore the gut microbiota richness from the three donors to their initial composition. What might be the gut microbiota richness if the probiotic supplementation were longer? Nevertheless, we might speculate that the microbiota was disrupted until it reached a tipping point. As described by previous studies, it is intuitively clear that when a system is pushed to its limits, it can reach a “tipping point” from where it can easily be propelled to a different state. Such a state transition is also called a “critical transition” or a “catastrophic transition,” meaning that setting back the conditions to those that reigned before the switch is not sufficient to shift the system back to its original state (van de Guchte, Blottière and Doré, 2018; Van de Guchte *et al.*, 2020). It would be of great interest to investigate whether a prolonged fermentation time in a fibre-enriched medium would succeed in modulating the composition of gut microbiota back to its initial composition. However, some species were stimulated in a donor-dependent manner either by the fibre-enriched medium, or in the combined approach using the *Bacillus* fibre-degrading probiotic candidate in presence of food polysaccharides (Figure 7). The combined approach has stimulated some members of butyrate-producing bacteria from Clostridium clusters IV and XIVa, such as *Flavonifractor plautii*, *Eubacterium eligens*, and *Roseburia* sp (Levine *et al.*, 2013), consistent with the increased level of butyrate production observed in the fermenters. These microbes usually produce butyrate by metabolizing carbohydrates through butyryl-CoA:acetate CoA-transferase or butyrate kinase, but some use lactate and acetate as sources for its production (Tanno *et al.*, 2021). Hence, the potential mechanism of their stimulation could go through a cross-feeding effect initiated by the degradation of dietary fibres by *B. paralicheniformis*. Therefore, our probiotic candidate might promote different species with similar function and/or glycolytic activity, and could be used as a functional probiotic to improve Health status of obese individuals.

To conclude, we showed that intake of a candidate probiotic strain of *Bacillus*, selected for its fibrolytic properties, in combination with a fibre-enriched diet significantly increased butyrate production *in vitro*. The ability of dietary fibre/Probiotic to restore the balance of gut bacteria, in the context of obesity, was characterized by the abundance of fibre-degrading and SCFA-producing bacterial members, despite a limited action on bacterial diversity. Taken together, these observations show that the rebalancing of diet with complex polysaccharides representatives of dietary fibres, and the use of *B. paralicheniformis* as probiotic strain could be a useful strategy to modulate the microbial community of obese individuals, by selectively stimulating functional microbial groups, mainly butyrate-producers.

References:

- Van Den Abbeele, P. et al. (2013) 'Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model', *ISME Journal*, 7(5), pp. 949–961. doi: 10.1038/ismej.2012.158.
- Agans, R. et al. (2018) 'Dietary fatty acids sustain the growth of the human gut microbiota', *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21). doi: 10.1128/AEM.01525-18.
- Agus, A., Clément, K. and Sokol, H. (2021) 'Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders', *Gut*. BMJ Publishing Group, pp. 1174–1182. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323071.
- Beam, A., Clinger, E. and Hao, L. (2021) 'Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota', *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 2795. doi: 10.3390/nu13082795.
- Burz, S. D. et al. (2019) 'A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation', *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-019-45173-4.
- Cani, P. D. et al. (2019) 'Microbial regulation of organismal energy homeostasis', *Nature Metabolism*. Nature Publishing Group, pp. 34–46. doi: 10.1038/s42255-018-0017-4.
- Le Chatelier, E. et al. (2013) 'Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers', *Nature*, 500(7464), pp. 541–546. doi: 10.1038/nature12506.
- Cherbuy, C. et al. (2019) 'Modulation of the caecal gut microbiota of mice by dietary supplement containing resistant starch: Impact is donor-dependent', *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), p. 1234. doi: 10.3389/fmicb.2019.01234.
- Cotillard, A. et al. (2013) 'Dietary intervention impact on gut microbial gene richness', *Nature* 2013 500:7464, 500(7464), pp. 585–588. doi: 10.1038/nature12480.
- Cronin, P. et al. (2021) 'Dietary fibre modulates the gut microbiota', *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 1655. doi: 10.3390/nu13051655.

Depommier, C. et al. (2019) 'Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study', *Nature Medicine*, 25(7), pp. 1096–1103. doi: 10.1038/s41591-019-0495-2.

Doré, J. and Blottière, H. (2015) 'The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, pp. 195–199. doi: 10.1016/j.copbio.2015.01.002.

Duncan, S. H., Louis, P. and Flint, H. J. (2004) 'Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), pp. 5810–5817. doi: 10.1128/AEM.70.10.5810-5817.2004.

Duysburgh, C. et al. (2019) 'A synbiotic concept containing spore-forming *Bacillus* strains and a prebiotic fiber blend consistently enhanced metabolic activity by modulation of the gut microbiome in vitro', *International Journal of Pharmaceutics*: X, 1, p. 100021. doi: 10.1016/J.IJPX.2019.100021.

Fehlbaum, S. et al. (2018) 'In Vitro Fermentation of Selected Prebiotics and Their Effects on the Composition and Activity of the Adult Gut Microbiota', *International Journal of Molecular Sciences* 2018, Vol. 19, Page 3097, 19(10), p. 3097. doi: 10.3390/IJMS19103097.

Gao, T. et al. (2012) 'L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1', *Bioresource Technology*, 121, pp. 105–110. doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.108.

Van de Guchte, M. et al. (2020) 'Alternative stable states in the intestinal ecosystem: proof of concept in a rat model and a perspective of therapeutic implications', *Microbiome*, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/S40168-020-00933-7/FIGURES/7.

van de Guchte, M., Blottière, H. M. and Doré, J. (2018) 'Humans as holobionts: implications for prevention and therapy', *Microbiome*. NLM (Medline), p. 81. doi: 10.1186/s40168-018-0466-8.

Hamer, H. M. et al. (2008) 'Review article: The role of butyrate on colonic function', *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 104–119. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.

Henry, C. et al. (2022) 'Modern Metaproteomics: A Unique Tool to Characterize the Active Microbiome in Health and Diseases, and Pave the Road towards New

Biomarkers—Example of Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis Flare-Ups’, *Cells* 2022, Vol. 11, Page 1340, 11(8), p. 1340. doi: 10.3390/CELLS11081340.

Holmes, Z. C. et al. (2020) ‘Short-chain fatty acid production by gut microbiota from children with obesity differs according to prebiotic choice and bacterial community composition’, *mBio*, 11(4), pp. 1–15. doi: 10.1128/MBIO.00914-20/SUPPL_FILE/MBIO.00914-20-ST003.DOCX.

Holscher, H. D. (2017) ‘Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota’, *Gut Microbes*. Taylor & Francis, pp. 172–184. doi: 10.1080/19490976.2017.1290756.

Juste, C. et al. (2014) ‘Bacterial protein signals are associated with Crohn’s disease’, *Gut*, 63(10), pp. 1566–1577. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303786.

Kaoutari, A. El et al. (2013) ‘The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota’, *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), pp. 497–504. doi: 10.1038/nrmicro3050.

Kobyliak, N. et al. (2016) ‘Probiotics in prevention and treatment of obesity: A critical view’, *Nutrition and Metabolism*, 13(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/S12986-016-0067-0/TABLES/2.

Krautkramer, K. A., Fan, J. and Bäckhed, F. (2021) ‘Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 77–94. doi: 10.1038/s41579-020-0438-4.

Levine, U. Y. et al. (2013) ‘Butyrate-producing bacteria, including mucin degraders, from the swine intestinal tract’, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), pp. 3879–3881. doi: 10.1128/AEM.00589-13.

Liu, L. et al. (2021) ‘An in vitro approach to studying the microbial community and impact of pre and probiotics under anorexia nervosa related dietary restrictions’, *Nutrients*, 13(12), p. 4447. doi: 10.3390/nu13124447.

Logan, A. C., Jacka, F. N. and Prescott, S. L. (2016) ‘Immune-Microbiota Interactions: Dysbiosis as a Global Health Issue’, *Current Allergy and Asthma Reports*. Springer, pp. 1–9. doi: 10.1007/s11882-015-0590-5.

Marzorati, M. et al. (2020) ‘*Bacillus subtilis* HU58 and *Bacillus coagulans* SC208 probiotics reduced the effects of antibiotic-induced gut microbiome dysbiosis in an M-SHIME® model’, *Microorganisms*, 8(7), pp. 1–15. doi: 10.3390/microorganisms8071028.

Marzorati, M. et al. (2021) ‘Treatment with a spore-based probiotic containing five strains of *Bacillus* induced changes in the metabolic activity and community composition of the gut microbiota in a SHIME® model of the human gastrointestinal system’, *Food Research International*, 149, p. 110676. doi: 10.1016/J.FOODRES.2021.110676.

Maski, S. et al. (2021) ‘Hemicellulosic biomass conversion by Moroccan hot spring *Bacillus paralicheniformis* CCMM B940 evidenced by glycoside hydrolase activities and whole genome sequencing’, *3 Biotech*, 11(8), p. 379. doi: 10.1007/s13205-021-02919-0.

Morrison, D. J. and Preston, T. (2016) ‘Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism’, *Gut microbes*, 7(3), pp. 189–200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.

Myhrstad, M. C. W. et al. (2020) ‘Dietary fiber, gut microbiota, and metabolic regulation—current status in human randomized trials’, *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 859. doi: 10.3390/nu12030859.

Ngom, S. I. et al. (under review) ‘CHARACTERISATION OF HEMICELLULOLYTIC *BACILLUS PARALICHENIFORMIS* CCMM STRAINS AS FUTURE FIBROLYTIC PROBIOTICS’, *Scientific Reports*.

Nicholson, J. K. et al. (2012) ‘Host-gut microbiota metabolic interactions’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1262–1267. doi: 10.1126/science.1223813.

Oñate, F. P. et al. (2019) ‘MSPminer: Abundance-based reconstitution of microbial pan-genomes from shotgun metagenomic data’, *Bioinformatics*, 35(9), pp. 1544–1552. doi: 10.1093/bioinformatics/bty830.

De Paepe, K. et al. (2017) ‘Inter-individual differences determine the outcome of wheat bran colonization by the human gut microbiome’, *Environmental Microbiology*, 19(8), pp. 3251–3267. doi: 10.1111/1462-2920.13819.

Poeker, S. A. et al. (2018) ‘Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS)’, *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-22438-y.

Qin, J. et al. (2012) ‘A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes’, *Nature* 2012 490:7418, 490(7418), pp. 55–60. doi: 10.1038/nature11450.

Ranaivo, H. et al. (2022) 'Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk', *Gut Microbes*, 14(1). doi: 10.1080/19490976.2022.2044722.

Sasaki, K. et al. (2020) 'Bacillus coagulans SANK 70258 suppresses Enterobacteriaceae in the microbiota of ulcerative colitis in vitro and enhances butyrogenesis in healthy microbiota', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), pp. 3859–3867. doi: 10.1007/s00253-020-10506-1.

Shinde, T. et al. (2020) 'Modulating the microbiome and immune responses using whole plant fibre in synbiotic combination with fibre-digesting probiotic attenuates chronic colonic inflammation in spontaneous colitic mice model of IBD', *Nutrients*, 12(8), pp. 1–26. doi: 10.3390/nu12082380.

Tanno, H. et al. (2021) 'Characterization of fructooligosaccharide metabolism and fructooligosaccharide-degrading enzymes in human commensal butyrate producers', *Gut Microbes*, 13(1), pp. 1–20. doi: 10.1080/19490976.2020.1869503.

Tap, J. et al. (2015) 'Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults', *Environmental Microbiology*, 17(12), pp. 4954–4964. doi: 10.1111/1462-2920.13006/SUPPINFO.

Tom Dieck, H. et al. (2021) 'A Synbiotic Formulation Comprising Bacillus subtilis DSM 32315 and L-Alanyl-L-Glutamine Improves Intestinal Butyrate Levels and Lipid Metabolism in Healthy Humans', *Nutrients*, 14(1), p. 143. doi: 10.3390/NU14010143/S1.

Venkataraman, A. et al. (2016) 'Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch', *Microbiome*, 4(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/S40168-016-0178-X/FIGURES/5.

Yang, H. J. et al. (2015) 'Fermenting soybeans with Bacillus licheniformis potentiates their capacity to improve cognitive function and glucose homeostasis in diabetic rats with experimental Alzheimer's type dementia', *European Journal of Nutrition*, 54(1), pp. 77–88. doi: 10.1007/s00394-014-0687-y.

Ye, L. et al. (2013) 'Highly efficient production of l-lactic acid from xylose by newly isolated Bacillus coagulans C106', *Bioresource Technology*, 132, pp. 38–44. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2013.01.011.

Zhao, L. et al. (2018) ‘Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes’, *Science*, 359(6380), pp. 1151–1156. doi: 10.1126/science.aao5774.

Table S1: Composition of the fermentation media used in fermenters.

	Fat-Enriched Medium ¹ (g/L)	Healthy Gut Model Medium ² (g/L)
Carbohydrates		
Arabinogalactan	0,8	2
Cellobiose	0,9	0
Fructose	0,5	0
Glucose	0,5	0
Guar gum	0,4	1
Inulin from chicory	0,4	1
Pectin (citrus)	0,8	2
Starch	4,4	4,4
Xylan	0,8	2
Lichenan	0,2	0,5
Proteins		
Casein acid hydrolysate	2	2
Peptone water	3,3	3,3
Yeast extract	3	4,5
Lipids		
Capric acid (C10:0)	0,3	0
Palmitic acid (C16:0)	1,5	0
Stearic acid (C18:0)	0,7	0
Oleic acid (C18:1)	1,8	0

Salts, other components		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,5
NaHCO ₃	1,5	1,5
NaCl	4,5	4,5
KCl	4,5	4,5
MgSO ₄ anhydrated	0,61	0,61
CaCl ₂ * ₂ H ₂ O	0,1	0,1
MnCl ₂ * ₄ H ₂ O	0,2	0,2
FeSO ₄ * ₇ H ₂ O	0,005	0,005
Mucin (Porcine gastric type III)	4	4
L-cysteine HCl	0,8	0,8
Hemin	0,05	0,05
Bile salts	1	0,4
Tween 80	1 mL	1 mL
Resazurin (0.025 g/100 mL)	4 mL	4 mL
Vitamin K1*	10 µL	10 L

* added after sterilisation

1: FEM was adapted from Agans et al., 2018.

2: HGMM was modified from Poeker et al. 2018, Liu et al., 2021

Figure S1: Relative abundance of microbial communities of fresh stools and RFM at the phylum (A) and species level (B), per donor

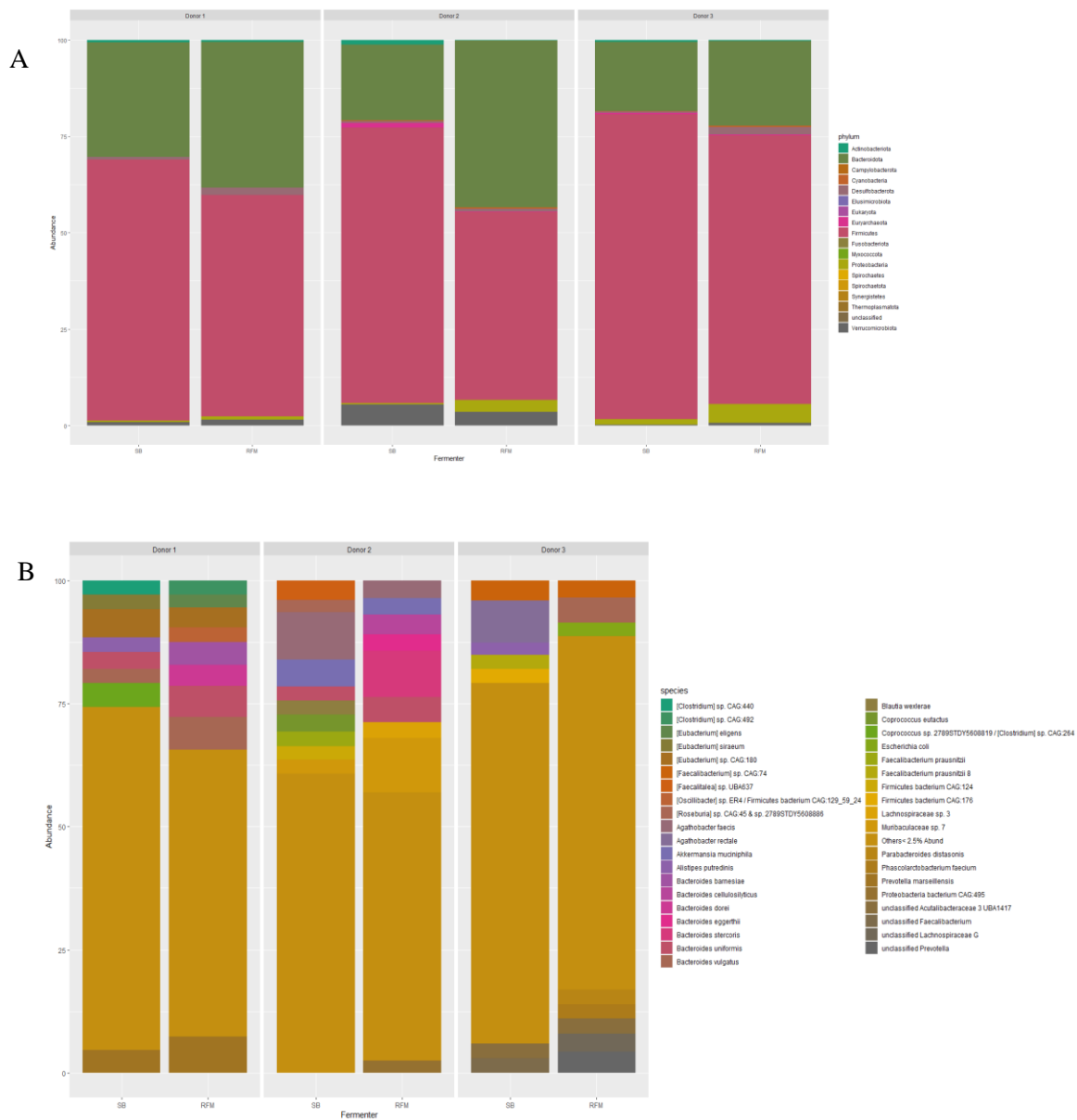


Figure S2: Total SCFAs production over the 3-weeks experiments for all three donors, with or without probiotic supplementation.

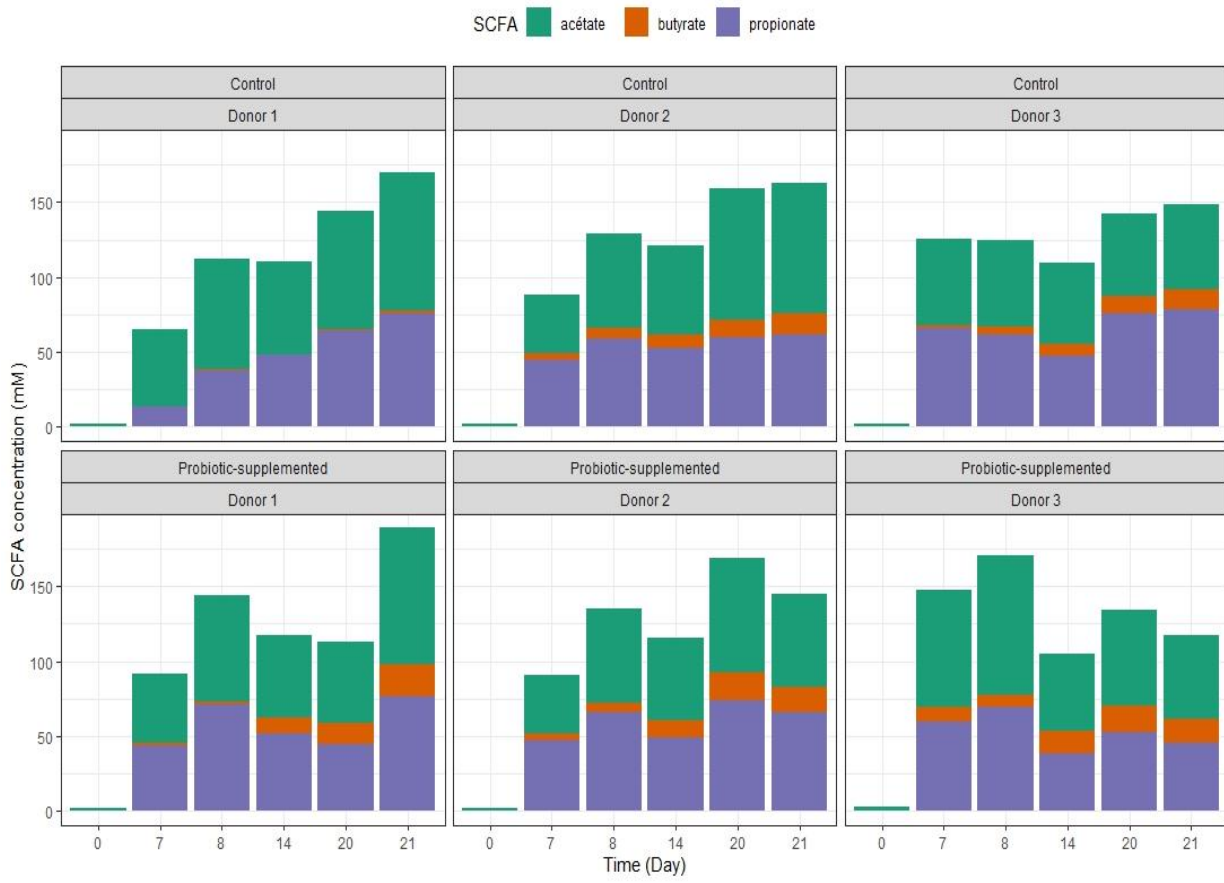


Figure S3: Relative abundance of microbial communities in fermenters at the phylum (A) and species levels (B), per donor



DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Le tractus gastro-intestinal humain est colonisé par des milliards de bactéries qui entretiennent une relation symbiotique avec leur hôte. La perturbation de l'équilibre des interactions microbiote intestinal-hôte joue un rôle prépondérant dans l'apparition de troubles fonctionnels intestinaux, voire de maladies inflammatoires ou métaboliques.

La composition du microbiote est influencée par notre alimentation, en particulier les fibres alimentaires présentes dans l'alimentation humaine comme les fruits, les légumes, les légumineuses et les céréales (Sonnenburg and Bäckhed, 2016). Contrairement au génome humain, les bactéries intestinales possèdent un large répertoire d'enzymes capables de décomposer les glucides alimentaires complexes en sucres de plus petite taille, notamment grâce aux glycoside hydrolases, polysaccharide lyases et carbohydre estérases. Les oses générés sont ensuite fermentés en métabolites intermédiaires, associés à la production d'AGCC. Les maladies métaboliques, telles que le diabète de type 2 ou l'obésité, sont parfois associées à une altération de la production d'AGCC et à une déplétion des membres bactériens producteurs d'AGCC et dégradant les fibres (Zhao *et al.*, 2018; Agus, Clément and Sokol, 2021). Les AGCC, tels que le butyrate, le propionate et l'acétate, sont des produits finaux de la fermentation microbienne impliqués dans une multitude de fonctions physiologiques. Ils participent au maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale, améliorent le métabolisme du glucose et des lipides, contrôlent les dépenses énergétiques et régulent le système immunitaire et les réponses inflammatoires (Agus, Clément and Sokol, 2021; Martin-Gallausiaux *et al.*, 2021). La modulation du microbiote intestinal par des probiotiques dégradant les fibres est une approche prometteuse pour restaurer l'homéostasie intestinale.

L'objectif principal de ce travail était d'identifier une souche candidate probiotique fibrolytique, et d'évaluer son impact, en association avec un apport de fibres complexes diversifiées, sur la composition et l'abondance des bactéries intestinales et des produits de fermentation. Pour cela, un modèle intestinal *in-vitro* simulant les conditions d'un microbiote intestinal « obèse » a été réfléchi au cours de cette thèse et mis en place pour étudier l'impact du probiotique sur ce microbiote intestinal dysbiosique et sa capacité fermentaire.

Mon travail de thèse a permis de répondre à ses objectifs. Dans un premier temps, un criblage fonctionnel en entonnoir d'une quarantaine de souches de *Bacillus* a permis de n'en retenir qu'une seule, appartenant à l'espèce *B. paralicheniformis*, et dont les activités hémicellulolytiques étaient les plus diversifiées et les plus élevées (Ngom et al., soumis à Sci. Rep.). Une étude préliminaire, qui constitue le **premier article** de ce manuscrit, nous avait permis de démontrer la capacité d'une souche de *B. paralicheniformis* à dégrader des fibres végétales complexes (Maski et al., 2021). Cette étude a combiné des méthodes de prédiction de fonctions *in-silico* et des études expérimentales, afin de déterminer l'aptitude de la souche à produire des enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de polysaccharides pariétaux. Ces polysaccharides sont des polymères constituant la cellulose, les hémicelluloses ou la pectine qui représentent plus de 90% des composants de la paroi végétale (Scheller and Ulvskov, 2010; Houston *et al.*, 2016). Il avait été montré, auparavant, que plusieurs espèces du genre *Bacillus* étaient capables de dégrader des polysaccharides constitutifs des fibres végétales (Stulke and Hillen, 2000; Kazeem *et al.*, 2017; Petrova, Petlichka and Petrov, 2020), bien que le nombre d'études fut très limité et n'incluait pas l'espèce *B. paralicheniformis*. Une connaissance détaillée des génomes de *Bacillus* a fourni un aperçu des enzymes impliquées dans la dégradation de la cellulose et de la lignocellulose. En particulier, l'annotation de séquences génomiques complètes des espèces *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis* et *B. siamensis* a révélé la présence de nombreux gènes codant pour des cellulases et hemicellulases (Borriss *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018; Petrova, Petlichka and Petrov, 2020). Chez *B. paralicheniformis*, une étude récente rapporte la caractérisation de bactéries, isolées de la mer rouge, productrices de cellulase. Le séquençage de leur génome a révélé la présence de dix orthologues de gènes de cellulase dans chacun des génomes de trois isolats (Fatani *et al.*, 2021). De plus, la présence de gènes de CAZymes est décrite à ce jour pour 14 souches de *B. paralicheniformis* dans la base de données CAZy (www.cazy.org), mais sans preuve de leur expression. Ainsi, notre deuxième étude, en démontrant des activités glycoside hydrolases variées chez *B. paralicheniformis* en présence de polysaccharides purifiés ou de fibres végétales naturelles, et leur régulation par les sources de carbone présentes dans le milieu extracellulaire, a été novatrice et a ouvert la voie à l'exploration du potentiel enzymatique de l'espèce *B. paralicheniformis* qui était jusque-là très peu étudiée. Les résultats obtenus sont décrits dans la **deuxième publication** intégrée à ce manuscrit (Ngom et al., soumis à Sci Rep). Sur 40 souches testées, 9 souches ont démontré une aptitude à dégrader différentes fibres purifiées ou naturelles. L'identification phylogénétique des 9 souches fibrolytiques, à travers le séquençage du gène de l'ADNr 16S, a confirmé que les bactéries testées appartiennent bien au genre

Bacillus et sont très proches de *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis*. L'analyse de la séquence du gène de l'ADNr 16S est la méthode la plus couramment utilisée pour établir des relations phylogénétiques bactériennes ; cependant, son utilité est limitée lorsque le pourcentage de similitude de séquences est élevé entre des espèces étroitement apparentées (Wang *et al.*, 2007). Et en effet, ces deux espèces de *Bacillus* partagent des séquences d'ADNr 16S identiques à 99% (Jeong *et al.*, 2018). Nous avons donc utilisé un fragment interne du gène de ménage *gyrB* pour discriminer *B. paralicheniformis* de *B. licheniformis*. Nos résultats confirment que la séquence partielle du gène *gyrB* peut être un outil utile et peu coûteux pour séparer les espèces. Des études précédentes avaient indiqué que le gène *gyrB* était un marqueur phylogénétique approprié pour les relations taxonomiques au niveau de l'espèce (La Duc *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2018). L'appartenance phylogénétique des souches a également été confirmée par MLST, et leur positionnement phylogénétique précisé par rapport à d'autres souches de *Bacillus* déjà publiées. Nous avons démontré que les schémas MLST développés par Madslein *et al.* (2012) et utilisés dans cette étude peuvent discriminer clairement *B. paralicheniformis* de *B. licheniformis*. En accord avec les études précédentes (De Clerck and De Vos, 2004; Madslien *et al.*, 2012; Dunlap *et al.*, 2015), nous validons la MLST comme technique robuste et accessible pour séparer *B. paralicheniformis* de *B. licheniformis*, et préciser les relations phylogénétiques entre les souches existantes et de nouveaux isolats.

Notre étude de criblage fonctionnel a démontré la capacité des 9 souches de *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis* à utiliser des fibres végétales complexes et purifiées pour leur croissance. Nous avons également montré que les souches de *B. paralicheniformis* cultivées dans des milieux de culture en présence de fibres végétales naturelles étaient capables de produire des enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de fibres telles que le lichenane, le xylane ou encore le xyloglucane. De façon intéressante, l'activité fibrolytique extracellulaire envers les fibres pré-citées était moindre voire absente chez *B. licheniformis* qui est aujourd'hui une espèce beaucoup plus étudiée et commercialement exploitée que *B. paralicheniformis*. Pour en savoir plus sur l'étendue du potentiel fibrolytique de cette dernière, nous avons exploré la présence des CAZymes dans le génome de 4 souches séquencées de *B. paralicheniformis* et d'une souche de *B. licheniformis* pour comparaison. Sans surprise, notre analyse a montré plus de familles de GH présentes chez les souches de *B. paralicheniformis* par rapport à *B. licheniformis*, et notamment plusieurs gènes de GH impliqués dans la dégradation des xylanes et du lichenane (GH11, GH16, GH 30_8 et GH8), absents chez *B. licheniformis*. Le potentiel fibrolytique de *B. paralicheniformis* pour la dégradation des fibres végétales complexes est donc

bien supérieur à celui de l'espèce *B. licheniformis*, ce qui renforce notre intérêt pour cette espèce.

Afin d'étudier l'expression de ces gènes dans des conditions de culture en présence de fibres végétales que nous retrouvons dans notre alimentation, nous avons sélectionné la souche *B. paralicheniformis* CCMM B969 qui présentait l'activité fibrolytique la plus élevée. Notre analyse a montré une synthèse différentielle des GH en fonction de la fibre présente dans le milieu de culture comme seule source de carbone. Nous retrouvons également une synthèse des GH impliquées dans la dégradation des hémicelluloses notamment les GH11, GH16 et GH30. Toutefois, leur abondance dans le milieu extracellulaire était dépendante de la nature de la fibre végétale, ce qui suggère une régulation de la synthèse des enzymes fibrolytiques de la souche CCMM B969 en fonction des substrats. L'ensemble de ces résultats nous a permis de **proposer la souche *B. paralicheniformis* CCMM B969 comme candidate probiotique fibrolytique** pour une étude d'impact sur le microbiote intestinal *in vitro*.

Cette souche candidate probiotique fibrolytique a alors été étudiée pour le risque de toxicité et son antibiorésistance, afin d'étayer ses propriétés de potentiel probiotique pour l'Homme. Nos tests d'innocuité *in vitro* et la recherche de gènes de toxicité et d'antibiorésistance *in silico*, dont les résultats sont synthétisés dans ce manuscrit (voir Résultats complémentaires de l'article 2), ont confirmé que cette souche pourrait être une candidate sûre pour une utilisation comme probiotique chez l'humain. L'espèce *B. paralicheniformis* a très récemment obtenu le statut QPS par l'EFSA, sous réserve de l'absence de toxicité et d'information génétique concernant la synthèse de bacitracine (Koutsoumanis *et al.*, 2021), un antibiotique naturellement produit par certaines espèces de *Bacillus* et potentiellement dangereux pour l'Homme s'il est utilisé de manière inappropriée, en dehors d'un usage topique par exemple. Cependant depuis janvier 2023, l'EFSA a publié une mise à jour concernant ce statut. *B. paralicheniformis* est maintenant recommandée pour le statut QPS sous réserve « d'absence de toxicité » et « d'absence de capacité à produire la bacitracine » (Koutsoumanis *et al.*, 2023). L'analyse génomique de la souche CCMM B969 montre la présence de gènes impliqués dans la synthèse de bacitracine, Cette information génétique est même une caractéristique propre à l'espèce *B. paralicheniformis*. Son absence d'expression devra donc être vérifiée afin de valider le statut QPS de la souche candidate probiotique. Si la production de bacitracine était, par contre, confirmée, il nous faudrait envisager soit de supprimer cette information génétique des souches de *B. paralicheniformis*, à l'aide d'outil de biologie moléculaire adapté, soit de sélectionner une

souche fibrolytique de *B. licheniformis* parmi les plus actives des CCMM pour poursuivre ce travail.

Enfin, la dernière partie de ce travail de thèse a nous a permis d'observer, en modèle *in vitro*, l'impact de la souche probiotique candidate fibrolytique de *B. paralicheniformis* sur la composition, la diversité et le métabolisme du microbiote intestinal de trois personnes en situation d'obésité, et de mettre en évidence une activité butyrogène augmentée en présence de la souche candidate. Ce travail fait l'objet de la **troisième publication** présentée dans ce manuscrit (Ngom et al., en préparation). Les intenses recherches sur le microbiote intestinal ces dernières années ont montré que la rupture de la symbiose microbiote-hôte pourrait être associée à la survenue de maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2. Cette rupture de l'équilibre, ou dysbiose, est la conséquence de plusieurs facteurs dont un régime alimentaire riche en gras et peut se traduire par une perte en richesse microbienne, et une altération de la production d'AGCC (Rabot *et al.*, 2010; Madsen *et al.*, 2017; van de Guchte, Blottière and Doré, 2018). A l'aune de ces observations, l'utilisation de probiotiques et la recherche de nouveaux candidats probiotiques représentent une stratégie très actuelle pour préserver voire restaurer la symbiose microbiote-hôte. En raison de la difficulté d'accès au contenu intestinal *in vivo*, et des considérations éthiques, les études se focalisent actuellement sur l'utilisation de modèles de fermentation *in vitro* pour simuler le tractus gastro-intestinal (Verhoeckx *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2022). Dans notre troisième publication, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de chemostat mimant l'environnement du colon distal, afin de tester l'impact de la souche candidate probiotique CCMM B969 sur le microbiote intestinal de trois personnes en situation d'obésité. Nos résultats ont montré que la souche candidate probiotique associée à un meilleur apport en fibres végétales augmentait la production de butyrate *in vitro* dans un modèle dysbiotique en comparaison avec le microbiote uniquement ré-équilibré par des fibres végétales. Cependant, au cours de cette étude, les analyses de la composition microbienne ont montré une diminution significative de l'alpha-diversité dans les échantillons prélevés en fermenteurs par rapport aux microbiotes purifiés ayant servi à inoculer les chemostats, ainsi qu'un changement dans la structure de la communauté microbienne comme le montre la bêta-diversité. Cette diminution de l'alpha-diversité, caractérisée par une perte de la richesse en Firmicutes, est observée dans une autre étude (Agans *et al.*, 2018) et est imputable au milieu de culture riche en gras ne permettant pas la résilience de certaines espèces pendant la durée du traitement (2 semaines). Une étude comparant sept essais randomisés contrôlés a montré

qu'aucun effet sur la β -diversité n'a été observé sur la composition du microbiote fécal après traitement avec un probiotique par rapport au contrôle (Kristensen *et al.*, 2016). Une modification de la β -diversité après traitement par un probiotique (*Lactobacillus paracasei* DG) n'a été observée que dans l'étude de Ferrario *et al.* (2014). Cependant, nos résultats indiquent que la souche candidate probiotique n'opère pas de changement profond dans la diversité microbienne. L'augmentation de la production de butyrate observée dans cette étude passerait donc potentiellement par la stimulation d'espèces productrices de butyrate telles que *Roseburia spp* ou encore *Eubacterium eligens*. Ces résultats sont cohérents avec de précédents travaux qui ont montré que d'autres espèces de *Bacillus* augmentent la production d'AGCC, dont le butyrate, et stimulent des espèces microbiennes bénéfiques particulières dont les espèces productrices de butyrate (Duysburgh *et al.*, 2019; Marzorati *et al.*, 2021; Tom Dieck *et al.*, 2021). Des essais cliniques menés avec des probiotiques de nouvelle génération tels que *Akkermansia muciniphila*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii* et *Eubacterium hallii* n'ont, eux, pas montré d'augmentation significative de butyrate (Perraudeau *et al.*, 2020) à partir de microbiotes d'individus diabétique (diabète de type 2). Notre étude représente donc la première étude qui démontre l'effet butyrogène de *B. paralicheniformis* sur les communautés bactériennes intestinales d'individus en situation d'obésité, et la modulation de certaines espèces productrices de butyrate. Les espèces de *Bacillus* représentent donc un nouveau réservoir de probiotiques potentiels, d'autant plus que des bactéries commensales du genre *Bacillus* existent déjà au sein du microbiote intestinal (Egan *et al.*, 2021). Les *Bacillus* attirent de plus en plus l'attention pour des problématiques de recherche liées à l'alimentation et à la santé humaine, grâce à leur capacité à sporuler et ainsi à survivre et à tolérer l'environnement hostile du tractus gastro-intestinal (Elshagabee *et al.*, 2017). *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *B. licheniformis* sont les espèces actuellement les plus utilisées en tant que probiotiques chez l'humain dans le marché mondial pour leurs effets bénéfiques sur la santé (McFarlin *et al.*, 2017; Catinean *et al.*, 2019; Sasaki *et al.*, 2020).

Il n'existe pas à ce jour de souches de *Bacillus paralicheniformis* proposées comme probiotiques chez l'humain. Ceci pourrait être expliqué, d'une part, par le fait que la description de cette espèce soit très récente (Dunlap *et al.*, 2015), et parfois confondue avec *B. licheniformis*. Certains probiotiques de *B. licheniformis* sont peut-être en réalité des souches de *B. paralicheniformis*. D'autre part, l'espèce *B. paralicheniformis* n'a obtenu le statut QPS qu'en Juillet 2021 (Koutsoumanis *et al.*, 2021). Il est important cependant de noter que les espèces de *Bacillus* probiotiques déjà sur le marché ne sont pas proposées pour leurs propriétés

fibrolytiques. A notre connaissance, notre équipe est la première à proposer une souche candidate fibrolytique appartenant à *B. paralicheniformis*, et à démontrer son activité bénéfique *in vitro*. Nous suggérons que, dans un contexte de maladie métabolique, caractérisé par une diminution des bactéries dégradant les fibres au sein du microbiote intestinal, notre candidat probiotique dégradant les fibres végétales complexes pourrait initier la dégradation des fibres alimentaires et libérer des oligosaccharides pour les dégradeurs secondaires producteurs d'AGCC, notamment le butyrate, bénéfiques pour la santé de l'hôte. Tom Dieck *et al* (2021) soulignent que les espèces de *Bacillus* ne sont pas elles-mêmes productrices de butyrate, mais semblent avoir des effets modulateurs indirects sur le microbiote intestinal, déclenchant la production de butyrate chez d'autres taxons. Les bactéries productrices de butyrate représentent un groupe fonctionnel, plutôt qu'un groupe phylogénétique cohérent, au sein de la communauté microbienne du colon humain (Louis and Flint, 2009). Ainsi, la souche CCMM B969 serait un « probiotique fonctionnel » et son effet bénéfique serait médié par la stimulation de membres bactériens avec des fonctions essentielles dans l'intestin.

Une des principales limites du modèle que nous avons utilisé est l'absence de compartiments reproduisant les différentes parties du colon et de l'intestin grêle. En effet, dans notre étude, nous n'avons pas tenu compte des différences physiologiques, notamment le pH, entre les différents segments du colon. Différents modèles *in vitro*, dont des modèles multi-compartimentaux ont été développés ces dernières années afin de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques de l'intestin et s'affranchir ainsi des modèles animaux (Van Den Abbeele *et al.*, 2010; Venema and Van Den Abbeele, 2013; Fehlbaum *et al.*, 2015). Le choix du modèle *in-vitro* est fait en fonction de la problématique de recherche. Ce faisant, pour une étude comparant le traitement d'un probiotique à différentes doses avec un contrôle, le modèle mono-compartimental peut-être suffisant (Cordonnier *et al.*, 2015; Pham and Mohajeri, 2018). De plus, le modèle *in vitro* utilisé dans cette étude est dépourvu de cellules épithéliales ainsi que de cellules immunitaires hôtes qui possèdent la capacité d'interagir avec le microbiote intestinal pour réguler divers processus physiologiques. L'impact des métabolites produits dans le milieu extracellulaire des fermenteurs avec ou sans la souche candidate probiotique sur l'expression des gènes codant pour les hormones PYY et GLP a été évalué sur des modèles cellulaires *in vitro* disponibles dans notre équipe. Ces résultats n'étant que partiels avec un nombre insuffisant de réplicats, ils ne sont pas présentés dans ce manuscrit. Toutefois, notre objectif n'était pas de produire une copie exacte de l'intestin distal humain *in vitro*, mais nous avons plutôt cherché à cultiver des communautés stables et diverses, représentatives d'un

écosystème intestinal perturbé, convenant pour une étude de l'impact d'un probiotique sur les communautés microbiennes. Installer un modèle de microbiote dysbiotique obèse *in vitro* a été un défi majeur dans cette étude, d'autant plus que ce modèle est encore très peu répandu dans le monde. Des améliorations pourront y être apportées pour se rapprocher plus encore du microbiote originel pendant l'expérimentation. Il serait également intéressant de mener notre étude sur un temps plus long, afin de comparer l'impact de la souche candidate probiotique sur la composition du microbiote et les métabolites au-delà de 2 semaines de traitement par rapport au contrôle.

En conclusion et perspectives, cette thèse comporte une succession d'études avec l'objectif de proposer une souche candidate probiotique fibrolytique pour l'Homme, dans un contexte de maladie métabolique. Nous avons exploré, dans un premier temps, le potentiel fibrolytique de plusieurs souches de *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis*. Nos résultats ont montré que les souches de *B. paralicheniformis* ont un fort potentiel pour dégrader des fibres végétales, notamment celles que nous pouvons retrouver dans notre alimentation. Cette première étape de l'étude nous a permis de sélectionner une souche candidate probiotique pour une étude de fermentation *in-vitro* avec les microbiotes intestinaux de trois donneurs en situation d'obésité.

En utilisant un modèle de fermentation *in-vitro*, nous avons montré qu'une souche candidate probiotique fibrolytique appartenant à *B. paralicheniformis* augmente la production de butyrate *in vitro*. Cette souche candidate, couplée à un apport normal de fibres végétales, stimule la croissance de certaines espèces bactériennes comme *Roseburia spp* et *E. eligens* avec des fonctions bénéfiques pour la santé, sans modifier la structure globale de la communauté microbienne. Nos résultats suggèrent que dans un contexte de maladie métabolique telle que l'obésité, l'augmentation de la prise de fibres végétales associée à notre souche candidate probiotique pourrait améliorer le métabolisme intestinal en augmentant la production de butyrate. L'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse ouvre des perspectives pour l'exploration de futurs probiotiques fibrolytiques pour restaurer les fonctions majeures de dégradation des fibres et de production de métabolites fermentaires déplétées dans les contextes dysbiosiques. De plus, ils permettent d'envisager le développement de « synbiotiques » composés de souches de *B. paralicheniformis* et de fibres végétales sélectionnées, pour le traitement de maladies métaboliques. L'étude du dialogue avec les cellules de l'intestin de l'hôte, notamment les cellules entéro-endocrines, devra être complétée afin de mieux comprendre les interactions du probiotique à l'échelle de l'hôte. Enfin, ces résultats jettent

également les bases de l'utilisation des modèles dysbiotiques comme outils d'études précliniques adaptés pour le criblage de nouveaux probiotiques, prébiotiques ou synbiotiques. Enfin, ils ont permis de proposer une souche candidate fibrolytique de ***B. paralicheniformis*** pour une future étude clinique incluant des individus en situation d'obésité et métaboliquement malades, qui permettra de prendre en compte l'ensemble des paramètres physiologiques de l'hôte.

Références

Aanniz, T. *et al.* (2015) 'Thermophilic bacteria in moroccan hot springs, salt marshes and desert soils', *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), pp. 443–453. doi: 10.1590/S1517-838246220140219.

Van Den Abbeele, P. *et al.* (2010) 'Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for bacteroidetes and Clostridium cluster IX', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), pp. 5237–5246. doi: 10.1128/AEM.00759-10.

Van Den Abbeele, P. *et al.* (2013) 'Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model', *ISME Journal*, 7(5), pp. 949–961. doi: 10.1038/ismej.2012.158.

Adimpong, D. B. *et al.* (2012) 'Antimicrobial susceptibility of bacillus strains isolated from primary starters for african traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis', *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), pp. 7903–7914. doi: 10.1128/AEM.00730-12.

Agans, R. *et al.* (2018) 'Dietary fatty acids sustain the growth of the human gut microbiota', *Applied and Environmental Microbiology*, 84(21). doi: 10.1128/AEM.01525-18.

Agersø, Y. *et al.* (2019) 'Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome', *PLoS ONE*, 14(1). doi: 10.1371/journal.pone.0210363.

Agus, A., Clément, K. and Sokol, H. (2021) 'Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders', *Gut*. BMJ Publishing Group, pp. 1174–1182. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323071.

Alcock, B. P. *et al.* (2020) 'CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database', *Nucleic Acids Research*, 48(D1), pp. D517–D525. doi: 10.1093/nar/gkz935.

Almeida, A. *et al.* (2019) 'A new genomic blueprint of the human gut microbiota', *Nature*, 568(7753), pp. 499–504. doi: 10.1038/s41586-019-0965-1.

Almeida, D. *et al.* (2019) 'Evolving trends in next-generation probiotics: a 5W1H perspective', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), pp. 1–14. doi:

10.1080/10408398.2019.1599812.

Anaya-Loyola, M. A. *et al.* (2019) ‘Bacillus coagulans GBI-30, 6068 decreases upper respiratory and gastrointestinal tract symptoms in healthy Mexican scholar-aged children by modulating immune-related proteins’, *Food Research International*, 125, p. 108567. doi: 10.1016/J.FOODRES.2019.108567.

Andreoletti, O. *et al.* (2015) ‘Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. 2: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2015’, *EFSA Journal*, 13(6). doi: 10.2903/j.efsa.2015.4138.

Angelin, J. and Kavitha, M. (2020) ‘Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential’, *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, pp. 853–865. doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.190.

Arumugam, M. *et al.* (2011) ‘Enterotypes of the human gut microbiome’, *Nature* 2011 473:7346, 473(7346), pp. 174–180. doi: 10.1038/nature09944.

Bäckhed, F. *et al.* (2015) ‘Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life’, *Cell Host and Microbe*, 17(5), pp. 690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.

Baião, R. *et al.* (2022) ‘Multispecies probiotic administration reduces emotional salience and improves mood in subjects with moderate depression: a randomised, double-blind, placebo-controlled study’, *Psychological Medicine*, pp. 1–11. doi: 10.1017/S003329172100550X.

Banerjee, S., Schlaeppli, K. and van der Heijden, M. G. A. (2018a) ‘Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 567–576. doi: 10.1038/s41579-018-0024-1.

Banerjee, S., Schlaeppli, K. and van der Heijden, M. G. A. (2018b) ‘Reply to “Can we predict microbial keystones?”’, *Nature Reviews Microbiology* 2018 17:3, 17(3), pp. 194–194. doi: 10.1038/s41579-018-0133-x.

Bankevich, A. *et al.* (2012) ‘SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing’, *Journal of Computational Biology*, 19(5), pp. 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021.

Bary, A. de (1879) ‘DIE ERSCHEINUNG DER SYMBIOSE’, in *Die Erscheinung der Symbiose*. De Gruyter, pp. 5–30. doi: 10.1515/9783111471839-002.

- Bazin, T., Chiu, L. and Pradeu, T. (2022) 'Host-Microbiota Co-immunity: An Intimate Relationship That Goes Beyond Protection', *Philosophy, Theory, and Practice in Biology*, 14(0). doi: 10.3998/ptpbio.2097.
- Beam, A., Clinger, E. and Hao, L. (2021) 'Effect of diet and dietary components on the composition of the gut microbiota', *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 2795. doi: 10.3390/nu13082795.
- Beladjal, L. *et al.* (2018) 'Life from the ashes: survival of dry bacterial spores after very high temperature exposure', *Extremophiles*. doi: 10.1007/s00792-018-1035-6.
- Belda, E. *et al.* (2022) 'Impairment of gut microbial biotin metabolism and host biotin status in severe obesity: effect of biotin and prebiotic supplementation on improved metabolism', *Gut*, 71(12), p. gutjnl-2021-325753. doi: 10.1136/GUTJNL-2021-325753.
- Belouah, I. *et al.* (2019) 'Peptide filtering differently affects the performances of XIC-based quantification methods', *Journal of Proteomics*, 193, pp. 131–141. doi: 10.1016/j.jprot.2018.10.003.
- Belzer, C. *et al.* (2017) 'Microbial metabolic networks at the mucus layer lead to diet-independent butyrate and vitamin B12 production by intestinal symbionts', *mBio*, 8(5). doi: 10.1128/mBio.00770-17.
- Belzer, C. and De Vos, W. M. (2012) 'Microbes inside—from diversity to function: the case of Akkermansia', *The ISME Journal 2012 6:8*, 6(8), pp. 1449–1458. doi: 10.1038/ismej.2012.6.
- Benedetti, M. *et al.* (2019) 'Green production and biotechnological applications of cellwall lytic enzymes', *Applied Sciences (Switzerland)*. MDPI AG, p. 5012. doi: 10.3390/app9235012.
- Berrada, I. *et al.* (2012) 'Diversity of culturable moderately halophilic and halotolerant bacteria in a marsh and two salterns a protected ecosystem of Lower Loukkos (Morocco)', *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), pp. 2419–2434. doi: 10.5897/.
- den Besten, H. M. W. *et al.* (2017) 'Two complementary approaches to quantify variability in heat resistance of spores of Bacillus subtilis', *International Journal of Food Microbiology*, 253, pp. 48–53. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.014.
- Biely, P., Singh, S. and Puchart, V. (2016) 'Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., pp. 1260–1274. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.09.001.

- Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014) 'Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data', *Bioinformatics*, 30(15), pp. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Borowsky, J. *et al.* (2021) 'Association of *Fusobacterium nucleatum* with specific T-cell subsets in the colorectal carcinoma microenvironment', *Clinical Cancer Research*, 27(10), pp. 2816–2826. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4009.
- Borriess, R. *et al.* (2011) 'Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7 T and FZB42 T: A proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete gen', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(8), pp. 1786–1801. doi: 10.1099/ijs.0.023267-0.
- Bouchaou, L. *et al.* (2017) 'The origin of geothermal waters in Morocco: Multiple isotope tracers for delineating sources of water-rock interactions', *Applied Geochemistry*, 84, pp. 244–253. doi: 10.1016/j.apgeochem.2017.07.004.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Bridier, A., Meylheuc, T. and Briandet, R. (2013) 'Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM)', *Micron*, 48, pp. 65–69. doi: 10.1016/j.micron.2013.02.013.
- Brodkorb, A. *et al.* (2019) 'INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature Protocols*, 14(4), pp. 991–1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.
- Bunesova, V., Lacroix, C. and Schwab, C. (2018) 'Mucin Cross-Feeding of Infant Bifidobacteria and *Eubacterium hallii*', *Microbial Ecology*, 75(1), pp. 228–238. doi: 10.1007/s00248-017-1037-4.
- Burkitt, D. P. (1973) 'Diseases of the alimentary tract and western diets.', *Pathologia et microbiologia*, 39(3), pp. 177–186. doi: 10.1159/000162646.
- Burz, S. D. *et al.* (2019) 'A Guide for Ex Vivo Handling and Storage of Stool Samples Intended for Fecal Microbiota Transplantation', *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), pp. 1–16. doi: 10.1038/s41598-019-45173-4.
- Byndloss, M. X. and Bäumlner, A. J. (2018) 'The germ-organ theory of non-communicable

diseases’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 103–110. doi: 10.1038/nrmicro.2017.158.

Caballero-Flores, G., Pickard, J. M. and Núñez, G. (2022) ‘Microbiota-mediated colonization resistance: mechanisms and regulation’, *Nature Reviews Microbiology* 2022, pp. 1–14. doi: 10.1038/s41579-022-00833-7.

Cani, P. D. (2017) ‘Gut microbiota-at the intersection of everything?’, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, pp. 321–322. doi: 10.1038/nrgastro.2017.54.

Cani, P. D. *et al.* (2019) ‘Microbial regulation of organismal energy homeostasis’, *Nature Metabolism*. Nature Publishing Group, pp. 34–46. doi: 10.1038/s42255-018-0017-4.

Cani, P. D. and Everard, A. (2014) ‘*Akkermansia muciniphila* - Une nouvelle cible pour contrôler l’obésité, le diabète de type 2 et l’inflammation ?’, *médecine/sciences*, 30(02), pp. 125–127. doi: 10.1051/MEDSCI/20143002003.

Cani, P. D. and de Vos, W. M. (2017) ‘Next-generation beneficial microbes: The case of *Akkermansia muciniphila*’, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A., p. 1765. doi: 10.3389/fmicb.2017.01765.

de Castro Soares, G. G. *et al.* (2017) ‘Sporelated *Bacillus* as alternative treatment for diarrhea of hospitalized adult patients under enteral nutrition: A pilot randomized controlled study’, *Clinical Nutrition ESPEN*, 22, pp. 13–18. doi: 10.1016/J.CLNESP.2017.08.006.

Catinean, A. *et al.* (2019) ‘*Bacillus* spp. Spores—A Promising Treatment Option for Patients with Irritable Bowel Syndrome’, *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 1968, 11(9), p. 1968. doi: 10.3390/NU11091968.

Chamignon, C. *et al.* (2020) ‘Evaluation of the probiotic properties and the capacity to form biofilms of various lactobacillus strains’, *Microorganisms*, 8(7), pp. 1–15. doi: 10.3390/microorganisms8071053.

Chassard, C. *et al.* (2012) ‘Functional dysbiosis within the gut microbiota of patients with constipated-irritable bowel syndrome’, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 35(7), pp. 828–838. doi: 10.1111/j.1365-2036.2012.05007.x.

Chassard, C. *et al.* (2012) ‘*Ruminococcus champanellensis* sp. nov., a cellulose-degrading bacterium from human gut microbiota’, *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology, 62(1), pp. 138–143. doi: 10.1099/ij.s.0.027375-0.

Le Chatelier, E. *et al.* (2013) ‘Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers’, *Nature*, 500(7464), pp. 541–546. doi: 10.1038/nature12506.

Chaumeil, P. A. *et al.* (2020) ‘GTDB-Tk: A toolkit to classify genomes with the genome taxonomy database’, *Bioinformatics*, 36(6), pp. 1925–1927. doi: 10.1093/bioinformatics/btz848.

Chen, C. C. *et al.* (2010) ‘Probiotics have clinical, microbiologic, and immunologic efficacy in acute infectious diarrhea’, *Pediatric Infectious Disease Journal*, 29(2), pp. 135–138. doi: 10.1097/INF.0b013e3181b530bf.

Chen, L. *et al.* (2018) ‘Comparative genome analysis of *Bacillus velezensis* reveals a potential for degrading lignocellulosic biomass’, *3 Biotech*, 8(5), p. 253. doi: 10.1007/s13205-018-1270-7.

Cheng, X. *et al.* (2020) ‘A review: Roles of carbohydrates in human diseases through regulation of imbalanced intestinal microbiota’, *Journal of Functional Foods*. Elsevier, p. 104197. doi: 10.1016/j.jff.2020.104197.

Cherbuy, C. *et al.* (2019) ‘Modulation of the caecal gut microbiota of mice by dietary supplement containing resistant starch: Impact is donor-dependent’, *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), p. 1234. doi: 10.3389/fmicb.2019.01234.

Chokesajjawatee, N. *et al.* (2020) ‘Safety Assessment of a Nham Starter Culture *Lactobacillus plantarum* BCC9546 via Whole-genome Analysis’, *Scientific Reports 2020 10:1*, 10(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-020-66857-2.

Chun, B. H. *et al.* (2019) ‘Genomic and metabolic features of the *Bacillus amyloliquefaciens* group— *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, and *B. siamensis*— revealed by pan-genome analysis’, *Food Microbiology*, 77, pp. 146–157. doi: 10.1016/j.fm.2018.09.001.

Cidu, R. and Bahaj, S. (2000) ‘Geochemistry of thermal waters from Morocco’, *Geothermics*, 29(3), pp. 407–430. doi: 10.1016/S0375-6505(00)00007-9.

Clark, H. (2019) ‘Culturing anaerobes’, *Nature Research 2019*, 163(June), p. 6257. Available at: <https://www.nature.com/articles/d42859-019-00007-1> (Accessed: 23 September 2022).

Claus, D. and Berkeley, R. C. W. (1986) ‘Genus *Bacillus* Cohn 1872, 174 AL’, in *Bergeys*

Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams & Wilkins Co., pp. 1105–1139. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10011436103/> (Accessed: 2 June 2018).

De Clerck, E. and De Vos, P. (2004) ‘Genotypic diversity among *Bacillus licheniformis* strains from various sources’, *FEMS Microbiology Letters*, 231(1), pp. 91–98. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00935-2.

Conversa, G. *et al.* (2022) ‘Peeling affects the nutritional properties of carrot genotypes’, *Foods*, 11(1), p. 45. doi: 10.3390/FOODS11010045/S1.

Cordonnier, C. *et al.* (2015) ‘Dynamic in vitro models of the human gastrointestinal tract as relevant tools to assess the survival of probiotic strains and their interactions with gut microbiota’, *Microorganisms*, 3(4), pp. 725–745. doi: 10.3390/microorganisms3040725.

Costea, P. I. *et al.* (2017) ‘Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition’, *Nature Microbiology*, 3(1), pp. 8–16. doi: 10.1038/s41564-017-0072-8.

Cotillard, A. *et al.* (2013) ‘Dietary intervention impact on gut microbial gene richness’, *Nature* 2013 500:7464, 500(7464), pp. 585–588. doi: 10.1038/nature12480.

Cottee-Jones, H. E. W. and Whittaker, R. J. (2012) ‘perspective: The keystone species concept: a critical appraisal’, *Frontiers of Biogeography*, 4(3). doi: 10.21425/f5fbg12533.

Cronin, P. *et al.* (2021) ‘Dietary fibre modulates the gut microbiota’, *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 1655. doi: 10.3390/nu13051655.

Cryan, J. F. *et al.* (2019) ‘The microbiota-gut-brain axis’, *Physiological Reviews*, 99(4), pp. 1877–2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018.

Cui, C. *et al.* (2013) ‘Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism’, *Genetics and Molecular Research*, 12(2), pp. 1766–1776. doi: 10.4238/2013.May.23.1.

Cui, J. *et al.* (2019) ‘Dietary Fibers from Fruits and Vegetables and Their Health Benefits via Modulation of Gut Microbiota’, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1514–1532. doi: 10.1111/1541-4337.12489.

Cutting, S. M. (2011) ‘*Bacillus* probiotics’, *Food Microbiology*, 28(2), pp. 214–220. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.007.

DAS, B. and Nair, G. B. (2019) ‘Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health

and disease’, *Journal of biosciences*. Springer, pp. 1–8. doi: 10.1007/s12038-019-9926-y.

Datta, S. *et al.* (2020) ‘Genome Comparison Identifies Different *Bacillus* Species in a Bast Fibre-Retting Bacterial Consortium and Provides Insights into Pectin Degrading Genes’, *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1–15. doi: 10.1038/s41598-020-65228-1.

Deehan, E. C. *et al.* (2017) ‘Modulation of the Gastrointestinal Microbiome with Nondigestible Fermentable Carbohydrates To Improve Human Health’, *Microbiology Spectrum*, 5(5). doi: 10.1128/microbiolspec.bad-0019-2017.

Depommier, C. *et al.* (2019) ‘Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study’, *Nature Medicine*, 25(7), pp. 1096–1103. doi: 10.1038/s41591-019-0495-2.

Derrien, M. *et al.* (2004) ‘*Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), pp. 1469–1476. doi: 10.1099/ij.s.0.02873-0.

Derrien, M. *et al.* (2011) ‘Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*’, *Frontiers in Microbiology*, 2(AUG), p. 166. doi: 10.3389/FMICB.2011.00166/BIBTEX.

Derrien, M., Belzer, C. and de Vos, W. M. (2017) ‘*Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions’, *Microbial Pathogenesis*. Academic Press, pp. 171–181. doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005.

Despres, J. *et al.* (2016) ‘Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level’, *BMC Genomics*, 17(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12864-016-2680-8.

Dhillon, G. S., Kaur, S. and Brar, S. K. (2013) ‘Perspective of apple processing wastes as low-cost substrates for bioproduction of high value products: A review’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, pp. 789–805. doi: 10.1016/j.rser.2013.06.046.

Dominguez-Bello, M. G. *et al.* (2019) ‘Role of the microbiome in human development’, *Gut*, 68(6), pp. 1108–1114. doi: 10.1136/GUTJNL-2018-317503.

Doré, J. *et al.* (2017) ‘Microbiote intestinale : qu’en attendre au plan physiologique et thérapeutique ?’, *Therapies*, 72(1), pp. 1–19. doi: 10.1016/J.THERAP.2017.01.001.

- Doré, J. and Blottière, H. (2015) 'The influence of diet on the gut microbiota and its consequences for health', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Current Trends, pp. 195–199. doi: 10.1016/j.copbio.2015.01.002.
- Drula, E. *et al.* (2022) 'The carbohydrate-active enzyme database: functions and literature', *Nucleic Acids Research*, 50(D1), pp. D571–D577. doi: 10.1093/NAR/GKAB1045.
- Du, Y. *et al.* (2019) 'Comparative genomic analysis of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30 with its closely related species reveals an evolutionary relationship between *B. paralicheniformis* and *B. licheniformis*', *BMC Genomics*, 20(1), p. 283. doi: 10.1186/s12864-019-5646-9.
- La Duc, M. T. *et al.* (2004) 'gyrB as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group', *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), pp. 383–394. doi: 10.1016/j.mimet.2003.11.004.
- Duncan, S. H. *et al.* (2002) 'Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), pp. 2141–2146. doi: 10.1099/00207713-52-6-2141/CITE/REFWORKS.
- Duncan, S. H., Louis, P. and Flint, H. J. (2004) 'Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), pp. 5810–5817. doi: 10.1128/AEM.70.10.5810-5817.2004.
- Dunlap, C. A. *et al.* (2015) '*Bacillus paralicheniformis* sp. Nov., isolated from fermented soybean paste', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(10), pp. 3487–3492. doi: 10.1099/ijsem.0.000441.
- Dunlap, C. A. (2015) 'The status of the species *Bacillus aerius*. Request for an opinion', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(7), p. 2341. doi: 10.1099/ijse.0.000271.
- Dupont, D. *et al.* (2019) 'Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality?', *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(10), pp. 1546–1562. doi: 10.1080/10408398.2017.1421900.
- Duysburgh, C. *et al.* (2019) 'A synbiotic concept containing spore-forming *Bacillus* strains and a prebiotic fiber blend consistently enhanced metabolic activity by modulation of the gut

microbiome in vitro’, *International Journal of Pharmaceutics*: X, 1, p. 100021. doi: 10.1016/J.IJPX.2019.100021.

van Dyk, J. S. *et al.* (2010) ‘Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1’, *Enzyme and Microbial Technology*, 47(3), pp. 112–118. doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.05.004.

Dzidic, M. *et al.* (2018) ‘Gut Microbiota and Mucosal Immunity in the Neonate’, *Medical Sciences*, 6(3), p. 56. doi: 10.3390/medsci6030056.

EFSA (2012) ‘Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance’, *EFSA Journal*, 10(6). doi: 10.2903/j.efsa.2012.2740.

Egan, M. *et al.* (2021) ‘The Sporobiota of the Human Gut’, *Gut Microbes*. Taylor & Francis, pp. 1–17. doi: 10.1080/19490976.2020.1863134.

Elshagabee, F. M. F. *et al.* (2017) ‘*Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives’, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers, p. 1490. doi: 10.3389/fmicb.2017.01490.

Everard, A. *et al.* (2011) ‘Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice’, *Diabetes*, 60(11), pp. 2775–2786. doi: 10.2337/db11-0227.

Everard, A. *et al.* (2013) ‘Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), pp. 9066–9071. doi: 10.1073/pnas.1219451110.

Fakhry, S. *et al.* (2008) ‘Characterization of spore forming Bacilli isolated from the human gastrointestinal tract’, *Journal of Applied Microbiology*, 105(6), pp. 2178–2186. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03934.x.

Fan, B. *et al.* (2017) ‘*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex’, *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 22. doi: 10.3389/fmicb.2017.00022.

Fan, P. *et al.* (2020) ‘Host genetic effects upon the early gut microbiota in a bovine model with graduated spectrum of genetic variation’, *ISME Journal*, 14(1), pp. 302–317. doi: 10.1038/s41396-019-0529-2.

FAO/WHO (2002) ‘Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture

Organization of the United Nations and World Health Organization Group Report.(London Ontario, Canada)', *FAO Food and Nutrition Paper 85*.

Fatani, S. *et al.* (2021) 'Genome sequencing and identification of cellulase genes in *Bacillus paralicheniformis* strains from the Red Sea', *BMC Microbiology*, 21(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12866-021-02316-w.

Fehlbaum, S. *et al.* (2015) 'Design and investigation of PolyFermS in vitro continuous fermentation models inoculated with immobilized fecal microbiota mimicking the elderly colon', *PLoS ONE*, 10(11), p. e0142793. doi: 10.1371/journal.pone.0142793.

Fehlbaum, S. *et al.* (2018) 'In Vitro Fermentation of Selected Prebiotics and Their Effects on the Composition and Activity of the Adult Gut Microbiota', *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 3097*, 19(10), p. 3097. doi: 10.3390/IJMS19103097.

Ferrario, C. *et al.* (2014) 'Modulation of fecal clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults', *Journal of Nutrition*, 144(11), pp. 1787–1796. doi: 10.3945/jn.114.197723.

Filip, M. *et al.* (2016) 'Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC-RI optimized method', *Food Chemistry*, 199, pp. 653–659. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.12.060.

De Filippo, C. *et al.* (2010) 'Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33), pp. 14691–14696. doi: 10.1073/PNAS.1005963107.

Flint, H. J. *et al.* (2012) 'Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut', *Gut Microbes*. Taylor & Francis, pp. 289–306. doi: 10.4161/gmic.19897.

Fu, L. *et al.* (2017) 'Bifidobacterium infantis potentially alleviates shrimp tropomyosin-induced allergy by tolerogenic dendritic cell-dependent induction of regulatory T cells and alterations in gut microbiota', *Frontiers in Immunology*, 8(NOV), p. 1536. doi: 10.3389/fimmu.2017.01536.

Fuller, R. (1989) 'Probiotics in man and animals', *Journal of Applied Bacteriology*, pp. 365–378. doi: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x.

Gaillard, R. *et al.* (2013) 'Risk factors and outcomes of maternal obesity and excessive weight

- gain during pregnancy', *Obesity*, 21(5), pp. 1046–1055. doi: 10.1002/oby.20088.
- Gao, T. *et al.* (2012) 'L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1', *Bioresource Technology*, 121, pp. 105–110. doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.108.
- Gareau, M. G., Sherman, P. M. and Walker, W. A. (2010) 'Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7(9), pp. 503–514. doi: 10.1038/nrgastro.2010.117.
- Ghosh, T. S. *et al.* (2020) 'Mediterranean diet intervention alters the gut microbiome in older people reducing frailty and improving health status: The NU-AGE 1-year dietary intervention across five European countries', *Gut*, 69(7), pp. 1218–1228. doi: 10.1136/gutjnl-2019-319654.
- Gibson, G. R. *et al.* (2017) 'Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, pp. 491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- Gill, S. K. *et al.* (2021) 'Dietary fibre in gastrointestinal health and disease', *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, pp. 101–116. doi: 10.1038/s41575-020-00375-4.
- Gong, G. *et al.* (2017) 'Complete genome sequence of *Bacillus* sp. 275, producing extracellular cellulolytic, xylanolytic and ligninolytic enzymes', *Journal of Biotechnology*, 254, pp. 59–62. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.05.021.
- Van de Guchte, M. *et al.* (2020) 'Alternative stable states in the intestinal ecosystem: proof of concept in a rat model and a perspective of therapeutic implications', *Microbiome*, 8(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/S40168-020-00933-7/FIGURES/7.
- van de Guchte, M., Blottière, H. M. and Doré, J. (2018) 'Humans as holobionts: implications for prevention and therapy', *Microbiome*. NLM (Medline), p. 81. doi: 10.1186/s40168-018-0466-8.
- Gurevich, A. *et al.* (2013) 'QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies', *Bioinformatics*, 29(8), pp. 1072–1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Habil, N. *et al.* (2014) 'Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human β -defensin-2: Dependence on inflammatory cytokines', *Beneficial Microbes*, 5(4), pp. 483–495. doi: 10.3920/BM2013.0061.

Hamer, H. M. *et al.* (2008) ‘Review article: The role of butyrate on colonic function’, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 104–119. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x.

Henry, C. *et al.* (2022) ‘Modern Metaproteomics: A Unique Tool to Characterize the Active Microbiome in Health and Diseases, and Pave the Road towards New Biomarkers—Example of Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis Flare-Ups’, *Cells*, 11(8), p. 1340. doi: 10.3390/cells11081340.

Hill, C. *et al.* (2014) ‘The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic’, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), pp. 506–514. doi: 10.1038/nrgastro.2014.66.

Holmes, Z. C. *et al.* (2020) ‘Short-chain fatty acid production by gut microbiota from children with obesity differs according to prebiotic choice and bacterial community composition’, *mBio*, 11(4), pp. 1–15. doi: 10.1128/MBIO.00914-20/SUPPL_FILE/MBIO.00914-20-ST003.DOCX.

Holscher, H. D. (2017) ‘Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota’, <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>, 8(2), pp. 172–184. doi: 10.1080/19490976.2017.1290756.

Holscher, H. D. (2021) ‘The gut microbiome in feast and famine’, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2021 18:11, 18(11), pp. 749–750. doi: 10.1038/s41575-021-00514-5.

Hong, H. A., Khaneja, R., *et al.* (2009) ‘Bacillus subtilis isolated from the human gastrointestinal tract’, *Research in Microbiology*, 160(2), pp. 134–143. doi: 10.1016/j.resmic.2008.11.002.

Hong, H. A., To, E., *et al.* (2009) ‘Defining the natural habitat of Bacillus spore-formers’, *Research in Microbiology*, 160(6), pp. 375–379. doi: 10.1016/j.resmic.2009.06.006.

Houfani, A. A. *et al.* (2020) ‘Insights from enzymatic degradation of cellulose and hemicellulose to fermentable sugars– a review’, *Biomass and Bioenergy*. Elsevier Ltd, p. 105481. doi: 10.1016/j.biombioe.2020.105481.

Houston, K. *et al.* (2016) ‘The Plant Cell Wall: A Complex and Dynamic Structure As Revealed by the Responses of Genes under Stress Conditions.’, *Frontiers in plant science*, 7, p. 984. doi: 10.3389/fpls.2016.00984.

- Huerta-Cepas, J. *et al.* (2017) ‘Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper’, *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), pp. 2115–2122. doi: 10.1093/molbev/msx148.
- Iacobini, C. *et al.* (2019) ‘Metabolically healthy versus metabolically unhealthy obesity’, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders, pp. 51–60. doi: 10.1016/j.metabol.2018.11.009.
- Ishaque, S. M. *et al.* (2018) ‘A randomized placebo-controlled clinical trial of a multi-strain probiotic formulation (Bio-Kult®) in the management of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome’, *BMC Gastroenterology*, 18(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/S12876-018-0788-9/FIGURES/3.
- Jain, C. *et al.* (2017) ‘High-throughput ANI Analysis of 90K Prokaryotic Genomes Reveals Clear Species Boundaries’, *bioRxiv*, p. 225342. doi: 10.1101/225342.
- Jalanka, J. *et al.* (2016) ‘Long-term effects on luminal and mucosal microbiota and commonly acquired taxa in faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection’, *BMC Medicine*, 14(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/S12916-016-0698-Z/FIGURES/4.
- Jandhyala, S. M. *et al.* (2015) ‘Role of the normal gut microbiota’, *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), pp. 8836–8847. doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.
- Jeong, D. W. *et al.* (2018) ‘Urease characteristics and phylogenetic status of *Bacillus paralicheniformis*’, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(12), pp. 1992–1998. doi: 10.4014/jmb.1809.09030.
- Jeong, D. W. *et al.* (2020) ‘Two genes involved in clindamycin resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* identified by comparative genomic analysis’, *PLOS ONE*, 15(4), p. e0231274. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0231274.
- Joglekar, S. N. *et al.* (2019) ‘Process of fruit peel waste biorefinery: a case study of citrus waste biorefinery, its environmental impacts and recommendations’, *Environmental Science and Pollution Research*, 26(34), pp. 34713–34722. doi: 10.1007/s11356-019-04196-0.
- Jones, J. M. (2014) ‘CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the “fiber gap”’, *Nutrition Journal*, 13(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/1475-2891-13-34.
- Juste, C. *et al.* (2014) ‘Bacterial protein signals are associated with Crohn’s disease’, *Gut*, 63(10), pp. 1566–1577. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303786.

Kaoutari, A. El *et al.* (2013) 'The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota', *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), pp. 497–504. doi: 10.1038/nrmicro3050.

Kazeem, M. O. *et al.* (2017) 'Prospecting Agro-waste Cocktail: Supplementation for Cellulase Production by a Newly Isolated Thermophilic *B. licheniformis* 2D55.', *Applied biochemistry and biotechnology*, 182(4), pp. 1318–1340. doi: 10.1007/s12010-017-2401-z.

Kim, H. S. *et al.* (2021) 'Assessment of the safety and anti-inflammatory effects of three *Bacillus* strains in the respiratory tract', *Environmental Microbiology*, 23(6), pp. 3077–3098. doi: 10.1111/1462-2920.15530.

Kim, S.-H. ; *et al.* (2022) 'Safety Evaluation of *Bacillus subtilis* IDCC1101, Newly Isolated from Cheonggukjang, for Industrial Applications', *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 2494, 10(12), p. 2494. doi: 10.3390/MICROORGANISMS10122494.

Knapik, K., Becerra, M. and González-Siso, M. I. (2019) 'Microbial diversity analysis and screening for novel xylanase enzymes from the sediment of the Lobios Hot Spring in Spain', *Scientific reports*, 9(1), p. 11195. doi: 10.1038/s41598-019-47637-z.

Knauf, C. *et al.* (2020) 'Targeting the Enteric Nervous System to Treat Metabolic Disorders? "enterosynes" as Therapeutic Gut Factors', *Neuroendocrinology*. Karger Publishers, pp. 139–146. doi: 10.1159/000500602.

Kobyliak, N. *et al.* (2016) 'Probiotics in prevention and treatment of obesity: A critical view', *Nutrition and Metabolism*, 13(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/S12986-016-0067-0/TABLES/2.

Koh, A. *et al.* (2016) 'From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites', *Cell*. Cell Press, pp. 1332–1345. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.

Konieczna, P. *et al.* (2013) 'Immunomodulation by *Bifidobacterium infantis* 35624 in the Murine Lamina Propria Requires Retinoic Acid-Dependent and Independent Mechanisms', *PLOS ONE*, 8(5), p. e62617. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0062617.

Kook, S. Y. *et al.* (2019) 'Immunomodulatory effects of exopolysaccharides produced by *Bacillus licheniformis* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Korean kimchi', *Journal of Functional Foods*, 54, pp. 211–219. doi: 10.1016/j.jff.2019.01.003.

Kostovcikova, K. *et al.* (2019) 'Diet rich in animal protein promotes pro-inflammatory macrophage response and exacerbates colitis in mice', *Frontiers in Immunology*, 10(APR), p.

919. doi: 10.3389/fimmu.2019.00919.

Koutsoumanis, K. *et al.* (2021) ‘Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 14: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2021’, *EFSA Journal*, 19(7), p. e06689. doi: 10.2903/J.EFSA.2021.6689.

Koutsoumanis, K. *et al.* (2023) ‘Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microorganisms intentionally added to food or feed as notified to EFSA’, *EFSA Journal*, 21(1). doi: 10.2903/j.efsa.2023.7747.

Krautkramer, K. A., Fan, J. and Bäckhed, F. (2021) ‘Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 77–94. doi: 10.1038/s41579-020-0438-4.

Krebs, C. J. (2009) *Ecology. The Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. Charles J. Krebs, Pearson Benjamin Cummings. Edited by P. Education. doi: 10.1086/407551.

Kristensen, N. B. *et al.* (2016) ‘Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: A systematic review of randomized controlled trials’, *Genome Medicine*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13073-016-0300-5.

Kumar, S. *et al.* (2018) ‘MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms’, *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), pp. 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

Kumari, M. *et al.* (2021) ‘Fostering next-generation probiotics in human gut by targeted dietary modulation: An emerging perspective’, *Food Research International*. Elsevier, p. 110716. doi: 10.1016/j.foodres.2021.110716.

de la Torre, I. *et al.* (2019) ‘Utilisation/upgrading of orange peel waste from a biological biorefinery perspective’, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag, pp. 5975–5991. doi: 10.1007/s00253-019-09929-2.

Lahtinen, P. *et al.* (2022) ‘Effectiveness of Fecal Microbiota Transplantation for Weight Loss in Patients With Obesity Undergoing Bariatric Surgery: A Randomized Clinical Trial’, *JAMA Network Open*, 5(12), pp. e2247226–e2247226. doi: 10.1001/JAMANETWORKOPEN.2022.47226.

Lakhdari, O. *et al.* (2010) ‘Functional Metagenomics: A High Throughput Screening Method

to Decipher Microbiota-Driven NF- κ B Modulation in the Human Gut', *PLOS ONE*, 5(9), p. e13092. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0013092.

Langella, O. *et al.* (2017) 'X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification', *Journal of Proteome Research*, 16(2), pp. 494–503. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00632.

Langmead, B. and Salzberg, S. L. (2012) 'Fast gapped-read alignment with Bowtie 2', *Nature Methods*, 9(4), pp. 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923.

Lazar, V. *et al.* (2018) 'Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer', *Frontiers in Immunology*, 9(AUG), p. 1830. doi: 10.3389/FIMMU.2018.01830/BIBTEX.

Leeming, E. R. *et al.* (2021) 'The complexities of the diet-microbiome relationship: advances and perspectives', *Genome Medicine* 2021 13:1, 13(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/S13073-020-00813-7.

Lefevre, M. *et al.* (2017) 'Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 83, pp. 54–65. doi: 10.1016/j.yrtph.2016.11.010.

Letunic, I. and Bork, P. (2019) 'Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments', *Nucleic Acids Research*, 47(W1). doi: 10.1093/nar/gkz239.

Levine, U. Y. *et al.* (2013) 'Butyrate-producing bacteria, including mucin degraders, from the swine intestinal tract', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(12), pp. 3879–3881. doi: 10.1128/AEM.00589-13.

Levy, M. *et al.* (2017) 'Dysbiosis and the immune system', *Nature reviews. Immunology*, 17(4), pp. 219–232. doi: 10.1038/NRI.2017.7.

Ley, R. E. *et al.* (2006) 'Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity', *Nature*, 444(7122), pp. 1022–1023. doi: 10.1038/4441022a.

Li, H. *et al.* (2021) 'Clinical observation of the effect of modified Ginseng-Schisandra decoction (MGSD) on trace elements and immune function in children with spleen deficiency syndrome after recurrent respiratory tract infection (RRTI): A randomized controlled trial', *Translational Pediatrics*, 10(6), pp. 1692–1700. doi: 10.21037/tp-21-243.

Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. (1965) 'Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms', *Science*, 147(3659), pp. 747–748. doi: 10.1126/science.147.3659.747.

Liu, L. *et al.* (2021) 'An in vitro approach to studying the microbial community and impact of pre and probiotics under anorexia nervosa related dietary restrictions', *Nutrients*, 13(12), p. 4447. doi: 10.3390/nu13124447.

Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G. and Huttenhower, C. (2016) 'The healthy human microbiome', *Genome Medicine*. BioMed Central, pp. 1–11. doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.

Logan, A. C., Jacka, F. N. and Prescott, S. L. (2016) 'Immune-Microbiota Interactions: Dysbiosis as a Global Health Issue', *Current Allergy and Asthma Reports*. Springer, pp. 1–9. doi: 10.1007/s11882-015-0590-5.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, Pedro M, *et al.* (2014) 'The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013.', *Nucleic acids research*, 42(Database issue), pp. D490-5. doi: 10.1093/nar/gkt1178.

Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, Pedro M., *et al.* (2014) 'The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013', *Nucleic Acids Research*, 42(D1), pp. D490–D495. doi: 10.1093/nar/gkt1178.

Louis, P. and Flint, H. J. (2009) 'Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine', *FEMS Microbiology Letters*, 294(1), pp. 1–8. doi: 10.1111/J.1574-6968.2009.01514.X.

Luckey, T. D. (1972) 'Introduction to intestinal microecology.', *The American journal of clinical nutrition*, 25(12), pp. 1292–1294. doi: 10.1093/ajcn/25.12.1292.

Macfarlane, G. T. and Macfarlane, S. (2011) 'Fermentation in the human large intestine: Its physiologic consequences and the potential contribution of prebiotics', *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45(SUPPL. 3). doi: 10.1097/MCG.0B013E31822FECFE.

Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. and Gibson, G. R. (1998) 'Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon', *Microbial Ecology*, 35(2), pp. 180–187. doi: 10.1007/s002489900072.

Madsen, L. *et al.* (2017) 'Links between dietary protein sources, the gut microbiota, and obesity', *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A., p. 1047. doi:

10.3389/fphys.2017.01047.

Madslie, E. H. *et al.* (2012) ‘Genotyping of *B. licheniformis* based on a novel multi-locus sequence typing (MLST) scheme’, *BMC Microbiology*, 12(1), p. 230. doi: 10.1186/1471-2180-12-230.

Maioli, T. U. *et al.* (2021) ‘Possible Benefits of *Faecalibacterium prausnitzii* for Obesity-Associated Gut Disorders’, *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A., p. 2869. doi: 10.3389/fphar.2021.740636.

Majeed, M. *et al.* (2018) ‘*Bacillus coagulans* MTCC 5856 for the management of major depression with irritable bowel syndrome: a randomised, double-blind, placebo controlled, multi-centre, pilot clinical study’, *Food & nutrition research*, 62. doi: 10.29219/FNR.V62.1218.

Majeed, M. *et al.* (2023) ‘The effects of *Bacillus coagulans* MTCC 5856 on functional gas and bloating in adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled study’, *Medicine*, 102(9), p. E33109. doi: 10.1097/MD.00000000000033109.

Makki, K. *et al.* (2018) ‘The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease’, *Cell Host and Microbe*. Cell Press, pp. 705–715. doi: 10.1016/j.chom.2018.05.012.

Malard, F. *et al.* (2021) ‘Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease’, *Mucosal Immunology*, 14(3), pp. 547–554. doi: 10.1038/S41385-020-00365-4.

Margulis, L. (1991) ‘Symbiosis as a source of evolutionary innovation’, in *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation: Speciation and Morphogenesis*, p. 454. Available at: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300696181> (Accessed: 5 October 2021).

Marinelli, L. *et al.* (2019) ‘Identification of the novel role of butyrate as AhR ligand in human intestinal epithelial cells’, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-37019-2.

Marrs, T. and Walter, J. (2021) ‘Pros and cons: Is faecal microbiota transplantation a safe and efficient treatment option for gut dysbiosis?’, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 76(7), pp. 2312–2317. doi: 10.1111/all.14750.

Martin-Gallausiaux, C. *et al.* (2021) ‘Scfa: Mechanisms and functional importance in the gut’, *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), pp. 37–49. doi: 10.1017/S0029665120006916.

- Martin-Gallaussiaux, C. *et al.* (2022) ‘Akkermansia muciniphila upregulates genes involved in maintaining the intestinal barrier function via ADP-heptose-dependent activation of the ALPK1/TIFA pathway’, *Gut Microbes*, 14(1). doi: 10.1080/19490976.2022.2110639/SUPPL_FILE/KGMI_A_2110639_SM4998.ZIP.
- Martín, R. *et al.* (2015) ‘Faecalibacterium prausnitzii prevents physiological damages in a chronic low-grade inflammation murine model’, *BMC Microbiology*, 15(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12866-015-0400-1.
- Marzorati, M. *et al.* (2020) ‘Bacillus subtilis HU58 and bacillus coagulans SC208 probiotics reduced the effects of antibiotic-induced gut microbiome dysbiosis in an M-SHIME® model’, *Microorganisms*, 8(7), pp. 1–15. doi: 10.3390/microorganisms8071028.
- Marzorati, M. *et al.* (2021) ‘Treatment with a spore-based probiotic containing five strains of Bacillus induced changes in the metabolic activity and community composition of the gut microbiota in a SHIME® model of the human gastrointestinal system’, *Food Research International*, 149, p. 110676. doi: 10.1016/J.FOODRES.2021.110676.
- Maski, S. *et al.* (2021) ‘Hemicellulosic biomass conversion by Moroccan hot spring Bacillus paralicheniformis CCMM B940 evidenced by glycoside hydrolase activities and whole genome sequencing’, *3 Biotech*, 11(8), p. 379. doi: 10.1007/s13205-021-02919-0.
- McFarlin, B. K. *et al.* (2017) ‘Oral spore-based probiotic supplementation was associated with reduced incidence of post-prandial dietary endotoxin, triglycerides, and disease risk biomarkers’, *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(3), p. 117. doi: 10.4291/wjgp.v8.i3.117.
- Mehta, S. H., Kruger, M. and Sokol, R. J. (2012) ‘Is maternal diabetes a risk factor for childhood obesity?’, in *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*. Taylor & Francis, pp. 41–44. doi: 10.3109/14767058.2012.626927.
- Mendoza, L. (2019) ‘Potential effect of probiotics in the treatment of breast cancer’, *Oncology Reviews*, 13(2), pp. 134–138. doi: 10.4081/ONCOL.2019.422.
- Michel, C. and Blottière, H. M. (2022) ‘Neonatal Programming of Microbiota Composition: A Plausible Idea That Is Not Supported by the Evidence’, *Frontiers in Microbiology*, 13. doi: 10.3389/FMICB.2022.825942.
- Miller, G. L. (1959) ‘Determination of reducing sugar by DNS method.’, *Anal chem*, 31, pp.

426–428.

Miquel, S. *et al.* (2013) ‘Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health’, *Current Opinion in Microbiology*, 16(3), pp. 255–261. doi: 10.1016/j.mib.2013.06.003.

Mirande, C. *et al.* (2010) ‘Characterization of Xyn10A, a highly active xylanase from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), pp. 2097–2105. doi: 10.1007/s00253-010-2694-0.

Mörbe, U. M. *et al.* (2021) ‘Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function’, *Mucosal Immunology*. Nature Publishing Group, pp. 793–802. doi: 10.1038/s41385-021-00389-4.

Morrison, D. J. and Preston, T. (2016) ‘Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism’, *Gut microbes*, 7(3), pp. 189–200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.

Mosoni, P. (2014) ‘Dégradation des fibres alimentaires par le microbiote colique de l’Homme’, *Innovations Agronomiques*, 36, pp. 83–86.

Moszak, M., Szulińska, M. and Bogdański, P. (2020) ‘You are what you eat—the relationship between diet, microbiota, and metabolic disorders— A review’, *Nutrients*. Nutrients. doi: 10.3390/nu12041096.

Myhrstad, M. C. W. *et al.* (2020) ‘Dietary fiber, gut microbiota, and metabolic regulation— current status in human randomized trials’, *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 859. doi: 10.3390/nu12030859.

Nakazawa, Y. and Hosono, A. (1992) ‘Fermented milk in the orient’, in *Functions of fermented milk: challenges for the health sciences*. Elsevier Applied Science, pp. 61–78.

Ngom, S. I. *et al.* (no date) ‘Characterisation of hemicellulolytic *Bacillus paralicheniformis* cmm strains as future fibrolytic probiotics’, *Scientific Reports*.

Ngowi, E. E. *et al.* (2021) ‘Impact of the factors shaping gut microbiota on obesity’, *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), pp. 2131–2147. doi: 10.1111/JAM.15036.

Nicholson, J. K. *et al.* (2012) ‘Host-gut microbiota metabolic interactions’, *Science*. American Association for the Advancement of Science, pp. 1262–1267. doi: 10.1126/science.1223813.

Nissen, L., Casciano, F. and Gianotti, A. (2020) ‘Intestinal fermentation in vitro models to study

food-induced gut microbiota shift: an updated review’, *FEMS Microbiology Letters*, 367(12), p. 97. doi: 10.1093/FEMSLE/FNAA097.

Nyangale, E. P. *et al.* (2015) ‘*Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 Modulates *Faecalibacterium prausnitzii* in Older Men and Women’, *The Journal of nutrition*, 145(7), pp. 1446–1452. doi: 10.3945/JN.114.199802.

O’Hara, A. M. and Shanahan, F. (2006) ‘The gut flora as a forgotten organ’, *EMBO Reports*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 688–693. doi: 10.1038/sj.embor.7400731.

Olm, M. R. and Sonnenburg, J. L. (2021) ‘Ancient human faeces reveal gut microbes of the past’, *Nature* 2021 594:7862, 594(7862), pp. 182–183. doi: 10.1038/d41586-021-01266-7.

Oñate, F. P. *et al.* (2019) ‘MSPminer: Abundance-based reconstitution of microbial pan-genomes from shotgun metagenomic data’, *Bioinformatics*, 35(9), pp. 1544–1552. doi: 10.1093/bioinformatics/bty830.

Onyango, S. O. *et al.* (2021) ‘Oral and Gut Microbial Carbohydrate-Active Enzymes Landscape in Health and Disease’, *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 3838. doi: 10.3389/fmicb.2021.653448.

Oren, A. and Garrity, G. M. (2021) ‘Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10), p. 005056. doi: 10.1099/ijsem.0.005056.

Othoum, G. *et al.* (2019) ‘Comparative genomics study reveals Red Sea *Bacillus* with characteristics associated with potential microbial cell factories (MCFs)’, *Scientific Reports*, 9(1), pp. 23955–6900. doi: 10.1038/s41598-019-55726-2.

Pabst, O., Cerovic, V. and Hornef, M. (2016) ‘Secretory IgA in the Coordination of Establishment and Maintenance of the Microbiota’, *Trends in Immunology*. Elsevier Current Trends, pp. 287–296. doi: 10.1016/j.it.2016.03.002.

De Paepe, K. *et al.* (2017) ‘Inter-individual differences determine the outcome of wheat bran colonization by the human gut microbiome’, *Environmental Microbiology*, 19(8), pp. 3251–3267. doi: 10.1111/1462-2920.13819.

Paine, R. T. (1969) ‘A Note on Trophic Complexity and Community Stability’, *The American Naturalist*, 103(929), pp. 91–93. doi: 10.1086/282586.

Parab, P. *et al.* (2017) ‘Enzymatic saccharification of seaweeds into fermentable sugars by xylanase from marine *Bacillus* sp. strain BT21’, *3 Biotech*, 7(5), p. 296. doi: 10.1007/s13205-017-0921-4.

Parks, D. H. *et al.* (2015) ‘CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes’, *Genome Research*, 25(7), pp. 1043–1055. doi: 10.1101/gr.186072.114.

Patrascu, O. *et al.* (2017) ‘OPEN A fibrolytic potential in the human ileum mucosal microbiota revealed by functional metagenomic’, *Nature Publishing Group*, (August 2016), pp. 1–15. doi: 10.1038/srep40248.

Payling, L. *et al.* (2020) ‘The effects of carbohydrate structure on the composition and functionality of the human gut microbiota’, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, pp. 233–248. doi: 10.1016/j.tifs.2020.01.009.

Perler, B. K., Friedman, E. S. and Wu, G. D. (2022) ‘The Role of the Gut Microbiota in the Relationship Between Diet and Human Health’, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-031522-092054>, 85(1). doi: 10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-031522-092054.

Perraudeau, F. *et al.* (2020) ‘Improvements to postprandial glucose control in subjects with type 2 diabetes: A multicenter, double blind, randomized placebo-controlled trial of a novel probiotic formulation’, *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 8(1), p. e001319. doi: 10.1136/bmjdr-2020-001319.

Petrova, P., Petlichka, S. and Petrov, K. (2020) ‘New *Bacillus* spp. with potential for 2,3-butanediol production from biomass’, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 130(1), pp. 20–28. doi: 10.1016/j.jbiosc.2020.02.009.

Pham, V. T. and Mohajeri, M. H. (2018) ‘The application of in vitro human intestinal models on the screening and development of pre-And probiotics’, *Beneficial Microbes*, 9(5), pp. 725–742. doi: 10.3920/BM2017.0164.

Plomer, M., Perez, M. and Greifenberg, D. M. (2020) ‘Effect of *Bacillus clausii* Capsules in Reducing Adverse Effects Associated with *Helicobacter pylori* Eradication Therapy: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial’, *Infectious Diseases and Therapy*, 9(4), pp. 867–878. doi: 10.1007/S40121-020-00333-2/TABLES/6.

Poeker, S. A. *et al.* (2018) ‘Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers

using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS)', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-018-22438-y.

Polonca, S. (2020) 'Environment Shapes the Intra-species Diversity of *Bacillus subtilis* Isolates', *Microbial Ecology*, 79(4), pp. 853–864. doi: 10.1007/s00248-019-01455-y.

Postler, T. S. and Ghosh, S. (2017) 'Understanding the Holobiont: How Microbial Metabolites Affect Human Health and Shape the Immune System', *Cell Metabolism*. Cell Press, pp. 110–130. doi: 10.1016/j.cmet.2017.05.008.

Power, M. E. and Scott Mills, L. (1995) 'The keystone cops meet in Hilo', *Trends in Ecology & Evolution*, 10(5), pp. 182–184. doi: 10.1016/S0169-5347(00)89047-3.

Puebla-Barragan, S. and Reid, G. (2019) 'Forty-five-year evolution of probiotic therapy.', *Microbial cell (Graz, Austria)*, 6(4), pp. 184–196. doi: 10.15698/mic2019.04.673.

Qin, J. *et al.* (2010) 'A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing', *Nature*, 464(7285), pp. 59–65. doi: 10.1038/nature08821.

Qin, J. *et al.* (2012) 'A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes', *Nature* 2012 490:7418, 490(7418), pp. 55–60. doi: 10.1038/nature11450.

Rabot, S. *et al.* (2010) 'Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism', *The FASEB Journal*, 24(12), pp. 4948–4959. doi: 10.1096/fj.10.164921.

Ramirez, J. *et al.* (2020) 'Antibiotics as Major Disruptors of Gut Microbiota', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. doi: 10.3389/FCIMB.2020.572912/PDF.

Ramos, S. and Martín, M. Á. (2021) 'Impact of diet on gut microbiota', *Current Opinion in Food Science*, 37, pp. 83–90. doi: 10.1016/J.COFS.2020.09.006.

Ranaivo, H. *et al.* (2022) 'Increasing the diversity of dietary fibers in a daily-consumed bread modifies gut microbiota and metabolic profile in subjects at cardiometabolic risk', *Gut Microbes*, 14(1). doi: 10.1080/19490976.2022.2044722.

Rastall, R. A. *et al.* (2022) 'Structure and function of non-digestible carbohydrates in the gut microbiome', <https://doi.org/10.3920/BM2021.0090>, 13(2), pp. 95–168. doi: 10.3920/BM2021.0090.

Rescigno, M. (2010) 'Intestinal Dendritic Cells', *Advances in Immunology*, 107(C), pp. 109–

138. doi: 10.1016/B978-0-12-381300-8.00004-6.

Rey, M. W. *et al.* (2004) 'Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species.', *Genome biology*, 5(10), p. R77. doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r77.

Rivas, B. *et al.* (2008) 'Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), pp. 2380–2387. doi: 10.1021/jf073388r.

Robert, C. *et al.* (2007) '*Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), pp. 1516–1520. doi: 10.1099/IJS.0.64998-0/CITE/REFWORKS.

Rooney, A. P. *et al.* (2009) 'Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov.', *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59(10), pp. 2429–2436. doi: 10.1099/ijms.0.009126-0.

Rooney, Alejandro P. *et al.* (2009) 'Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), pp. 2429–2436. doi: 10.1099/ijms.0.009126-0.

Rothschild, D. *et al.* (2018) 'Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota', *Nature*, 555(7695), pp. 210–215. doi: 10.1038/nature25973.

Röttjers, L. and Faust, K. (2018) 'Can we predict keystones?', *Nature Reviews Microbiology* 2018 17:3, 17(3), pp. 193–193. doi: 10.1038/s41579-018-0132-y.

Roupar, D. *et al.* (2021) 'Bioengineering approaches to simulate human colon microbiome ecosystem', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, pp. 808–822. doi: 10.1016/j.tifs.2021.04.035.

Saarela, M. H. (2019) 'Safety aspects of next generation probiotics', *Current Opinion in Food Science*, 30, pp. 8–13. doi: 10.1016/j.cofs.2018.09.001.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.', *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), pp. 406–425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Salminen, S. *et al.* (2021) ‘The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics’, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, pp. 649–667. doi: 10.1038/s41575-021-00440-6.

Sanders, M. E. *et al.* (2019) ‘Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic’, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group, pp. 605–616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3.

Sarkar, A. *et al.* (2021) ‘The Association between Early-Life Gut Microbiota and Long-Term Health and Diseases’, *Journal of Clinical Medicine 2021, Vol. 10, Page 459*, 10(3), p. 459. doi: 10.3390/JCM10030459.

Sarrabayrouse, G. *et al.* (2015) ‘Microbiota-specific CD4CD8 α Tregs: Role in intestinal immune homeostasis and implications for IBD’, *Frontiers in Immunology*, 6(OCT), p. 522. doi: 10.3389/fimmu.2015.00522.

Sasaki, K. *et al.* (2020) ‘Bacillus coagulans SANK 70258 suppresses Enterobacteriaceae in the microbiota of ulcerative colitis in vitro and enhances butyrogenesis in healthy microbiota’, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), pp. 3859–3867. doi: 10.1007/S00253-020-10506-1/FIGURES/4.

Sbihi, H. *et al.* (2019) ‘Thinking bigger: How early-life environmental exposures shape the gut microbiome and influence the development of asthma and allergic disease’, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 2103–2115. doi: 10.1111/all.13812.

Scheller, H. V. and Ulvskov, P. (2010) ‘Hemicelluloses’, *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), pp. 263–289. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112315.

Schmidt, T. S. B., Raes, J. and Bork, P. (2018) ‘The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation’, *Cell*, 172(6), pp. 1198–1215. doi: 10.1016/J.CELL.2018.02.044.

Schneeberger, M. *et al.* (2015) ‘Akkermansia muciniphila inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice’, *Scientific Reports*, 5(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/srep16643.

Schnorr, S. L. *et al.* (2014) ‘Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers’, *Nature Communications*, 5(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/ncomms4654.

Schulthess, J. *et al.* (2019) ‘The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages’, *Immunity*, 50(2), pp. 432-445.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.018.

Schultz, M., Burton, J. P. and Chanyi, R. M. (2017) ‘Use of Bacillus in Human Intestinal Probiotic Applications’, in *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis*. Academic Press, pp. 119–123. doi: 10.1016/B978-0-12-804024-9.00011-2.

Schwan, A. *et al.* (1983) ‘Relapsing clostridium difficile enterocolitis cured by rectal infusion of homologous faeces’, *The Lancet*. Elsevier, p. 845. doi: 10.1016/S0140-6736(83)90753-5.

Seemann, T. (2014) ‘Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation’, *Bioinformatics*, 30(14), pp. 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153.

Sender, R., Fuchs, S. and Milo, R. (2016) ‘Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans’, *Cell*. Cell Press, pp. 337–340. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.

Sharoba, A., Farrag, M. and Abd El-Salam, A. (2013) ‘Utilization of some fruits and vegetables wastes as a source of dietary fibers in cake making’, *Journal of Food and Dairy Sciences*, 4(9), pp. 433–453. doi: 10.21608/jfds.2013.72084.

Shetty, S. A. *et al.* (2018) ‘Reclassification of eubacterium hallii as Anaerobutyricum hallii gen. nov., comb. nov., and description of Anaerobutyricum soehngenii sp. nov., a butyrate and propionate-producing bacterium from infant faeces’, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(12), pp. 3741–3746. doi: 10.1099/ijsem.0.003041.

Shinde, T. *et al.* (2020) ‘Modulating the microbiome and immune responses using whole plant fibre in synbiotic combination with fibre-digesting probiotic attenuates chronic colonic inflammation in spontaneous colitic mice model of IBD’, *Nutrients*, 12(8), pp. 1–26. doi: 10.3390/nu12082380.

Shokryazdan, P. *et al.* (2016) ‘Effects of prebiotics on immune system and cytokine expression’, *Medical Microbiology and Immunology 2016 206:1*, 206(1), pp. 1–9. doi: 10.1007/S00430-016-0481-Y.

da Silva, T. F. *et al.* (2021) ‘The impact of probiotics, prebiotics, and synbiotics on the biochemical, clinical, and immunological markers, as well as on the gut microbiota of obese

hosts', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, pp. 337–355. doi: 10.1080/10408398.2020.1733483.

Singh, T. P. and Natraj, B. H. (2021) 'Next-generation probiotics: a promising approach towards designing personalized medicine', *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor & Francis, pp. 479–498. doi: 10.1080/1040841X.2021.1902940.

Singh, V. *et al.* (2022) 'Role, relevance, and possibilities of in vitro fermentation models in human dietary, and gut-microbial studies', *Biotechnology and Bioengineering*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 3044–3061. doi: 10.1002/bit.28206.

Siqueira, G. *et al.* (2016) 'Re-dispersible carrot nanofibers with high mechanical properties and reinforcing capacity for use in composite materials', *Composites Science and Technology*, 123, pp. 49–56. doi: 10.1016/j.compscitech.2015.12.001.

Slepecky, R. A. and Hemphill, H. E. (2006) 'The Genus *Bacillus*—Nonmedical', in *The Prokaryotes*, pp. 530–562. doi: 10.1007/0-387-30744-3_16.

Soldi, S. *et al.* (2019) 'Effect of a multistrain probiotic (Lactoflorene® Plus) on inflammatory parameters and microbiota composition in subjects with stress-related symptoms', *Neurobiology of Stress*, 10. doi: 10.1016/j.ynstr.2018.11.001.

Sonnenborn, U. and Schulze, J. (2009) 'The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917-features of a versatile probiotic', *Microbial Ecology in Health and Disease*. Taylor & Francis, pp. 122–158. doi: 10.3109/08910600903444267.

Sonnenburg, J. L. and Bäckhed, F. (2016) 'Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism', *Nature*, 535(7610), pp. 56–64. doi: 10.1038/NATURE18846.

Stephen, A. M. *et al.* (2017) 'Dietary fibre in Europe: Current state of knowledge on definitions, sources, recommendations, intakes and relationships to health', *Nutrition Research Reviews*, 30(2), pp. 149–190. doi: 10.1017/S095442241700004X.

Stulke, J. and Hillen, W. (2000) 'Regulation of carbon catabolism in *Bacillus* species', *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, pp. 849–880. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.849.

Sugino, K. Y., Paneth, N. and Comstock, S. S. (2019) 'Michigan cohorts to determine associations of maternal pre-pregnancy body mass index with pregnancy and infant gastrointestinal microbial communities: Late pregnancy and early infancy', *PLOS ONE*, 14(3),

p. e0213733. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0213733.

Tang, M. and Marroquin, E. (2022) ‘The role of the gut microbiome in the intergenerational transmission of the obesity phenotype: A narrative review’, *Frontiers in Medicine*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fmed.2022.1057424.

Tanno, H. *et al.* (2021) ‘Characterization of fructooligosaccharide metabolism and fructooligosaccharide-degrading enzymes in human commensal butyrate producers’, *Gut Microbes*, 13(1), pp. 1–20. doi: 10.1080/19490976.2020.1869503.

Tap, J. *et al.* (2009) ‘Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core’, *Environmental Microbiology*, 11(10), pp. 2574–2584. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01982.x.

Tap, J. *et al.* (2015) ‘Gut microbiota richness promotes its stability upon increased dietary fibre intake in healthy adults’, *Environmental Microbiology*, 17(12), pp. 4954–4964. doi: 10.1111/1462-2920.13006/SUPPINFO.

Tap, J. *et al.* (2017) ‘Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome’, *Gastroenterology*, 152(1), pp. 111–123.e8. doi: 10.1053/j.gastro.2016.09.049.

Terrapon, N. *et al.* (2018) ‘PULDB: The expanded database of Polysaccharide Utilization Loci’, *Nucleic Acids Research*, 46(D1), pp. D677–D683. doi: 10.1093/nar/gkx1022.

Thapa, S. *et al.* (2020) ‘Microbial cellulolytic enzymes: diversity and biotechnology with reference to lignocellulosic biomass degradation’, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. Springer, pp. 621–648. doi: 10.1007/s11157-020-09536-y.

The Human Microbiome Consortium Project (2012) ‘Structure, function and diversity of the healthy human microbiome’, *Nature*, 486(7402), pp. 207–214. doi: 10.1038/nature11234.

Thomson, C., Garcia, A. L. and Edwards, C. A. (2021) ‘Interactions between dietary fibre and the gut microbiota’, in *Proceedings of the Nutrition Society*. Cambridge University Press, pp. 398–408. doi: 10.1017/S0029665121002834.

Tom Dieck, H. *et al.* (2021) ‘A Synbiotic Formulation Comprising *Bacillus subtilis* DSM 32315 and L-Alanyl-L-Glutamine Improves Intestinal Butyrate Levels and Lipid Metabolism in Healthy Humans’, *Nutrients*, 14(1), p. 143. doi: 10.3390/NU14010143/S1.

Truong, D. T. *et al.* (2017) ‘Microbial strain-level population structure & genetic diversity from

metagenomes', *Genome Research*, 27(4), pp. 626–638. doi: 10.1101/gr.216242.116.

Tudela, H., Claus, S. P. and Saleh, M. (2021) 'Next Generation Microbiome Research: Identification of Keystone Species in the Metabolic Regulation of Host-Gut Microbiota Interplay', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A., p. 2321. doi: 10.3389/fcell.2021.719072.

Turck, D. *et al.* (2021) 'Safety of pasteurised *Akkermansia muciniphila* as a novel food pursuant to Regulation (EU) 2015/2283', *EFSA Journal*, 19(9), p. e06780. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6780.

Turnbaugh, P. J. *et al.* (2006) 'An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest', *Nature*, 444(7122), pp. 1027–1031. doi: 10.1038/nature05414.

Udayappan, S. *et al.* (2016) 'Oral treatment with *Eubacterium hallii* improves insulin sensitivity in db/db mice', *npj Biofilms and Microbiomes*, 2. doi: 10.1038/npjbiofilms.2016.9.

Valot, B. *et al.* (2011) 'MassChroQ: a versatile tool for mass spectrometry quantification', *Proteomics*, 11(17), pp. 3572–3577. doi: 10.1002/PMIC.201100120.

Vangay, P. *et al.* (2015) 'Antibiotics, Pediatric Dysbiosis, and Disease', *Cell Host & Microbe*, 17(5), pp. 553–564. doi: 10.1016/J.CHOM.2015.04.006.

Veiga, P., Miret, S. and Jimenez, L. (2020) 'Danone : The gut microbiome and probiotics – 100 years of shared history', *Danon Nutric Research*, 577, pp. S26–S30. Available at: <https://www.nature.com/articles/d42473-019-00336-9#ref-CR4> (Accessed: 13 October 2022).

Vendrik, K. E. W. *et al.* (2020) 'Fecal Microbiota Transplantation in Neurological Disorders', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A., p. 98. doi: 10.3389/fcimb.2020.00098.

Venema, K. and Van Den Abbeele, P. (2013) 'Experimental models of the gut microbiome', *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. Baillière Tindall, pp. 115–126. doi: 10.1016/j.bpg.2013.03.002.

Venkataraman, A. *et al.* (2016) 'Variable responses of human microbiomes to dietary supplementation with resistant starch', *Microbiome*, 4(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/S40168-016-0178-X/FIGURES/5.

Verhoeckx, K. *et al.* (2015) *The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo*

models, *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4.

Vinothkanna, A. *et al.* (2021) 'Structural characterization, functional and biological activities of an exopolysaccharide produced by probiotic *Bacillus licheniformis* AG-06 from Indian polyherbal fermented traditional medicine', *International Journal of Biological Macromolecules*, 174, pp. 144–152. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.01.117.

de Vos, W. M. *et al.* (2022) 'Gut microbiome and health: mechanistic insights', *Gut*. BMJ Publishing Group, pp. 1020–1032. doi: 10.1136/gutjnl-2021-326789.

Vrieze, A. *et al.* (2012) 'Transfer of Intestinal Microbiota From Lean Donors Increases Insulin Sensitivity in Individuals With Metabolic Syndrome', *Gastroenterology*, 143(4), pp. 913-916.e7. doi: 10.1053/J.GASTRO.2012.06.031.

Wan, Z. *et al.* (2022) 'Intermediate role of gut microbiota in vitamin B nutrition and its influences on human health', *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A., p. 3098. doi: 10.3389/fnut.2022.1031502.

Wang, J. and Fung, D. Y. C. (1996) 'Alkaline-fermented foods: A review with emphasis on pidan fermentation', *Critical Reviews in Microbiology*. Taylor & Francis, pp. 101–138. doi: 10.3109/10408419609106457.

Wang, L. T. *et al.* (2007) 'Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), pp. 1846–1850. doi: 10.1099/IJS.0.64685-0/CITE/REFWORKS.

Wang, Y. *et al.* (2017) 'Complete genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* MDJK30, a plant growth-promoting rhizobacterium with antifungal activity', *Genome Announcements*, 5(25), pp. 577–594. doi: 10.1128/genomeA.00577-17.

Wardman, J. F. *et al.* (2022) 'Carbohydrate-active enzymes (CAZymes) in the gut microbiome', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 542–556. doi: 10.1038/s41579-022-00712-1.

Wastyk, H. C. *et al.* (2021) 'Gut-microbiota-targeted diets modulate human immune status', *Cell*, 184(16), pp. 4137-4153.e14. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.019.

Wei, S. *et al.* (2018) 'Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods

(lettuce, spinach, and kimbap) using quantitative real-time PCR targeting groEL and gyrB', *Microbial Pathogenesis*, 115, pp. 312–320. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.079.

Weisburg, W. G. *et al.* (1991) '16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study', *Journal of Bacteriology*, 173(2), pp. 697–703. doi: n.a.

Westers, L., Westers, H. and Quax, W. J. (2004) 'Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: A biotechnological approach to optimize the host organism', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier, pp. 299–310. doi: 10.1016/j.bbamcr.2004.02.011.

WHO (no date) *Obésité*. Available at: https://www.who.int/fr/health-topics/obesity#tab=tab_1 (Accessed: 7 February 2023).

Wibowo, M. C. *et al.* (2021) 'Reconstruction of ancient microbial genomes from the human gut', *Nature* 2021 594:7862, 594(7862), pp. 234–239. doi: 10.1038/s41586-021-03532-0.

Worldobesity (2021) *Prevalence of Obesity | World Obesity Federation, worldobesity*. Available at: <https://www.worldobesity.org/about/about-obesity/prevalence-of-obesity> (Accessed: 10 January 2023).

De Wouters, T. *et al.* (2014) 'A robust and adaptable high throughput screening method to study host-microbiota interactions in the human intestine', *PLoS ONE*, 9(8), p. e105598. doi: 10.1371/journal.pone.0105598.

Wu, G. *et al.* (2021) 'Guild-based analysis for understanding gut microbiome in human health and diseases', *Genome Medicine*, 13(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13073-021-00840-y.

Yang, H. J. *et al.* (2015) 'Fermenting soybeans with *Bacillus licheniformis* potentiates their capacity to improve cognitive function and glucose homeostasis in diabetic rats with experimental Alzheimer's type dementia', *European Journal of Nutrition*, 54(1), pp. 77–88. doi: 10.1007/s00394-014-0687-y.

Ye, L. *et al.* (2013) 'Highly efficient production of l-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106', *Bioresource Technology*, 132, pp. 38–44. doi: 10.1016/J.BIORTECH.2013.01.011.

Ye, S. *et al.* (2022) 'A critical review on interplay between dietary fibers and gut microbiota', *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier, pp. 237–249. doi: 10.1016/j.tifs.2022.04.010.

Ze, X. *et al.* (2013) ‘Some are more equal than others’, *Gut Microbes*, 4(3), pp. 236–240. doi: 10.4161/GMIC.23998.

Zeng, Y., Himmel, M. E. and Ding, S. Y. (2017) ‘Visualizing chemical functionality in plant cell walls Mike Himmel’, *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central Ltd., p. 263. doi: 10.1186/s13068-017-0953-3.

Zhang, C. *et al.* (2010) ‘Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice’, *ISME Journal*, 4(2), pp. 232–241. doi: 10.1038/ismej.2009.112.

Zhang, F. *et al.* (2012) ‘Should we standardize the 1,700-year-old fecal microbiota transplantation’, *American Journal of Gastroenterology*, p. 1755. doi: 10.1038/ajg.2012.251.

Zhang, Y. *et al.* (2023) ‘Metabolite interactions between host and microbiota during health and disease: Which feeds the other?’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 160, p. 114295. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2023.114295.

Zhang, Z. *et al.* (2018) ‘Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* ZY-1-1 reveals the genetic basis for its hemicellulosic/cellulosic substrate-inducible xylanase and cellulase activities’, *3 Biotech*, 8(11), p. 465. doi: 10.1007/s13205-018-1490-x.

Zhao, L. (2013) ‘The gut microbiota and obesity: From correlation to causality’, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, pp. 639–647. doi: 10.1038/nrmicro3089.

Zhao, L. *et al.* (2018) ‘Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes’, *Science*, 359(6380), pp. 1151–1156. doi: 10.1126/science.aao5774.

Zheng, D., Liwinski, T. and Elinav, E. (2020) ‘Interaction between microbiota and immunity in health and disease’, *Cell Research*. Nature Publishing Group, pp. 492–506. doi: 10.1038/s41422-020-0332-7.

Zhou, A. *et al.* (2022) ‘Crosstalk Between the Gut Microbiota and Epithelial Cells Under Physiological and Infectious Conditions’, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Frontiers Media S.A., p. 23. doi: 10.3389/fcimb.2022.832672.

Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E. (2008) ‘Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution’, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford Academic, pp. 723–735. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.

