

PRODUCTION D'UN STARTER CELLULOLYTIQUE ANAEROBIQUE POUR SA VALORISATION EN ALIMENTATION ANIMALE.

KINET ROMAIN

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNÉE ACADÉMIQUE 2010-2011

(CO)-PROMOTEUR(S): BECKERS Y. ET HISSETTE M.

Résumé

La compétition pour l'utilisation des céréales destinées aux animaux monogastriques (principalement en aviculture) et destinées à l'homme ne cesse d'augmenter. Les conséquences de cette compétition associée à l'application des directives européennes émanant du protocole de Kyoto impliquent qu'il est légitime de s'interroger de la pérennité de l'amidon dans l'alimentation des volailles. Afin d'atteindre les objectifs relatifs à ces directives, la capacité de production des biocarburants va devoir être augmentée. Suite à cette augmentation, d'importantes répercussions sur la disponibilité des produits ligno-cellulosiques seront effectives. La valorisation des coproduits issus de ce type d'industrie notamment en termes de nutrition animale constitue un atout majeur pour faciliter l'intégration de ces nouvelles directives dans notre pays. Dès lors, l'étude de la possibilité d'utiliser des enzymes fibrolytiques extraites du rumen dans l'alimentation des volailles de manière à valoriser d'avantage des aliments riches en hydrates de carbone de structure, dont la cellulose, s'avère très intéressante.

Dans un premier temps, le but du travail était de valider *in vitro* le potentiel fibrolytique des enzymes ruminales chez la volaille de chair. Cette première étape a bien montré l'efficacité des enzymes *in vitro* sur différents coproduits lignocellulosiques industriels. Elle a également mis en évidence l'effet *in vitro* des agents dénaturants et protéolytiques potentiels du système digestif du poulet : un pH stomacal acide (égal à 3), la pepsine et la pancréatine (enzymes protéolytiques respectivement rencontrées dans l'estomac et dans l'intestin des poulets). Le pH acide s'est avéré le plus dénaturant mais les essais réalisés en mode digestion complète ont montré des effets moindres.

La seconde partie du travail s'est intéressée à l'isolation et à la production d'une bactérie cellulolytique du rumen, *Bacillus niabensis*. Cette bactérie, découverte récemment (2007), aérobie facultative, n'a pas montré d'activité antagoniste de moisissures suite aux tests réalisés.

Du point de vue de la production de biomasse, les essais menés sur milieux riches en fibres ont permis d'atteindre une population bactérienne de l'ordre de 10^9 CFU/ml en seulement 24h et ont également mis en évidence des cinétiques de croissance intéressante.

Elle s'est également révélée capable de produire des enzymes fibrolytiques extracellulaires après induction. Les activités suivantes ont pu être atteintes suite à l'utilisation de différents milieux inducteurs : une activité endoglucanase maximale de 5.97 UI/ml, une activité exoglucanase maximale de 1,00 UI/ml, une activité cellulase brute maximale de 0.45 UI/ml et enfin une activité xylanase de 4,50 UI/ml. Ces activités cellulolytiques sont comparables à celles obtenues au sein des extraits bruts ruminiaux.

Abstract

Competition for the cereals' use for monogastrics animals (mainly for poultry farming) and for human continues to increase. The consequences of this competition associated with the implementation of EU directives emanating from the Kyoto Protocol involve wondering about durability of starch's use for broiler feed. To reach the goals in connection with these directives, the production's capacity of biofuels will be increased. Due to this rise, significant repercussions on the availability of lignocellulosic products will come into effect. Valorization of coproducts from this kind of industry for animals feed is a major advantage to make easier the integration of these new directives in our country. Therefore, it's very interesting to study the possibility to use fibrolytic ruminal enzymes in the poultry feed to enhance the incorporation of foods rich in structure's carbohydrates in this same feed.

In a first time, the goal of this work was to validate *in vitro* the fibrolytic potential of ruminal enzymes in broiler. This first stage showed the efficiency *in vitro* of these enzymes on different lignocellulosic industrial coproducts. It also highlighted the *in vitro* effects of denaturing and proteolytic agents from chicken's digestive system: stomach acid pH (3), pepsin and pancreatin (proteolytic enzymes respectively met in the stomach and in the poultry's gut). The acid pH was the most denaturing but tests made in complete digestion mode showed lesser effects.

The second part of the work focused on the isolation and production of a cellulolytic rumen bacterium, *Bacillus niabensis*. This bacterium, discovered in 2007, optional aerobic, didn't show antagonism of mould after different tests.

Concerning the biomass production, experiments made on rich media in flasks allowed to achieve bacterial population of 10^9 CFU/ml in 24 h and they also highlighted interesting growth kinetics.

Bacillus niabensis was also proved to be able to produce extracellular fibrolytic enzymes after induction. The following activities were achieved thanks to the use of different inductive media: maximum endoglucanase activity of 5.97 IU/ml, maximum exoglucanase activity of 1.00 IU/ml, maximum "crude cellulase" of 0.45 IU/ml and finally a maximum xylanase activity of 4.50 IU/ml. These cellulolytic activities are similar to those obtained in crude ruminal extracts.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Monsieur Yves Beckers d'avoir accepté que je réalise ce travail de fin d'études au sein de l'unité de zootechnie. Je le remercie également pour son soutien.

Je souhaite ensuite remercier le Professeur Philippe Thonart de m'avoir permis d'effectuer mes manipulations au sein des laboratoires du CWBI à Gembloux ainsi que pour ses conseils avisés. Je le remercie également pour son enseignement de qualité reçu au cours de ces trois dernières années d'études, grâce auquel j'ai pris goût au domaine des bio-industries.

Mes remerciements vont également à mon co-promoteur, Mathias Hissette, pour son encadrement et l'ensemble de ses conseils. Je le remercie tout particulièrement pour son implication, sa disponibilité et le temps qu'il m'a consacré au cours de la dernière ligne droite de ce travail.

Ma reconnaissance va également à Madame Jacqueline Destain pour l'ensemble de ses réponses qui m'ont permis d'orienter mon travail ainsi que pour son aide lors de la rédaction de celui-ci.

Je ne pourrais oublier de remercier Cathy Helmus pour toute l'aide qu'elle m'a gentiment apportée au cours de ces derniers mois, pour le temps passé à m'enseigner les techniques de laboratoire nécessaires à la bonne réalisation de l'ensemble des expériences menées au cours de cette étude, ainsi que pour la patience dont elle a dû faire preuve.

Je remercie aussi toute l'équipe de « la cave » pour leurs encouragements, leur aide et les agréables moments passés en leur compagnie durant ce dernier semestre : Martine, les deux Annick, Céline, Diana, Delia, Carmen, Aurely, Cédric, Laurent, Firmin, Jean-Noël, Pascale, Ibrahim, et tout ceux que j'aurais pu oublier.

Merci à vous les chimistes de la promotion 2011 avec qui j'ai passé de bons moments au cours de ces trois dernières années et notamment à Quentin et Antoine mes deux collègues Tfiste de bio-industries.

Je tiens également à remercier ma famille sans qui je n'aurais pu réaliser ces études et pour leur aide lors de la rédaction de ce travail. Je voudrais également remercier mes parents (toi aussi Bernard) et ma sœur de m'avoir supporté et soutenu au cours de chacune des périodes d'examens vécues durant ces cinq années d'études. Un tout grand merci à Marie également pour tout son soutien et toute son aide.

Je remercie tous mes amis sans qui ces études n'auraient pas été les mêmes : Guilhem, Henri, Denis, Michael, Julien, Thierry, Renaud, Morgan, Fred, et pour finir mes deux co-koteurs et collègues Tfistes Yannick et Rémi.

Je vous remercie pour l'attention que vous porterez à mon travail et vous souhaite une agréable lecture.

Table des matières

1	CHAPITRE 1 : CADRE DU TRAVAIL
1.	LE DEVENIR DE L'AMIDON EN ALIMENTATION ANIMALE - CONSTAT	2
2.	LES DIRECTIVES EUROPÉENNES VISANT À RÉDUIRE L'ÉMISSION DE GAZ À EFFET DE SERRE DANS LE SECTEUR DES TRANSPORTS - OPPORTUNITÉS.....	2
3.	PROJET DE LA DIRECTION GÉNÉRALE OPÉRATIONNELLE AGRICULTURE, RESSOURCES NATURELLES ET ENVIRONNEMENT	3
	CHAPITRE 2 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....
1.	MÉTABOLISME DES GLUCIDES DANS LE RUMEN.....	5
1.1.	LE RUMEN.....	5
1.1.1.	CONDITIONS PHYSICO-CHIMIQUES.....	6
1.1.2.	LE MICROBIOME RUMINAL	6
1.2.	PHASE D'HYDROLYSE	7
1.2.1.	LA CELLULOSE.....	8
1.2.2.	BACTÉRIES CELLULOLYTIQUES	9
1.2.3.	DÉGRADATION DE LA CELLULOSE	16
1.3.	PHASE DE FERMENTATION	18
2.	DIGESTION PAR LA VOLAILLE DES HYDRATES DE CARBONE	20
2.1.	LE SYSTÈME DIGESTIF DES VOLAILLES.....	20
2.1.1.	FONCTIONNEMENT ET CONDITIONS BIOCHIMIQUES DU SYSTÈME DIGESTIF	21
2.1.2.	FLORE MICROBIENNE	22
2.2.	DIGESTION ET MÉTABOLISME DES HYDRATES DE CARBONE	22
2.2.1.	DIGESTION DES GLUCIDES	22
3.	CARACTÉRISATION DE LA BIOMASSE LIGNO-CELLULOSIQUE	24
3.1.	INTRODUCTION	24
3.2.	FACTEURS NUTRITIONNELS IMPORTANTS	24
3.3.	LA LIGNINE.....	25
3.4.	COPRODUITS AGRO-INDUSTRIELS ÉTUDIÉS	25
3.4.1.	DRÈCHES DE BLÉ	26
3.4.2.	SON DE BLÉ.....	27
3.4.3.	TOURTEAUX DE COLZA	28
3.4.4.	COQUES DE SOJA	29
4.	ENZYMES EXOGÈNES EN ALIMENTATION ANIMALE	29
4.1.	FORMULATION.....	31

CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

PARTIE A : VALIDATION IN VITRO DU POTENTIEL FIBROLYTIQUE DES ENZYMES RUMINALES CHEZ LA VOLAILLE DE CHAIR

1. PROTOCOLE D'EXTRACTION DES ENZYMES À PARTIR DU CONTENU RUMINAL	33
2. MESURE DES ACTIVITÉS FIBROLYTIQUES AU SEIN DU CONTENU RUMINAL.....	35
3. PROTOCOLE DE SIMULATION DU TRACTUS DIGESTIF DE LA VOLAILLE DE CHAIR (TERVILÄ-WILO ET AL., 1996).....	40
3.1. ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE DÉNATURATION DES ENZYMES	44
3.1.1. CONDITIONS ESTOMACS	44
3.1.2. CONDITIONS INTESTIN GRÊLE.....	45

PARTIE B : MODELE EX VIVO DE PRODUCTION DES ENZYMES FIBROLYTIQUES RUMINALES.....

1. TECHNIQUES D'ISOLEMENT DES BACTÉRIES FIBROLYTIQUES	46
2. CARACTÉRISATION DES BACTÉRIES FIBROLYTIQUES ISOLÉES.....	49
2.1. MISE EN ÉVIDENCE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DE <i>BACILLUS NIABENSIS</i> SUR MILIEU GÉLOSÉ	49
2.1.1. ACTIVITÉS FIBROLYTIQUES.....	49
2.1.2. ACTIVITÉ PROTÉOLYTIQUE.....	50
2.1.3. ACTIVITÉ AMYLOLYTIQUE	50
2.2. ANTAGONISME VIS-À-VIS DE MOISSURES.....	51
2.3. ASPECT MORPHOLOGIQUE DE <i>BACILLUS NIABENSIS</i>	51
2.4. DÉTERMINATION MASSE CELLULAIRE DE <i>BACILLUS NIABENSIS</i>	52
3. PRODUCTION DE BIOMASSE FIBROLYTIQUES.....	52
3.1. TEST DE SPORULATION.....	53
3.2. SCALE UP – CULTURE EN BIORÉACTEUR	54
3.3. TECHNIQUE POST CULTURE	54
3.4. CYTOMÉTRIE EN FLUX	55
4. PRODUCTION D'ENZYMES FIBROLYTIQUES	56
4.1. CHROMATOGRAPHIE	57

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....

PARTIE A : VALIDATION IN VITRO DU POTENTIEL FIBROLYTIQUE DES ENZYMES RUMINALES CHEZ LA VOLAILLE DE CHAIR

1. CARACTÉRISATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES PRÉSENTES AU SEIN DE L'EXTRAIT BRUT RUMINAL.....	59
1.1. PRODUITS CELLULOSIQUES PURIFIÉS	59
1.2. COPRODUITS CELLULOSIQUES INDUSTRIELS	60

2.	INCIDENCE DES CONDITIONS RÉGNANT AU SEIN DU SYSTÈME DIGESTIF DES POULETS DE CHAIR SUR LES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES	62
2.1.	ETUDE DE L'EFFET DES CONDITIONS RÉGNANT AU SEIN DE L'ESTOMAC SUR LES ENZYMES RUMINALES	62
2.1.1.	CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES SUITE À L'ACTION CONJUGUÉE DE LA PEPSINE ET D'UN PH = 3	63
2.1.2.	CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES SUITE À L'ACTION D'UN PH =3 SEUL	64
2.2.	ETUDE DE L'EFFET DES CONDITIONS RÉGNANT AU SEIN DE L'INTESTIN GRÊLE SUR LES ENZYMES RUMINALES	64
2.2.1.	CINÉTIQUE DE DÉGRADATION DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES SUITE À L'ACTION DE LA PANCRÉATINE	65
2.3.	SIMULATION <i>IN VITRO</i> DE LA DIGESTION COMPLÈTE DE COPRODUITS (TERVILÄ-WILO, ET AL., 1996)	65

PARTIE B : MODELE EX VIVO DE PRODUCTION DES ENZYMES FIBROLYTIQUES RUMINALES 68

1.	ISOLEMENT DE SOUCHES CELLULOLYTIQUES RUMINALES	68
2.	CONSERVATION DES SOUCHES	69
3.	CARACTÉRISATION DE <i>BACILLUS NIABENSIS</i>	70
3.1.	ASPECT MORPHOLOGIQUE	70
3.2.	ANTAGONISME VIS-À-VIS DE MOISSURES	71
3.3.	MISE EN ÉVIDENCE DES ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DE <i>BACILLUS NIABENSIS</i> SUR MILIEU GÉLOSÉ	72
4.	PRODUCTION DE BIOMASSE FIBROLYTIQUE	73
4.1.	SCALE UP	76
4.2.	TECHNIQUE POST-CULTURE	77
4.2.1.	LYOPHILISATION	77
4.3.	CYTOMÉTRIE DE FLUX	78
5.	PRODUCTION D'ENZYMES FIBROLYTIQUES	78
5.1.	MILIEU À BASE DE DRÊCHES DE BLÉ	79
5.2.	MILIEU À BASE DE DRÊCHES DE BLÉ ET DE XYLANE	80
5.3.	MILIEU À BASE DE CARBOXYMÉTHYLCELLULOSE, RAPPORT C/N = 30	81
5.4.	ANALYSE DES DEGRÉS DE POLYMÉRISATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE	82

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GÉNÉRALE

PARTIE A : VALIDATION *IN VITRO* DU POTENTIEL FIBROLYTIQUE DES ENZYMES RUMINALES CHEZ LA VOLAILLE DE CHAIR 84

PARTIE B : MODELE EX VIVO DE PRODUCTION DES ENZYMES FIBROLYTIQUES RUMINALES 86

CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1.	CONCLUSION	90
2.	PERSPECTIVES	90

CHAPITRE 7 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Liste des figures

Figure 1 : Schéma du système digestif de la vache.....	5
Figure 2 : Schéma du réseau compact formé par la lignine avec la cellulose et l'hémicellulose (Didderen <i>et al.</i> , 2008)	8
Figure 3 : Représentation schématique de l'action des enzymes cellulolytiques (Krause <i>et al.</i> , 2003).....	8
Figure 4 : Représentation schématique de l'interaction entre les polycellulosomes présents à la surface de <i>C. thermocellum</i> et la surface cellulosique (Bayer et Lamed, 2006).....	12
Figure 5 : Organisation cellulosome (Fontes et Gilbert, 2010).....	13
Figure 6 : Représentation schématique de l'hydrolyse zones amorphes et microcristallines de cellulose par des cellulases libres (A) et par des cellulases organisées en cellulosome (B) (Lynd <i>et al.</i> , 2002).....	13
Figure 7 : Modèle de la dégradation de la cellulose par les enzymes caractérisées de <i>Fibrobacter succinogenes</i> (Fonty <i>et al.</i> , 1995).....	13
Figure 8 : Schéma du métabolisme des glucides pariétaux dans le rumen (d'après Van Soest, 1982 cité par Thivend <i>et al.</i> , 1985).....	14
Figure 9 : Evolution de la production d'AGV dans le rumen en fonction du pH (Kaufman, Hagemester, et Durksen, 1980).....	14
Figure 10 : Schéma du tractus digestif des volailles et valeurs des pH des contenus digestifs (Farmer, 1942).....	10
Figure 11 : Schéma de la production de bioéthanol à partir de blé	20
Figure 12 : Schéma de la production de Biodiesel à partir de Colza	21
Figure 13 : Structure d'une graine de soja (d'après Keshun 1999).....	29
Figure 14 : Méthode de simulation du système digestif du poulet (Tervilä-Wilo <i>et al.</i> , 1996).....	33
Figure 15 : Activités enzymatiques endoglucanase et cellobiase des différents extraits ruminiaux	49
Figure 16 : Activités enzymatiques exoglucanase et cellulase brute des différents extraits ruminiaux	49
Figure 17 : Hydrolyse des coproduits par l'extrait ruminal dans les conditions intestinales du poulet de chair (15 ml/g de substrat).....	61
Figure 18 : %age de cellulose hydrolysée au sein de chaque coproduit suite à l'action de 15 ml d'extrait brut dans les conditions intestinales du poulet de chair	61

Figure 19 : Perte d'activité enzymatique de l'extrait ruminal induite par l'action conjuguée de la pepsine et du pH = 3.....	63
Figure 20 : Perte d'activité enzymatique de l'extrait ruminal induite par l'action dénaturante du pH = 3	64
Figure 21 : Perte d'activité enzymatique de l'extrait ruminal induite par l'action protéolytique de la pancréatine.....	65
Figure 22 : Quantité de glucose solubilisée par les extraits ruminiaux à partir des différents coproduits au cours de la digestion simulée <i>in vitro</i> et d'une simple hydrolyse (15 ml/ g de substrat)	66
Figure 23 : %age de cellulose hydrolysée par extrait ruminal à partir des différents coproduits au cours de la digestion simulée <i>in vitro</i> et d'une simple hydrolyse (15 ml/g de substrat)	67
Figure 24 : Halo d'hydrolyse observé lors de l'isolement de souches cellulolytiques d'origine ruminale	68
Figure 25 : Photographie par microscopie de cellules bactériennes du type <i>Bacillus niabensis</i> issues d'une culture sur milieu RGCA.....	69
Figure 26 : Morphologie de <i>Bacillus niabensis</i> : A. : Photo par microscopie d'une colonie de <i>Bacillus niabensis</i> repiquée sur milieu RGCA – B. : Photo par microscopie d'une colonie de <i>Bacillus niabensis</i> repiquée sur milieu 868 – C. : Colonies de <i>Bacillus niabensis</i> repiquées sur milieu RGCA – D. : Colonies de <i>Bacillus niabensis</i> repiquées sur milieu 868.....	70
Figure 27 : Mise en évidence activité cellulolytique de <i>Bacillus niabensis</i> par test au Rouge Congo	72
Figure 28 : Mise en évidence activité xylanase de <i>Bacillus niabensis</i> sur milieu AZCL-xylane	62
Figure 29 : Evolution de la biomasse et de la densité optique au sein d'une culture de <i>Bacillus niabensis</i> en milieu 863.....	74
Figure 30 : Evolution de la biomasse et de la densité optique au sein d'une culture de <i>Bacillus niabensis</i> en milieu 863 + CMC.....	75
Figure 31 : Activités fibrolytiques induites au sein des milieux caractérisés par un rapport C/N = 30.....	81

Liste des tableaux

Tableau 1 : Temps de rétention principaux (minutes) du chyme dans les segments successifs du tractus gastrointestinal des poules pondeuses et des poulets de chair (d'après Van der Klis,1997) ...	15
Tableau 2 : Exemples d'enzymes exogènes utilisées en alimentation animale.....	31
Tableau 3 : Volume d'eau distillée ajoutée en fonction du type d'activité enzymatique	30
Tableau 4 : Teneur en cellulose et lignine des différents coproduits.....	31
Tableau 5 : Dénombrements effectués au cours des tests de sporulation de <i>Bacillus niabensis</i> cultivé en milieu liquide durant 24h (CFU/ml)	71
Tableau 6 : Tests d'antagonisme de <i>Bacillus niabensis</i> vis-à-vis de moisissures	71
Tableau 7 : Valeurs en fonction du temps de la DO, du pH et de la biomasse au sein d'une culture de <i>Bacillus niabensis</i> en milieu 863.....	74
Tableau 8 : Masse cellulaire de <i>Bacillus niabensis</i>	75
Tableau 9 : Valeurs en fonction du temps de la DO, du pH et de la biomasse au sein d'une culture de <i>Bacillus niabensis</i> en milieu 863 + CMC	76
Tableau 10 : Evolution de la biomasse de <i>Bacillus niabensis</i> au sein du bioréacteur	77
Tableau 11 : Effet de la lyophilisation sur la population bactérienne	77
Tableau 12 : Rendement de centrifugation et lyophilisation obtenus à partir des milieux de culture en bioréacteur.....	67
Tableau 13 : Activités enzymatiques induites au sein du milieu à base de drèches de blé	68
Tableau 14 : Activités enzymatiques induites au sein du milieu à base de drèches et de xylane..	69

Liste des abréviations

AGV : Acide Gras Volatil
AZCL : Azurine Crosslinked
CBM : Carbohydrate-Binding modules
CDS : Condensed Distillers Solubles
Cell. : Cellulaire
CFU : Colony-Forming Unit
CMC : Carboxyméthylcellulose
Conc. : Concentration
DDG : Distillers Dried Grains
DDGS : Distillers Dried Grains with solubles
DDS : Distillers Dried Solubles
DNS : Dinitrosalicylique
EMHV : Ester Méthylique d'Huile Végétale
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting
g : gramme
h : heure
l : litre
MS : Matière Sèche
PBS : Phosphate Buffered Saline
PDA : Potatoes Dextrose Agar
PNP : Para nirtophénol
PNPG : Para nitrophénol glucopyranoside
RGCA : Rumen Glucose Cellobiose Agar
rpm : rotation par minute
SGF : Simulated Gastric Fluid
SIF : Simulated Intestinal Fluid
UI : Unité Internationale

Chapitre 1 : Cadre du travail

1 Le devenir de l'amidon en alimentation animale - Constat

La compétition pour l'utilisation des céréales destinées aux animaux monogastriques (principalement en aviculture) et destinées à l'homme ne cesse d'augmenter. La croissance de la population mondiale et la demande croissante en protéines animales dans nos régimes alimentaires sont les principaux acteurs de cette compétition.

Les répercussions sont fort marquées en Région Wallonne étant donné l'augmentation des productions avicoles et l'importante superficie des surfaces emblavées en céréales destinées à l'aviculture de type semi-intensif et intensif de cette région.

Les conséquences de cette compétition associée à l'application des directives européennes émanant du protocole de Kyoto impliquent qu'il est légitime de s'interroger de la pérennité de l'amidon dans l'alimentation des volailles (Beckers, 2009).

2 Les directives européennes visant à réduire l'émission de gaz à effet de serre dans le secteur des transports - Opportunités

En vue de respecter ses engagements pris notamment lors de la conférence de Kyoto (1997) et visant à réduire l'émission de gaz à effets de serre, l'Union Européenne a mis au point une stratégie ayant pour but le développement de l'utilisation de biocarburants dans le secteur des transports. Concrètement, cette stratégie s'est traduite par l'émission de plusieurs directives :

- Directive 2003/30/CE adoptée le 8 mai 2003 et prévoyant que les biocarburants représentent au minimum 2% des carburants mis en vente pour les transports au sein de l'Union Européenne en 2005 et 5,75 % en 2010.
- Directive 2009/28/CE adoptée le 23 avril 2009 et remplaçant la directive de 2003. Cette dernière contrairement à la précédente fixe des objectifs contraignants pour les états membres. Elle vise l'incorporation de 10% de biocarburants sur le marché total des carburants destinés aux transports au sein de l'UE.

L'implantation des industries de biocarburants en Région Wallonne (Feluy, produisant du biodiesel depuis 2007 et de capacité équivalente à 200.000 t/an et Biowanze, produisant 300.000 m³ de bioéthanol/an) permettra à la Belgique d'atteindre les objectifs relatifs à ces directives. L'intégration de ces nouvelles normes dans le secteur des transports aura des répercussions importantes sur la disponibilité en produits ligno-cellulosiques. Actuellement, on peut considérer ces coproduits comme une ressource intéressante dans notre région notamment en termes de nutrition animale. Leur valorisation constitue un atout majeur pour faciliter l'intégration de ces nouvelles directives dans notre pays.

3 Projet de la Direction Générale opérationnelle Agriculture, Ressources naturelles et Environnement

Ce travail de fin d'études s'intègre dans un projet de recherche subsidié par la Région Wallonne. Il s'intitule « Valorisation par la volaille des hydrates de carbone de structure issus des industries agro-alimentaires : effets des enzymes fibrolytiques ruminales ». L'objectif de ce projet est d'étudier la possibilité d'utiliser des enzymes fibrolytiques extraites du rumen dans l'alimentation des volailles de manière à valoriser d'avantage des aliments riches en hydrates de carbone de structure, dont la cellulose. Ce projet est multidisciplinaire et comporte trois aspects :

- *In vitro* : Production d'un extrait brut riche en enzymes fibrolytiques ruminales et ses potentialités cellulolytiques sur les coproduits agro-industriels
- *Ex vivo* : Production d'enzymes fibrolytiques en bioréacteurs
- *In vivo* : Validation de l'utilisation d'enzymes fibrolytiques dans l'alimentation des monogastriques

Chapitre 2 : Synthèse **bibliographique**

1 Métabolisme des glucides dans le rumen

1.1 Le rumen

Les ruminants dont fait partie la vache, sont des polygastriques, c.-à-d. qu'ils ont la particularité de posséder un estomac plurilobulaire composé de quatre compartiments. On retrouve en fait trois « pré-estomacs » (rumen, réseau, feuillet) situés en amont de la caillette, qui peut être considérée comme l'équivalent de l'estomac des monogastriques puisqu'il s'agit de la seule poche contenant des glandes gastriques et donc la seule où des sécrétions gastriques se produisent.

Chez la vache, le rumen représente 90% du volume des estomacs (250 à 300 litres), ou encore 70 à 75% du volume total de l'appareil digestif. Le rumen, premier des trois pré-estomacs communique très largement avec le second pré-estomac, le réseau. Ensemble, ils forment le réticulo-rumen. Dans cette large poche, les aliments sont imbibés de liquide et subissent une fermentation sous l'action symbiotique d'une grande diversité microbienne. La mastication mérycique caractéristique des ruminants facilite cette dégradation des aliments en réduisant les fractions alimentaires les plus grossières en fines particules. Cette réduction de taille des particules alimentaires rend également possible leur passage vers l'aval du système digestif. Le réseau empêche en effet le passage de particules de taille trop importante vers le feuillet.

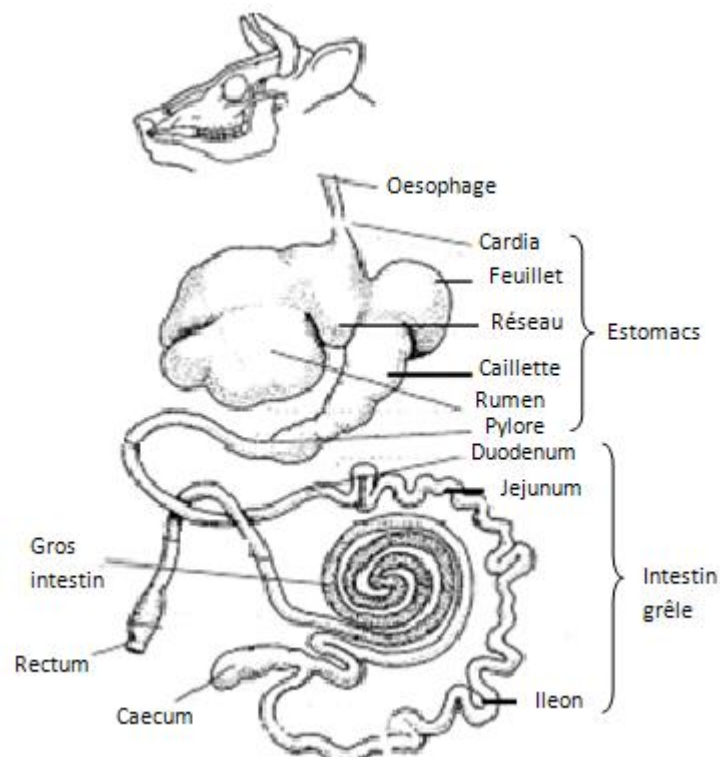


Figure 1 : Schéma du système digestif de la vache

Au sein du rumen, on distingue trois phases : une phase gazeuse, une phase solide organisée selon la taille et la densité des particules et une phase liquide. Les bols alimentaires surnagent

d'abord au-dessus de la phase liquide, puis s'y enfoncent en se ramollissant et en s'homogénéisant. Ils séjournent dans cette poche entre 30 et 70h, ce qui permet aux micro-organismes d'attaquer les parois cellulodiques et de faciliter la libération du contenu cellulaire.

L'eau contenue dans le rumen et provenant des aliments, de l'abreuvement et des sécrétions salivaires est très importante pour de nombreuses réactions : elle représente à elle seule environ 85% du contenu ruminal (Rémond *et al.*, 1995). D'une part, elle sert de support aux particules en suspension (particules alimentaires et micro-organismes) mais également aux nombreuses molécules en suspension. D'autre part, elle imbibe les aliments ingérés et facilite leur dégradation mécanique en donnant au contenu une texture compatible avec les différents mouvements de brassage et de transit. Sans elle, aucune action microbienne ne serait possible. Enfin, elle permet aux sels de s'ioniser et elle constitue le substrat privilégié des réactions d'hydrolyse des polymères organiques.

1.1.1 Conditions physico-chimiques

Le rumen est un véritable fermenteur naturel dans lequel règnent des conditions physico-chimiques stables. La plus caractéristique étant sans aucun doute l'anaérobiose qui implique des potentiels rédox très bas de l'ordre de -250 à -400 mV. A côté de cette anaérobiose, on peut citer la concentration importante en CO₂, il représente en effet à lui seul 65% des gaz constituant la poche surmontant la masse fibreuse du rumen (Rémond *et al.*, 1995). Ensuite, un autre paramètre important du rumen est le pH qui règne en son sein. Un pH légèrement acide généralement compris entre 6,0 et 7,0 et tamponné par l'apport de minéraux (carbonates, phosphates) contenus dans la salive. Des perturbations de ce pH peuvent cependant avoir lieu suite à une alimentation trop pauvre en fibres (aliments concentrés) qui induit une fermentation rapide et une réduction de la mastication qui elle-même induit une diminution de la production de salive contenant les éléments tampons. Enfin, la température est maintenue à 39°C et comme dit précédemment la teneur en eau est très importante puisqu'elle représente 85 % du contenu ruminal (Rémond *et al.*, 1995).

1.1.2 Le microbiome ruminal

1.1.2.1 Description générale

Chez les ruminants, l'originalité de leur mode de digestion réside dans le fait que tout l'équilibre microbien prend part à la digestion des aliments. Ils vivent ainsi en symbiose avec leur hôte. Comme il a déjà été décrit précédemment, le rumen constitue un véritable fermenteur naturel, offrant des conditions physiques et chimiques stables qui favorisent le développement de trois grands types de micro-organismes : les bactéries, les protozoaires et les champignons. L'ensemble des espèces présente des fonctions métaboliques spécialisées parfois très limitées mais diversifiées ce qui permet un large recouvrement et ainsi la formation d'un véritable écosystème comprenant tous les types de vie communautaire.

Les fonctions essentielles de ces micro-organismes du rumen, sont la dégradation et la fermentation des polysaccharides constitutifs des parois végétales contenues dans les aliments en composés assimilables par l'hôte qui les héberge. Même si les bactéries cellulolytiques sont irremplaçables pour mener à bien ces fonctions puisqu'elles sont les seules productrices des enzymes nécessaires à la dégradation des composés cellulosiques, les autres espèces de micro-organismes n'en sont pas moins indispensables. En effet, la présence et les activités des bactéries cellulolytiques dépendent de celles des autres espèces présentes dans le rumen qui leur procurent un ensemble de composés indispensables qu'elles ne peuvent synthétiser elles-mêmes (l'ammoniac) ou qui au contraire dégradent des composés néfastes.

La population bactérienne est la plus dense des trois populations avec jusqu'à 10^9 bactéries/ml de jus de rumen pour 10^5 protozoaires/ml de jus de rumen, elle est également la plus complexe avec plus de 200 espèces et la plus active. Elle constitue en fait à elle seule plus de la moitié de la biomasse microbienne du complexe réticulo-rumen. On peut les retrouver soit sous forme libre, fixées sur des particules alimentaires, fixées à la surface des protozoaires et champignons ou encore fixées à l'épithélium du rumen. La population bactérienne fixée aux particules alimentaires est numériquement prédominante ; elle représente plus de 75% du total de la population de microorganismes et de la production d'ATP microbien dans le rumen (Craig *et al.*, 1987). Une autre de leurs caractéristiques est leur caractère anaérobique, strict ou facultatif. Il est intéressant de noter que les bactéries cellulolytiques représentent entre 4 et 9 % de la population bactérienne totale (Michalet-Doreau *et al.*, 2001) voir même 17 % (Martin *et al.*, 2001)

Tout comme les bactéries, les protozoaires interviennent dans la digestion des fibres et de la cellulose, mais leur action caractéristique est la phagocytose permanente des bactéries participant ainsi à l'équilibre de l'écosystème microbien.

Les champignons quant à eux représentent une biomasse importante, et jouent un rôle important dans la digestion des fibres en brisant les structures végétales. Cette action facilite alors l'action des autres micro-organismes. Ils sont anaérobies stricts et peuvent également hydrolyser la cellulose et les hémicelluloses.

1.2 Phase d'hydrolyse

L'hydrolyse est la première des deux phases intervenant dans la dégradation des hydrates de carbones au niveau du rumen. L'hydrolyse de ces constituants des aliments est réalisée grâce aux enzymes microbiennes. Cependant, tous les glucides ne sont pas hydrolysés de manière identique, les vitesses d'hydrolyse et les proportions hydrolysables étant variables. L'amidon étant par exemple hydrolysé en totalité et rapidement alors que les glucides pariétaux que sont la cellulose et les hémicelluloses (voire les substances pectiques) ne sont que partiellement hydrolysés et ce de manière assez lente. L'hydrolyse de la cellulose sera au centre des recherches menées au cours de ce travail.

1.2.1 La cellulose

La cellulose est le polymère le plus abondant du règne végétal et le polysaccharide le plus abondant sur terre (Bayer *et al.*, 1998). Cet homopolymère de glucose est un composant majeur des parois végétales. Celles-ci sont composées d'eau et :

- de lignine, composé non-glucidique, polymère de phényle propane formant un réseau tridimensionnel ;
- d'hémicelluloses, hétéropolymères de pentose et/ou d'hexoses ;
- de substances pectiques, ensemble complexe de polysaccharides reliés entre eux ;

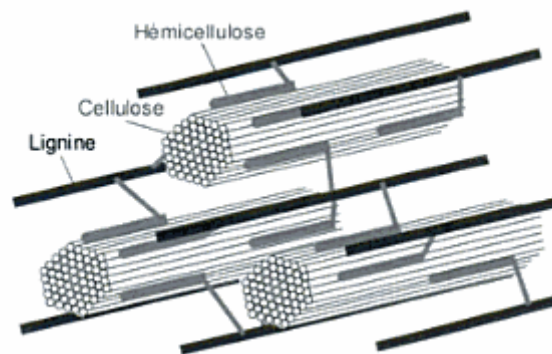


Figure 2 : Schéma du réseau compact formé par la lignine avec la cellulose et l'hémicellulose (Didderen *et al.*, 2008)

L'enveloppe cellulaire végétale, peut être divisée en trois couches : la lamelle moyenne essentiellement composée de pectines solubles et qui assure la cohésion entre les cellules voisines, la paroi primaire et la paroi secondaire. La paroi primaire est organisée sous forme d'un réseau lâche de microfibrilles de cellulose incrustées de lignine qui s'enchevêtre dans une matrice amorphe composée d'un enchevêtrement de divers polysaccharides et d'une proportion plus faible de structures protéiques et qui joue le rôle de ciment permettant la cohésion de l'ensemble.

La cellulose représente jusqu'à 45% des parois des plantes fourragères (Jarrige *et al.*, 1995). Elle est formée de longues chaînes d'unités D-glucose, son degré de polymérisation peut en effet atteindre 15 000. Ce degré de polymérisation est très important car il influence les propriétés physiques de la cellulose. Les unités glucose constitutives de cette dernière sont liées via des liaisons β (1-4), c'est à ce niveau que la cellulose se différencie de l'amidon. Les liaisons α (1-4) de l'amidon sont rompues par des amylases (présentes chez l'ensemble des mammifères) alors que les liaisons β (1-4) de la cellulose ne peuvent être hydrolysées que par des enzymes d'origine microbienne, les cellulases qui contrairement aux précédentes ne sont présentes que chez un nombre restreint de mammifères.

Une caractéristique très importante de la cellulose est son organisation sous forme de fibres, elles-mêmes constituées de microfibrilles. En effet, les atomes des chaînes moléculaires sont reliés entre eux par des liaisons covalentes tandis que les chaînes moléculaires sont elles-mêmes liées par

des liaisons hydrogènes entre les différents groupements hydroxyles des unités glucose, cette association de chaînes donne ainsi naissance aux microfibrilles. Un nombre infini de possibilités existe pour l'organisation de ces chaînes moléculaires, cependant on peut distinguer deux formes limites idéales :

- La forme cristalline correspondant à un état d'ordre parfait.
- La forme amorphe qui correspond à un agrégat de molécules disposées irrégulièrement.

De cette organisation en microfibrilles de la cellulose découle une autre caractéristique de ce polymère naturel, son insolubilité dans l'eau. En effet, les liaisons hydrogènes formées entre les groupements hydroxyles de chaînes adjacentes bloquent ces derniers et empêchent la pénétration de l'eau surtout au niveau des zones cristallines très ordonnées. Au niveau des zones amorphes, l'eau peut pénétrer mais elle ne provoque pas un affaiblissement suffisant des liaisons pour permettre la solubilisation.

1.2.2 Bactéries cellulolytiques

Parmi l'ensemble des bactéries présentes dans le rumen, les espèces cellulolytiques sont les seules capables d'hydrolyser la cellulose. Il existe en fait quatre espèces dominantes capables de dégrader la cellulose : *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*. Les deux premières sont des bacilles alors que les deux suivantes sont des coques.

Fibrobacter succinogenes est une espèce Gram négatif hydrolysant les formes cristallines de la cellulose mais également les hémicelluloses. Elle peut fermenter aussi bien le cellobiose et le glucose pour produire de l'acide succinique (Fonty *et al.*, 1995).

Butyrivibrio fibrisolvens est également Gram négatif vu sa forme de bacille. Elle est capable de fermenter une large gamme de substrats présents dans le rumen et produit d'importantes quantités d'acide butyrique (Fonty *et al.*, 1995). Cette espèce cellulolytique participe également à la protéolyse, elle est donc capable d'hydrolyser les parois végétales. De plus, elle peut hydrogéner les lipides et participe à la protéolyse.

Enfin les deux espèces de coques sont les plus nombreuses et sont très actives voire les plus actives pour dégrader les parois végétales. Contrairement à *Fibrobacter succinogenes*, elles hydrolysent de préférence les zones amorphes de la cellulose.

Besoin en minéraux des bactéries

Les minéraux sont indispensables à la vie des microorganismes au sein du rumen. Si certains, comme le phosphore, le soufre et le magnésium sont directement essentiels aux microorganismes cellulolytiques du rumen, d'autres comme le sodium, le potassium et le calcium ont par contre une action indirecte sur la croissance des bactéries. Ils assurent le maintien de conditions physico-chimiques favorables grâce notamment à leur pouvoir tampon qui empêche l'abaissement du pH. En effet, un pH inférieur à six exerce un effet nettement dépressif sur la cellulolyse (Jouany *et al.*, 1995).

Lorsque le régime alimentaire des animaux est carencé en l'un des éléments directement essentiels, une chute de la dégradation des parois végétales est observée puisque ces éléments assurent le bon fonctionnement des enzymes cellulolytiques. En plus de cette perte d'activité, la croissance microbienne des bactéries cellulolytiques est également directement affectée par ce manque de minéraux. Elles sont par exemple les premières à disparaître lorsque la ration est carencée en soufre (Akin *et al.*, 1983). Pour éviter toute carence en l'un de ces minéraux, les besoins des animaux ont été déterminés *in vitro*. Cependant, il est impératif d'adapter ces valeurs aux réels besoins rencontrés *in vivo* en tenant compte de différents facteurs liés au métabolisme.

En parallèle de ces minéraux, un oligo-élément, le cobalt, est également un facteur limitant pour la croissance des microorganismes en cas de carence. Ils l'utilisent en effet de manière préférentielle en vue de la synthèse de la vitamine B12. De plus, le cobalt stimule la digestion ruminale chez la vache (Jouany *et al.*, 1995).

Les facteurs de croissance et vitamines

Les facteurs de croissance se définissent comme des substances strictement nécessaires ou hautement stimulatrices de la croissance des microorganismes bien que non impliquées dans le métabolisme énergétique (Jouany *et al.*, 1995). Les principaux facteurs de croissance reconnus comme nécessaires aux bactéries cellulolytiques sont les acides gras à courte chaîne, certaines molécules aromatiques (acides phénylpropanoïque et phénylacétique), l'hémine et la naphthoquinone. Ces besoins spécifiques sont normalement satisfaits par l'intermédiaire des interactions nutritionnelles se déroulant au sein du rumen. En ce qui concerne les vitamines, ce sont les vitamines du groupe B et K et la choline qui sont nécessaires à la croissance des bactéries ruminales. Ces besoins sont de nouveau satisfaits par le biais des synthèses se déroulant au sein du rumen (Jouany *et al.*, 1995).

1.2.2.1 Enzymes cellulolytiques

1.2.2.1.1 Activités cellulolytique

L'association des quatre types d'activités enzymatiques suivantes est nécessaire pour dégrader complètement la cellulose en glucose (voir Figure 3) :

- Endo- β -glucanase : hydrolyse au hasard de liaisons glucosidiques β (1-4) internes d'une chaîne dans les zones amorphes.
- Exo-glucanase : hydrolyse les chaînes de β (1-4) glucanes à partir de l'extrémité réductrice pour libérer du glucose.
- Cellobiohydrolase : hydrolyse à partir de l'extrémité (activité exoglucanase) non réductrice des chaînes avec libération de cellobiose.
- Cellobiase ou β -glucosidase : Hydrolyse du cellobiose en deux unités glucose.

L'hydrolyse de la forme cristalline de la cellulose nécessite la présence de nombreux enzymes ayant différents modes d'actions et agissant en synergie (Jarrige *et al.*, 1995)

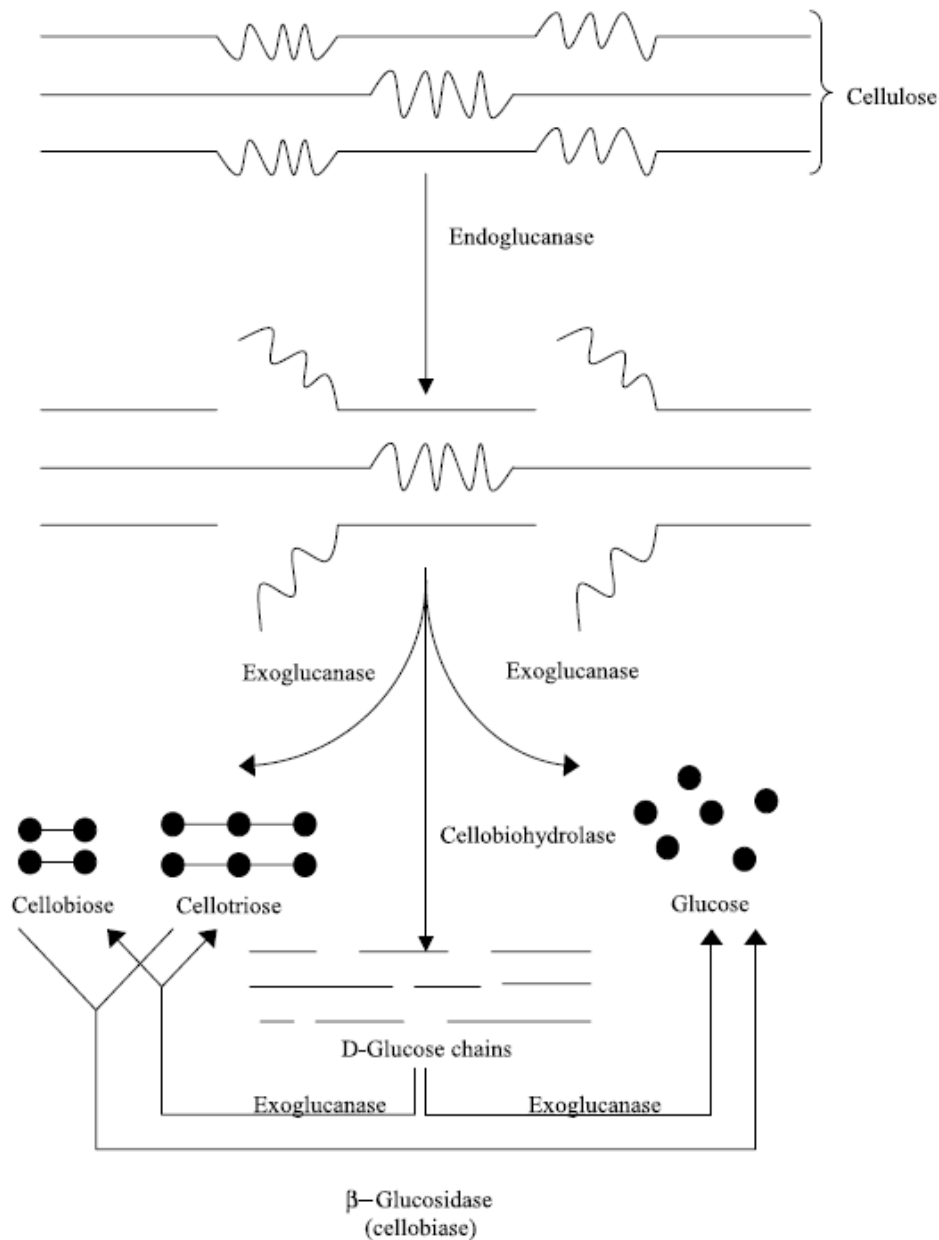


Figure 3 : Représentation schématique de l'action des enzymes cellulolytiques (Krause, et al., 2003)

1.2.2.1.2 Cellulosome

a) Introduction

Le cellulosome est un complexe multienzymatique que l'on retrouve lié à la surface de nombreux microorganismes dégradant la cellulose. Il orchestre en effet la dégradation, par les bactéries, de la cellulose, des hémicelluloses mais également des substances pectiques. Les microorganismes élaborant ce type de complexe sont typiquement retrouvés dans des environnements anaérobiques (Lynd *et al.*, 2002). Le développement de ce type de structure chez les bactéries anaérobiques pourrait être dû à la perte, par ces espèces, d'une capacité à pénétrer au sein du substrat cellulosique (capacité que possède par exemple les champignons via leurs hyphes). En effet, en

compétition avec d'autres microorganismes et avec une faible quantité d'ATP disponible pour la synthèse de cellulase, elles ont du développer un système efficace pour hydrolyser la cellulose.

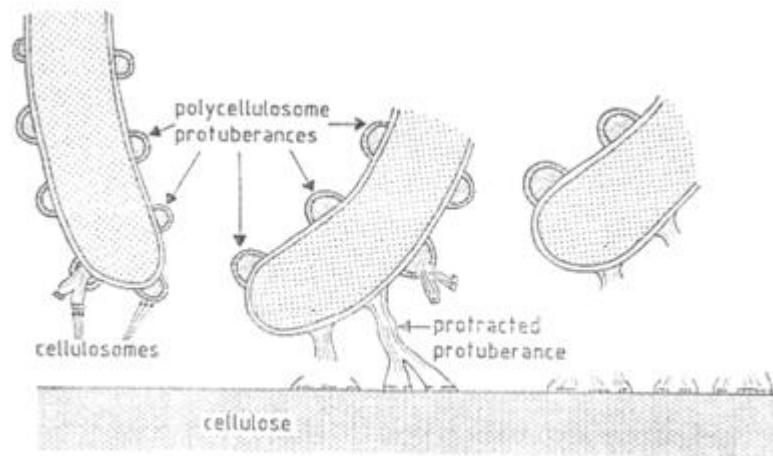


Figure 4 : Représentation schématique de l'interaction entre les polycellulosomes présents à la surface de *C. thermocellum* et la surface cellulosique (Bayer et Lamed, 2006)

Il est important de noter qu'il existe une très grande diversité d'organisations des cellulosomes et ce même au sein d'une même souche. On peut en effet observer une variabilité importante au niveau de l'organisation du cellulosome chez l'une des quatre souches majeures composant la flore ruminale, *Ruminococcus flavefaciens*. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer dans ce cas-ci par la complexité et la diversité des substrats lignocellulosiques présents dans le rumen (Fontes et Gilbert, 2010).

b) Description de l'organisation générale d'un cellulosome

Ce complexe macromoléculaire est en fait composé de plusieurs enzymes venant se fixer via des interactions protéiques sur une protéine « échafaudage » appelée « scaffoldin ». Ces interactions interviennent entre deux domaines spécifiques : le domaine dockerin et le domaine cohesin. Le premier faisant partie de l'enzyme alors que le second est un domaine de la protéine « échafaudage ».

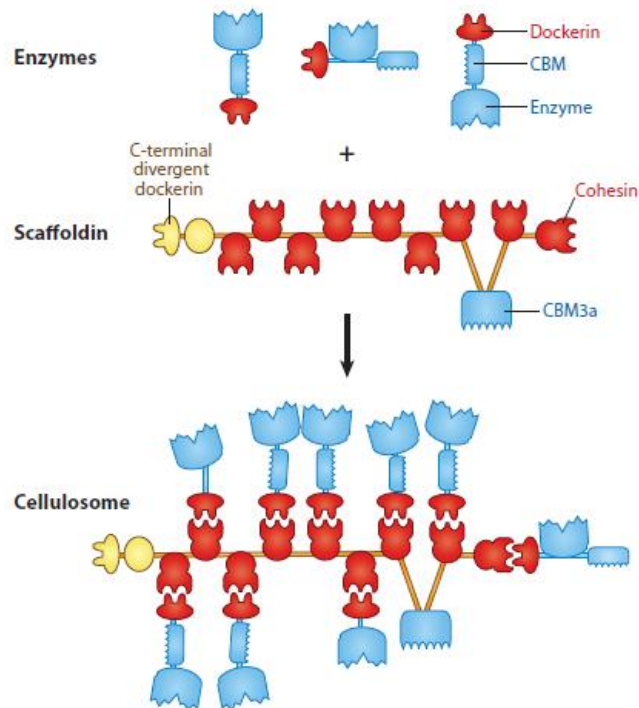


Figure 5 : Organisation cellulosome (Fontes et Gilbert, 2010)

Chez certaines espèces de bactéries cellulolytiques comme *Clostridium thermocellum*, des protéines de surface possèdent plus d'un domaine cohesin ce qui permet à plusieurs cellulosomes de se lier à une seule d'entre elles et d'ainsi former un polycellulosome (voir Figure 4).

c) *Liaison cellulosome-substrat*

Les liaisons entre les cellulosomes et les substrats s'effectuent à l'aide de modules intégrés dans certaines protéines, les Carbohydrate-Binding modules ou CBMs. Ils existent de nombreux types de CBMs qui ont été classés en trois groupes différents (Fontes et Gilbert, 2010):

- type A : interagit avec les zones cristallines des polysaccharides (principalement la cellulose)
- type B : se lie à une région interne de chaîne simple de glycane
- type C : reconnaît des saccharides de petites tailles ou les extrémités de polysaccharides complexes.

d) *Action des enzymes*

De très nombreuses enzymes « cellulosomiques » sont produites par les différentes souches. *Rumunicoccus flavefaciens* produit plus de 200 enzymes différentes (Fontes et Gilbert, 2010). Cette très grande diversité d'enzymes est due à la complexité de l'organisation des cellules constituant les parois végétales.

L'efficacité de l'hydrolyse des différents substrats comme par exemple la cellulose, résulte donc de l'action coopérative de ces nombreuses enzymes d'activités différentes. Cette coopération des enzymes étant favorisée par la proximité spatiale imposée par l'organisation sous forme de cellulosome et résulte en une activité enzymatique totale supérieure à la somme des activités

enzymatiques individuelles (synergie). Quatre types de synergie semblent exister au sein des cellulosomes (Lynd *et al.*, 2002):

- Endo-exo synergie entre les endo- et exoglucanases
- Exo-exo synergie entre les exoglucanases fonctionnant à partir des bouts réducteurs et celles procédant à partir des bouts non-réducteurs des chaînes de cellulose
- Synergie entre les exoglucanases et les β -glucosidases
- Synergie intramoléculaire entre les domaines catalytiques des enzymes et les CBMs

La formation de ce complexe multienzymatique induit également une très forte proximité entre le substrat et la cellule, minimisant ainsi les pertes, par diffusion, des produits d'hydrolyse.

1.2.2.2 Mécanismes d'adhésion des principales bactéries cellulolytiques du rumen

Comme énoncé précédemment, les différentes bactéries du rumen se présentent sous des formes variées : libres, associées à des particules alimentaires, à l'épithélium ou à d'autres organismes contenus dans le rumen. Les bactéries se fixant aux particules alimentaires prédominent et sont responsables d'une part très importante des différentes activités enzymatiques que l'on retrouve dans le rumen (amylase, protéase, endoglucanase et xylanase). Elles jouent un rôle primordial dans la digestion des particules alimentaires.

Les procédés d'adhésion mis en place par trois espèces prédominantes de la flore du rumen (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*) ont été étudiés par de nombreux auteurs. Ceux-ci peuvent être divisés en quatre étapes principales (Miron *et al.*, 2001):

- 1) Transport de la bactérie non motile jusqu'au substrat d'hydrolyse
- 2) Adhésion initiale non spécifique de la bactérie à des sites non protégés du substrat
- 3) Adhésion spécifique au substrat
- 4) Prolifération des bactéries liées au substrat potentiellement digestible

Il est important de noter que le bon déroulement de chacune de ces étapes dépend de la réussite de l'étape précédente. Ces quatre étapes sont toutes indispensables pour que la bactérie puisse adhérer correctement au substrat.

➤ Transport de la bactérie non motile jusqu'au substrat d'hydrolyse

Cette première étape est assez délicate pour les principales bactéries du rumen. En effet, celles-ci sont dépourvues d'organe moteur comme les flagelles ou les cils. La colonisation des particules alimentaires résulte en fait du contact entre ces dernières et les bactéries libres dans le fluide ruminal. Une population de bactéries cellulolytiques libres existe toujours au sein du rumen, il est impossible que l'ensemble des bactéries soit lié au même moment à la cellulose. On retrouve au sein de cette population des bactéries non-adhérentes et des cellules filles provenant de la division de cellules ayant déjà colonisé d'autres particules. La colonisation peut également être le résultat d'un contact direct entre une particule vierge entrant dans le rumen et une fibre déjà colonisée. Malgré cette absence de moyen de déplacement et le faible mouvement du bol digestif dans le rumen, ce

mécanisme de colonisation se déroule avec une assez grande rapidité suite à la concentration importante en bactéries libres dans la phase liquide et à une concentration tout aussi importante en fibres (Weimer, 1996).

➤ **Adhésion initiale non spécifique**

L'adhésion non spécifique des bactéries au substrat peut être définie comme la combinaison de procédés réversibles et irréversibles (Pell et Schofield, 1993) :

- Forces physico-chimiques : forces de Van der Waals, interactions hydrophobes, ioniques et électrostatiques ;
- Adaptation de la conformation en fonction de la forme du substrat et localisation dans les cavités des particules ;
- Action de composants du glycocalyx bactérien (Cellulose Binding Protein).

Cette adhésion des bactéries au substrat s'effectue au niveau des surfaces endommagées des particules de fourrage. En effet, la cutine présente au niveau des tissus végétaux intacts empêche toute adhésion des bactéries au substrat (Akin, 1989). Des prétraitements physiques ou chimiques des substrats permettent d'augmenter le nombre de sites disponibles pour l'adhésion des bactéries en dégradant la couche de cutine protectrice (Miron *et al.*, 2001). Chez les ruminants, c'est la mastication qui assure cette dégradation de la couche protectrice augmentant ainsi la probabilité de liaison non spécifique des bactéries cellulolytiques aux particules de substrat.

Malgré des variations selon les espèces, il apparaît que cette liaison non spécifique au substrat cellulosique s'effectue rapidement. Pour les Ruminococci, seulement 1 à 5 min sont nécessaires pour que les bactéries se fixent au substrat. Pour les bactéries de l'espèce *F.succinogenes* 15 à 30 min sont nécessaires pour atteindre une adhésion maximale (Roger *et al.*, 1990).

➤ **Adhésion spécifique**

L'adhésion spécifique des bactéries au substrat est un procédé au cours duquel les ligands et les adhésines présents au niveau des surfaces cellulaires reconnaissent les récepteurs situés à la surface des tissus végétaux (Pell et Schofield, 1993). Selon Miron *et al.* (1989 et 1990) que les bactéries liées au substrat reçoivent des stimuli durant la digestion initiale des polysaccharides des parois végétales. Stimuli qui induiraient la mise en place de liaisons et la formation d'adhésines entre la couche externe du glycocalyx et les particules attaquées mais qui induiraient également la production des enzymes cellulolytiques.

Cette adhésion spécifique des bactéries au substrat leur procure plusieurs avantages. Premièrement, elle permet une concentration sur le substrat des enzymes cellulolytiques (Pell et Schofield, 1993). De plus, elle engendre l'exclusion d'autres microorganismes des sites d'hydrolyses ce qui permet à la bactérie liée d'avoir un accès privilégié aux produits de dégradation (Pell et Schofield, 1993). Cette adhésion agit également comme une protection pour les bactéries fixées, vis-à-vis des protozoaires du rumen mais également pour les enzymes par rapport aux protéases

contenues dans le rumen (Pell et Schofield, 1993 ; Weimer, 1996). Enfin le temps de rétention au sein du rumen des bactéries liées est multiplié par 3 par rapport à celui des bactéries libres de la phase liquide (Weimer, 1996).

➤ ***Prolifération des bactéries liées au substrat potentiellement digestible***

Au cours de cette étape, les bactéries fixées au substrat se multiplient pour former des colonies au niveau des sites potentiellement digestibles des particules alimentaires (Miron *et al.*, 2001). Il apparaît que les zones et les délais d'attaque du substrat diffèrent en fonction de l'espèce bactérienne ; ceci réduit la compétition entre les différentes espèces.

1.2.2.1 Facteurs influençant l'adhésion

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent affecter les mécanismes d'adhésion (spécifique et non spécifique) des bactéries. Ceux-ci peuvent être regroupés selon leur origine (Miron *et al.*, 2001) :

- la bactérie : âge, condition de l'enveloppe bactérienne et compétition avec les autres microorganismes ;
- le substrat : protection du substrat, surface de contact, hydratation, charge ionique et capacité d'échange de cations ;
- l'environnement : température, pH, présence de cations, présence de carbohydrates solubles et présence d'oxygène.

1.2.3 Dégradation de la cellulose

1.2.3.1 Modèle pour les bactéries formant des cellulosomes

La liaison entre la cellule bactérienne et le substrat cellulosique se réalise par l'intermédiaire du cellulosome, ensuite les enzymes de type endo- et exoglucanase peuvent travailler en synergie pour dégrader la cellulose (Figure 6 B).

Suite à l'action de ces deux types d'enzymes membranaires, il y a formation de résidus cellobiose et cello-oligosaccharides. Ces produits d'hydrolyse pénètrent alors au sein de la cellule où ils sont dégradés jusqu'au stade de glucose.

Sur la Figure 6 A, est représenté le mécanisme de dégradation de la cellulose par des cellulases libres. Cette absence d'organisation des enzymes sous forme de complexe est caractéristique des champignons dégradant la cellulose.

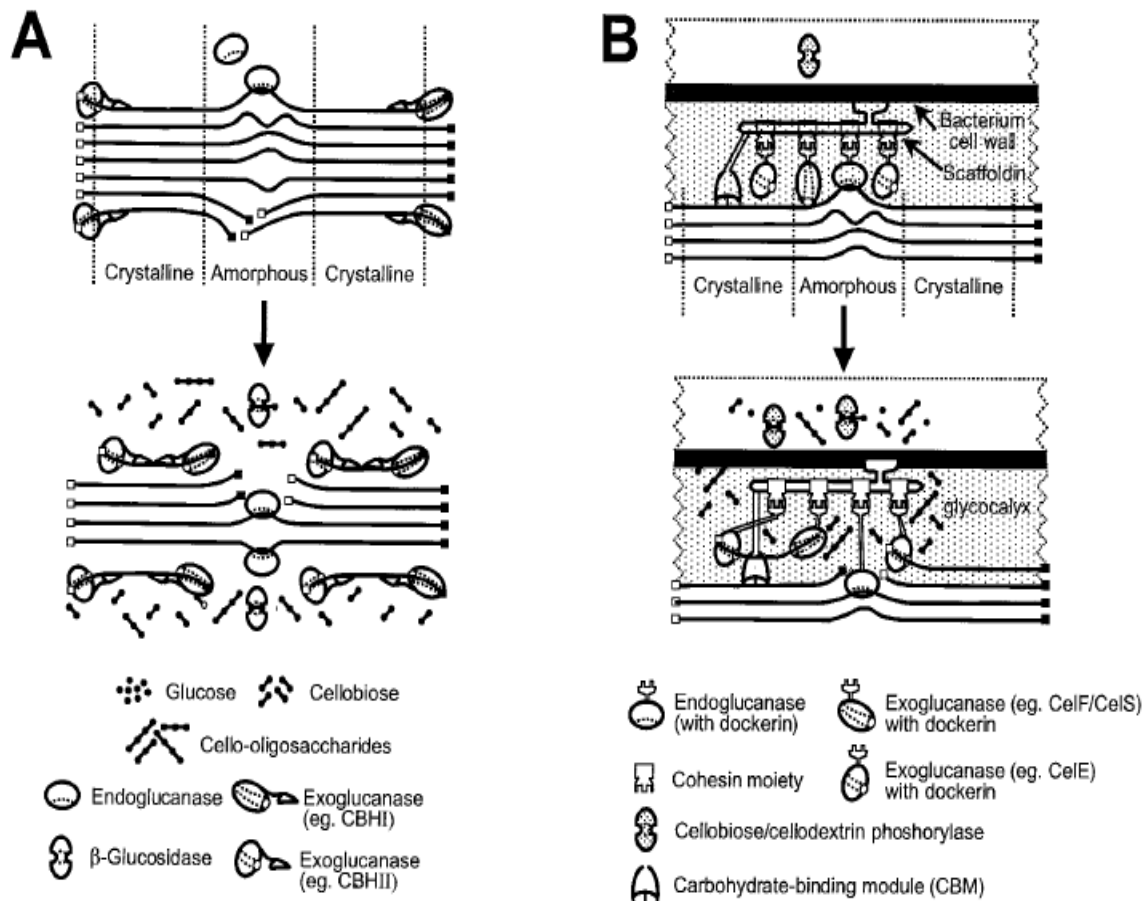


Figure 1 Représentation schématique de l'hydrolyse zones amorphes et microcristalline de cellulose par des cellulases libres (A) et par des cellulases organisées en cellulosome (B) (Lynd, *et al.*, 2002)

1.2.3.2 Modèle proposé pour *Fibrobacter succinogenes*

Selon Fonty *et al.* (1995) et contrairement à *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens*, les enzymes de *F. succinogenes* ne s'associent pas pour former un cellulosome (Figure 7). Les premières enzymes à agir sur le substrat cellulosique sont les enzymes sécrétées dans le milieu extérieur, des endoglucanases et des cellobiohydrolases, et les enzymes exposées à la surface des cellules bactériennes, des endoglucanases également. Ces enzymes externes libèrent suite à leur action du cellobiose ou des cellodextrines solubles qui vont pouvoir traverser la membrane externe des cellules. Au sein du périplasma, ces courtes chaînes de saccharides sont hydrolysées par des cellodextrinases, du cellobiose est alors obtenu suite à l'action de ces dernières enzymes. Ce dernier est ensuite scindé en deux glucoses par une cellobiase située soit au niveau de la membrane cytoplasmique soit au sein du cytoplasme. Le glucose ainsi présent au sein du cytoplasme peut alors être métabolisé par la cellule ou stocké sous forme de glycogène.

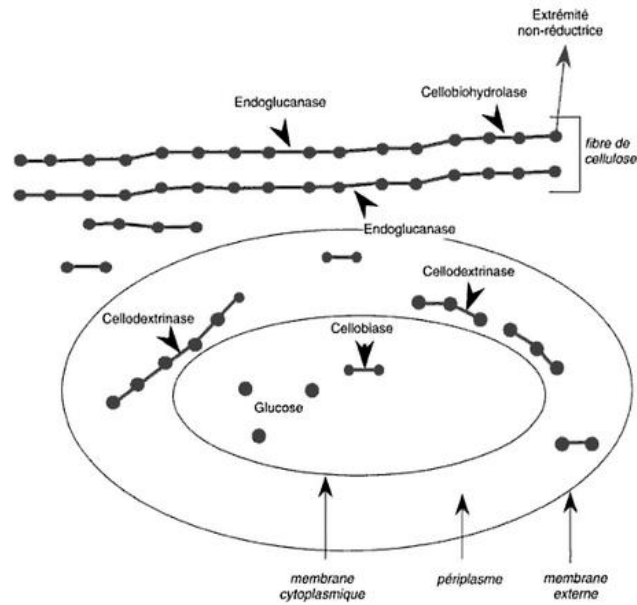


Figure 7 : Modèle de la dégradation de la cellulose par les enzymes caractérisées de *Fibrobacter succinogenes* (Fonty, et al, 1995)

1.3 Phase de fermentation

Après l'action des différentes enzymes cellulolytiques dans le rumen, du glucose se retrouve sous forme libre dans cette partie de l'estomac de la vache où il va alors subir une fermentation anaérobie (Figure 8).

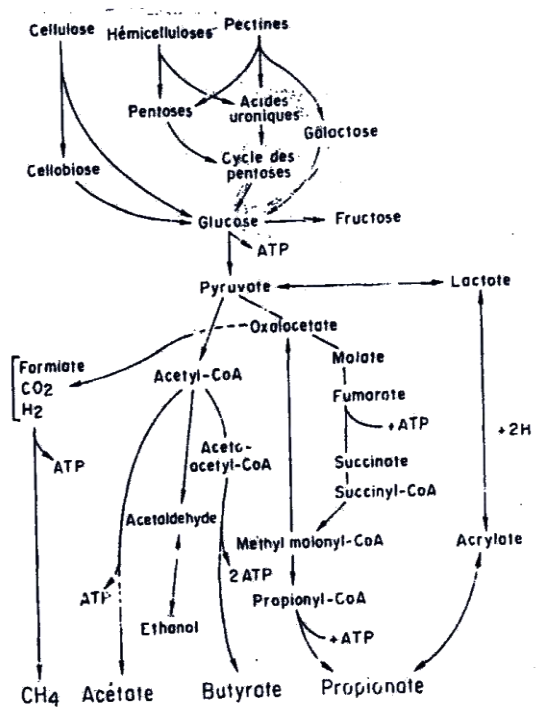


Figure 8 : Schéma du métabolisme des glucides pariétaux dans le rumen (d'après Van Soest, 1982 cité par Thivend et al., 1985)

La première étape de ce processus conduit à la formation de pyruvate (acide pyruvique) et d'ATP. Ensuite, cet acide pyruvique est transformé en différents Acides Gras Volatils qui sont alors absorbés puis métabolisés par l'organisme hôte. Les trois principaux AGV formés à partir de cette substance sont l'acide acétique (C2), l'acide propionique (C3) et l'acide butyrique (C4). Cependant, ils ne sont pas les seuls produits, on assiste également à la production d'acides gras possédant plus de quatre atomes de carbone : l'acide valérique (C5) et l'acide caproïque (C6). La répartition moyenne est la suivante (% molaire) : 60-70 % d'acide acétique, 15-20 % d'acide propionique, 7-14 % d'acide butyrique et 2 à 5 % d'acides > C4. Les proportions de ceux-ci varient également en fonction de la vitesse de fermentation et du pH, c'est-à-dire de la composition de la ration et du faciès bactérien (voir Figure 9).

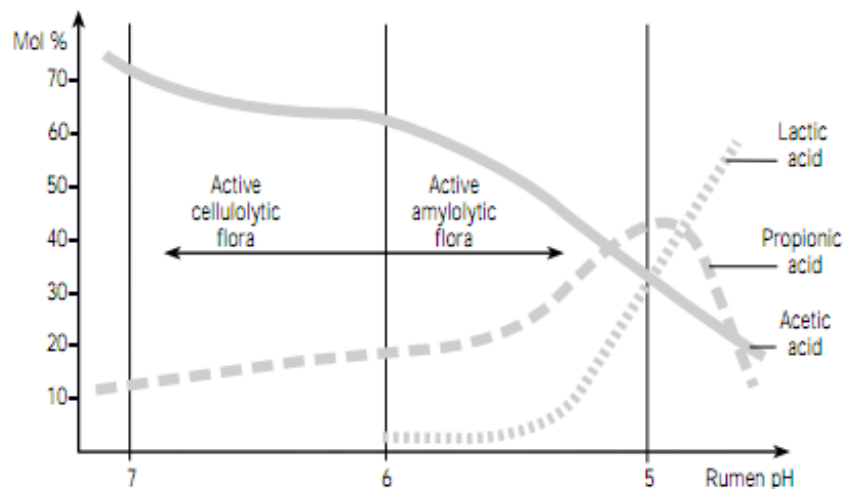


Figure 9 : Evolution de la production d'AGV dans le rumen en fonction du pH (Kaufman, Hagemester, & Durksen, 1980)

Par exemple, si la ration contient beaucoup de pailles végétales, la proportion d'acide acétique augmente ; si la quantité de céréales dans la ration augmente, c'est l'acide propionique qui augmente et si la ration est riche en sucres solubles, la formation d'acide butyrique sera plus importante.

Des gaz sont également produits au cours de cette étape de fermentation, il s'agit principalement du CO₂ (65%) et du méthane (35%). Cette production de méthane induit une perte de 4 à 10% de l'énergie. Cependant cette méthanogenèse réalisée par les bactéries méthaniques du rumen est indispensable car elle permet d'éliminer le H₂ présent dans le milieu qui lorsqu'il est présent en trop grandes quantités, rend le milieu trop réducteur ; ce qui a pour effet de ralentir voire stopper les fermentations.

2 Digestion par la volaille des hydrates de carbone

2.1 Le système digestif des volailles

L'anatomie et la physiologie de l'appareil digestif des espèces aviaires résultent de l'adaptation au vol de ces animaux. Celui-ci se caractérise notamment par sa faible longueur (environ 2 mètres) et par plusieurs organes spécifiques définis ultérieurement.

L'appareil digestif du poulet peut-être divisé en cinq parties classiques : la cavité buccale, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin. Cependant, l'organisation de ces organes diffère fortement de celle que l'on peut notamment retrouver chez les mammifères. La cavité buccale est formée par le bec qui remplace les lèvres que l'on retrouve chez les mammifères et permet donc la préhension des aliments mais également une certaine fragmentation de ceux-ci. Cette cavité est également dépourvue de dents et possède des glandes salivaires peu développées. Au niveau de l'œsophage, on retrouve le jabot. Cet organe est en fait un renflement de l'œsophage, dont l'épithélium est riche en glandes à mucus ce qui permet une humectation et un ramollissement des aliments. L'estomac quant à lui peut être subdivisé en deux parties successives et distinctes : un estomac chimique, le ventricule succenturié et un estomac mécanique, le gésier. L'intestin grêle mesurant environ 1,2m et qui comme chez les mammifères est divisé en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Enfin le gros intestin est très peu développé et se caractérise par la présence de deux caeca. Une autre particularité du gros intestin est la présence d'un cloaque après un court rectum où se rejoignent voies génitales, urinaires et intestinales (Figure 10).

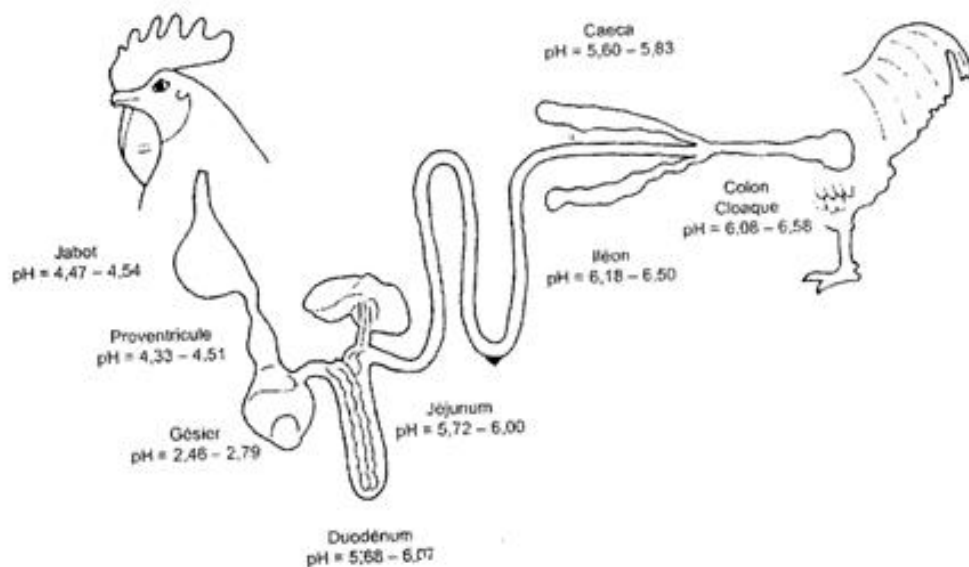


Figure 10 : Schéma du tractus digestif des volailles et valeurs des pH des contenus digestifs (Farmer, 1942)

2.1.1 Fonctionnement et conditions biochimiques du système digestif

Une des particularités du système digestif des espèces aviaires est sa longueur restreinte. Le transit des aliments au sein de l'organisme est donc très rapide, pas plus d'une dizaine d'heures (Larbier et Leclercq, 1992), cependant cette durée est très variable. La durée du transit de la phase liquide est en effet plus longue que celle de la phase solide suite à des variations des temps de rétention au niveau du gésier et des caeca (Carré, 2000). Des variations de la durée du transit de la phase solide sont également observées en fonction de la taille des particules composant cette dernière (Carré, 2000). Cette rapidité du transit digestif nécessite donc une grande efficacité de la digestion et des mécanismes d'absorption des nutriments.

La digestion commence au niveau de la cavité buccale. Au sein de celle-ci, les aliments subissent de faibles dégradations physiques et sont grossièrement humidifiés. On note également le début de la dégradation de l'amidon suite à l'action d'une enzyme amylolytique produite par les glandes salivaires, la ptyaline. L'action de cette enzyme se poursuit ensuite au sein du jabot.

Après la cavité buccale, les aliments vont alors être dirigés vers le jabot. Ce dernier assure un stockage et un ramollissement des aliments grâce au mucus sécrété par les nombreuses glandes présentes au niveau de l'épithélium. La vitesse de vidange de cet organe de stockage joue un rôle important dans la régulation du transit digestif et donc dans l'efficacité du processus de digestion. Cette vidange est fonction de plusieurs facteurs dont notamment la richesse en fibres celluloses de l'aliment ingéré.

Ensuite le bol alimentaire va passer par les deux parties de l'estomac. Tout d'abord, au sein du ventricule succenturié ou proventricule, la digestion des protéines va débiter via l'action de la pepsine. Cependant, malgré une forte sécrétion d'acide chlorhydrique, le pH régnant dans cette section de l'estomac n'est pas suffisamment bas (3 à 4,5) pour activer complètement la transformation de pepsinogènes, sécrétés tout comme l'acide chlorhydrique par des cellules spécialisées oxyntico-peptiques, en pepsine (Gadoud *et al.*, 1992). Le temps de rétention au sein de ce « premier estomac » est relativement court, il peut varier de quelques minutes à une heure. Ensuite, lorsqu'ils pénètrent dans le gésier, les aliments et les sécrétions du proventricule (pepsinogènes et HCl) rencontrent des conditions encore plus acides (pH 2 à 3,5). Le pepsinogène est alors complètement transformé en pepsine et l'hydrolyse complète des protéines peut avoir lieu. De plus, la présence de petits cailloux au sein de cette poche et la composition de ses parois permettent un broyage des aliments comme les graines. Ces deux estomacs fonctionnent donc de manière complémentaire, le premier ayant principalement une fonction sécrétoire et le second une action mécanique.

Après le passage au sein des deux estomacs, le bol alimentaire pénètre dans l'intestin grêle et ses trois parties. C'est au sein de ce dernier que va avoir préférentiellement lieu la digestion chimique suite à l'action des enzymes intestinales et pancréatiques et de la bile. L'action des enzymes est rendue possible par une augmentation du pH au sein de cet organe, celui-ci étant situé aux alentours de 6,5, un pH proche de celui rencontré dans le rumen des vaches et qui permettrait donc une

action optimale des enzymes ruminales cellulolytiques. À noter que cette augmentation est due à la sécrétion par le foie de la bile (pH = 6) et par le pancréas des sucs pancréatiques riches en bicarbonate.

Suite à cette digestion chimique, les aliments complexes sont transformés en constituants simples et absorbables, les nutriments (glucides, lipides, matière azotée,...). Chez les non-ruminants, l'intestin grêle est le lieu le plus important de l'absorption de ces différents éléments, c'est pourquoi il est préférable que les enzymes, endogènes et exogènes, agissent à ce niveau. Chez le poulet, cette absorption ne s'effectue en effet qu'au niveau de cet organe et de manière plus faible au niveau des deux caeca où a essentiellement lieu une absorption d'eau et de sels minéraux. Chez les poulets, ces deux organes, sont également les principaux sièges d'une action microbienne, qui se traduit par des phénomènes de fermentations qui permettraient une utilisation partielle des glucides pariétaux des enveloppes des grains (Gadoud *et al.*, 1992). Une activité microbienne est également rencontrée dans le jabot.

On voit donc que tout au long du système digestif, le bol alimentaire est soumis à des variations de pH et à l'action de différentes enzymes. La température est quant à elle de 40°C tout au long de la digestion.

2.1.2 Flore microbienne

La flore digestive composée essentiellement de bactéries joue un rôle important au niveau de la physiologie digestive en produisant un effet bénéfique, négatif ou nul sur la digestion des aliments. De manière générale, les enzymes produites par ces bactéries au sein du tractus digestif vont contribuer à la nutrition de l'animal hôte en facilitant la dégradation des lipides, protéines et glucides contenus dans les aliments. En ce qui concerne la dégradation des glucides, ceux qui ne peuvent être digérés par l'hôte sont fermentés par la microflore dans le jabot et principalement au niveau des caeca. Cependant cette microflore semble dépourvue d'enzymes capables d'hydrolyser la cellulose qui ne peut donc être utilisée comme source d'énergie par les poulets.

2.2 Digestion et métabolisme des hydrates de carbone

D'un point de vue quantitatif, les glucides représentent la partie la plus importante du matériel végétal. Ils peuvent être divisés en trois classes : l'amidon et les hauts polymères de glucose liés en $\alpha(1-4)$ et $\alpha(1-6)$, les glucides des parois des cellules végétales encore appelés glucides pariétaux et les oses (glucose, fructose,...) et oligosaccharides de faibles poids moléculaires (Champ, 1985). Ces différents constituants des végétaux ont une digestibilité variable selon les espèces animales, ils peuvent ainsi constituer une source importante d'énergie pour l'animal.

2.2.1 Digestion des glucides

Durant leur passage dans le tractus digestif, les glucides subissent des transformations ou dégradations de nature et d'intensité variable selon l'origine des glucides, les traitements

technologiques subis mais aussi selon l'animal. Les différents types de glucides sont également digérés dans des parties différentes du système digestif, ainsi alors que l'amidon est digéré en presque totalité par les enzymes de l'animal dans la partie supérieure du tube digestif, les glucides pariétaux sont au contraire digérés en grande partie par la microflore dans les caeca. Les oligosides quant à eux peuvent être soit hydrolysés par les enzymes de l'animal dans l'intestin grêle soit par la microflore au niveau des caeca.

Les enzymes glycolytiques intervenant dans la digestion des glucides peuvent donc être de deux origines différentes : enzymes sécrétées par le poulet lui-même (glandes salivaires, pancréas, ...) et enzymes d'origine microbienne.

2.2.1.1 Digestion de l'amidon

Tout d'abord, il est important de noter que l'amidon peut être divisé en trois types différents : « type A » pour les amidons de céréales, « type B » pour les amidons de tubercule et « type C » intermédiaire entre les deux autres types (Champ, 1985).

Les amidons de « type A » caractérisés par une digestion aisée sont digérés en très grande partie dans l'intestin grêle sous l'action de l' α -amylase pancréatique et des enzymes glycolytiques. Une partie de l'amidon est également dégradée au niveau de la cavité buccale par la ptyaline qui poursuit son action amylolytique au sein du jabot où l'amidon est également dégradé par la microflore.

Les amidons de « type B » au contraire, ne sont pas soumis à l'action des sécrétions digestives et sont attaqués par les bactéries du gros intestin (Baker *et al.*, 1950 ; Goshima *et al.*, 1981 ; Champ *et al.*, 1981 ; Gallant *et al.*, 1982 cité par Champ, 1985) où ils fermentent. Cette fermentation aboutit à la formation d'acides gras volatils, d'acide lactique et de gaz.

2.2.1.2 Digestion des glucides pariétaux

La digestion des fibres chez les monogastriques est assez peu étudiée contrairement à la digestion de ces dernières chez les ruminants. Toute la digestion de la cellulose ainsi qu'une grande partie de celles des hémicelluloses et substances pectiques résultent, chez les monogastriques, de fermentations dans le tube digestif postérieur (caeca particulièrement chez le poulet) qui conduisent à la formation d'acides gras volatils et de gaz (CO_2 , H_2 , CH_4) (Champ, 1985). Contrairement aux amidons qui sont très bien digérés par les poulets, notamment les amidons de légumineuses (« type B ») qui ont une digestibilité variant de 82 à 100%, la digestibilité de la cellulose et des hémicelluloses est inférieure à 10%. Des travaux menés par Thornburn et Willcox (1965) montrent que certaines substances pectiques ont une digestibilité pouvant atteindre les 40%.

Enfin, il semble que la digestibilité des parois cellulaires végétales soit inversement liée au rapport lignine/parois cellulaires. On assiste également chez le poulet à une diminution progressive de la digestibilité de l'ensemble des fibres lorsque celles-ci sont introduites à des taux relativement élevés dans la ration (Henry et Etienne, 1969 ; Fonnesbeck *et al.*, 1974 ; Kass *et al.*, 1980 cité par Champ, 1985).

3 Caractérisation de la biomasse ligno-cellulosique

3.1 Introduction

Dans le cadre des élevages de volailles (poulets de chair et production d'œufs), l'alimentation représente jusqu'à 70% du prix total de production (Gadoud *et al.*, 1992). C'est pourquoi le choix des aliments ne se fait pas systématiquement en vue d'obtenir les meilleurs critères techniques mais bien en vue d'atteindre un optimum économique, fonction du coût des matières premières et du prix de vente des produits.

3.2 Facteurs nutritionnels importants

3.2.1.1 Sources d'énergie

Au sein des coproduits, l'amidon lorsqu'il est présent, la cellulose ainsi que les matières grasses sont les principales sources d'énergie. L'amidon et la cellulose sont deux composés ne comportant que des résidus glucose et ne différant l'un de l'autre qu'au niveau des liaisons présentes entre ces résidus : des liaisons α (1-4) et α (1-6) pour l'amidon et des liaisons β (1-4) au sein des fibrilles de cellulose. L'amidon est dissocié en glucose simple suite à l'action d'enzymes (amylases) présentes aussi bien chez les monogastriques que chez les polygastriques alors que sans ajout d'enzymes exogènes de type cellulolytique capables de cliver les liaisons β (1-4), les monogastriques sont incapables d'utiliser la cellulose comme source d'énergie.

3.2.1.2 Protéines et acides aminés disponibles

Un facteur nutritionnel impératif à prendre en compte lors de l'intégration de coproduits dans les rations alimentaires d'animaux d'élevage, est leur teneur en protéines brutes et plus spécifiquement en certains acides aminés qui sont dits limitants. Parmi ceux-ci, les plus limitants sont la lysine et la méthionine (acide aminé soufré). Il est également possible de classer les acides aminés selon trois groupes : essentiels (lysine, méthionine,...) semi-essentiels (arginine) et non essentiels (alanine, aspartate,...).

Enfin, il est important de noter que seuls deux acides aminés ne peuvent être produits à partir de leur précurseur cétonique, la lysine et la thréonine, vu l'absence des transaminases associées à ces acides aminés chez les animaux supérieurs.

3.2.1.3 Minéraux

Du point de vue des besoins en minéraux, il est utile de distinguer ceux nécessaires à l'équilibre osmotique intra ou extracellulaire (sodium, potassium et chlore) et ceux indispensables à la formation de constituants tissulaires (cellules osseuses, phospholipides membranaires, enzymes,...) tels que le calcium et le phosphore (Larbier et Leclercq, 1992).

3.3 La lignine

La lignine est un composé majeur des parois végétales. Au sein de ces dernières, elle agit comme une barrière de protection en limitant l'accessibilité des différentes enzymes. Au sein des coproduits, elle est donc un obstacle pour l'obtention d'une digestion enzymatique optimale d'un substrat comme la cellulose.

Afin d'améliorer l'accessibilité des enzymes au substrat, les coproduits peuvent subir différents prétraitements : physiques (Vapo craquage ou steam explosion, autoclavage, micro-ondes), chimiques (traitement à la soude,...) ou encore biologiques (laccases). Cependant, ces différents traitements peuvent avoir des effets négatifs qu'il est impératif de limiter. Ces types de prétraitement, souvent onéreux, sont actuellement le fruit de nombreuses recherches. Ils sont généralement réservés pour optimiser la valorisation de la biomasse lignocellulosique destinée à l'industrie des biocarburants.

3.4 Coproduits agro-industriels étudiés

3.4.1 Drèches de blé

3.4.1.1 Origine industrielle

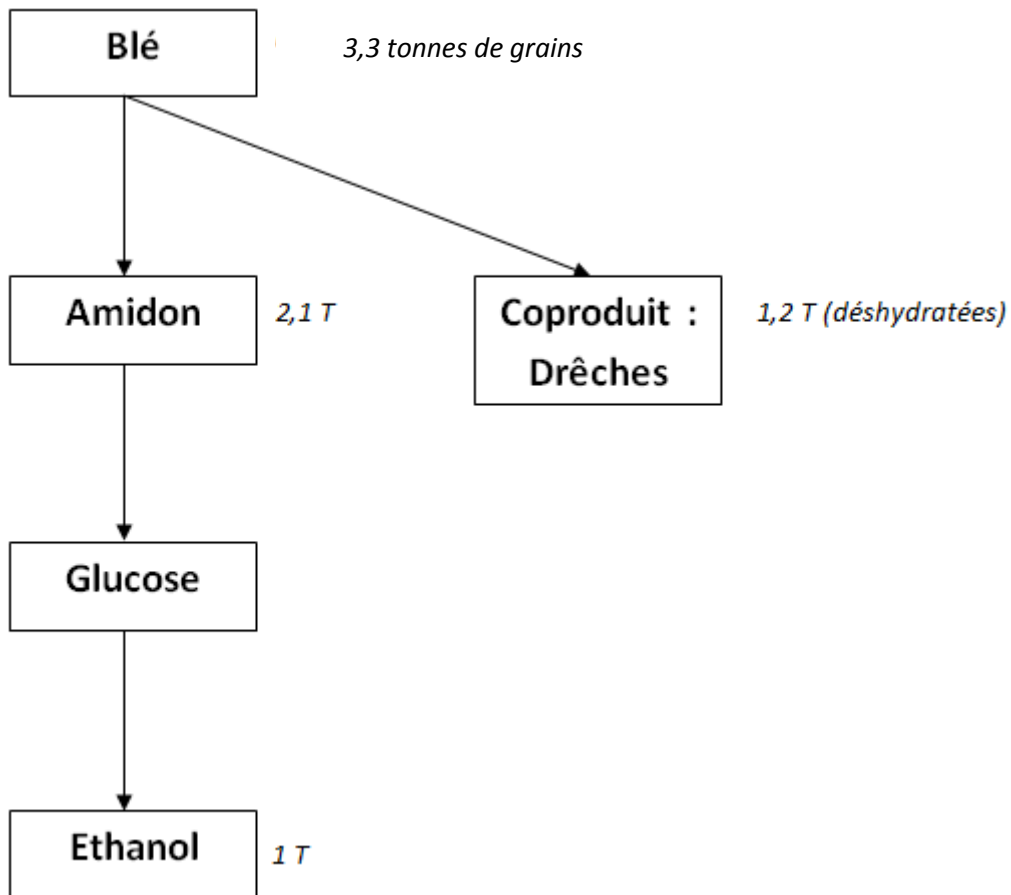


Figure 11 : Schéma de la production de bioéthanol à partir de blé

En Europe, la principale matière première pour produire du bioéthanol est le blé. Comme on le voit sur le schéma ci-dessus (Figure 11), seule une fraction du grain de blé est utilisée, l'amidon. Il en découle qu'un tiers de la matière sèche de départ n'est pas utilisée lors de cette fermentation (Schroeder, 2010). Pour produire 1 tonne d'éthanol, 3,3 tonnes de grains de blé sont nécessaires. Ces 3,3 tonnes renfermant 2,1 tonnes d'amidon et 1,2 tonnes de coproduits.

Les coproduits de ce processus, se présentent sous deux formes, une phase solide et une phase liquide (= solubles de distillerie). Après traitement (séchage), ces produits peuvent être répartis selon quatre classes :

- DDG (Distillers Dried Grains): grains ayant subi la distillation et séchés après ce procédé ;
- DDS (Distillers Dried Solubles) : produits solubles récupérés et séchés après la distillation ;
- DDGS (Distillers Dried Grains with Solubles): mélange des grains et des produits solubles issus de la distillation et séchés ;
- CDS (Condensed Distillers Solubles): solution condensée des produits solubles issus de la distillation.

Ces différents coproduits contiennent de nombreux nutriments valorisables en alimentation animale (protéines, fibres, matières grasses et minéraux). Cependant, leur composition est très variable puisqu'elle dépend fortement des spécificités du procédé de fabrication qui changent d'une usine à l'autre. Ces variations sont fortement marquées au niveau des teneurs en parois végétales et en lysine.

Aujourd'hui, ces drèches sont essentiellement valorisées pour l'alimentation des ruminants, leur valeur nutritionnelle étant encore floue dans le cas des monogastriques. Il est important de noter que cette valorisation des coproduits est essentielle pour que la filière du bioéthanol soit rentable.

3.4.2 Son de blé

Le son de blé est essentiellement obtenu en tant que coproduit lors des procédés de fabrication de farine de blé, c'est pourquoi il est aussi appelé issues de meunerie. Il s'agit d'une fraction fine faite principalement de fragments d'enveloppes et de particules de grains dont la plus grande partie de l'albumen a été enlevée ; cette presque exclusive teneur en enveloppe impliquant une très forte concentration en fibres.

3.4.3 Tourteaux de colza

L'origine principale des tourteaux de colza sont les industries utilisant ces graines pour la production d'huile végétale. L'huile de colza est en effet très utilisée, aussi bien en alimentation humaine que pour l'élaboration de biodiesel. Deux processus d'extraction d'huile sont possibles au niveau industriel : extraction par pression et extraction par solvant.

A partir de 2,4 tonnes de graines de colza, une tonne d'huile végétale est extraite ; le reste de la masse de départ forme les coproduits de la première étape de ce processus industriel : les tourteaux. Cette tonne d'huile végétale est alors estérifiée grâce à l'ajout de 0,1 tonne de méthanol pour former 1 tonne d'EMHV (ester méthylique d'huile végétale) et 0,1 tonne de glycérol, coproduit de la seconde étape du procédé (Figure 12).

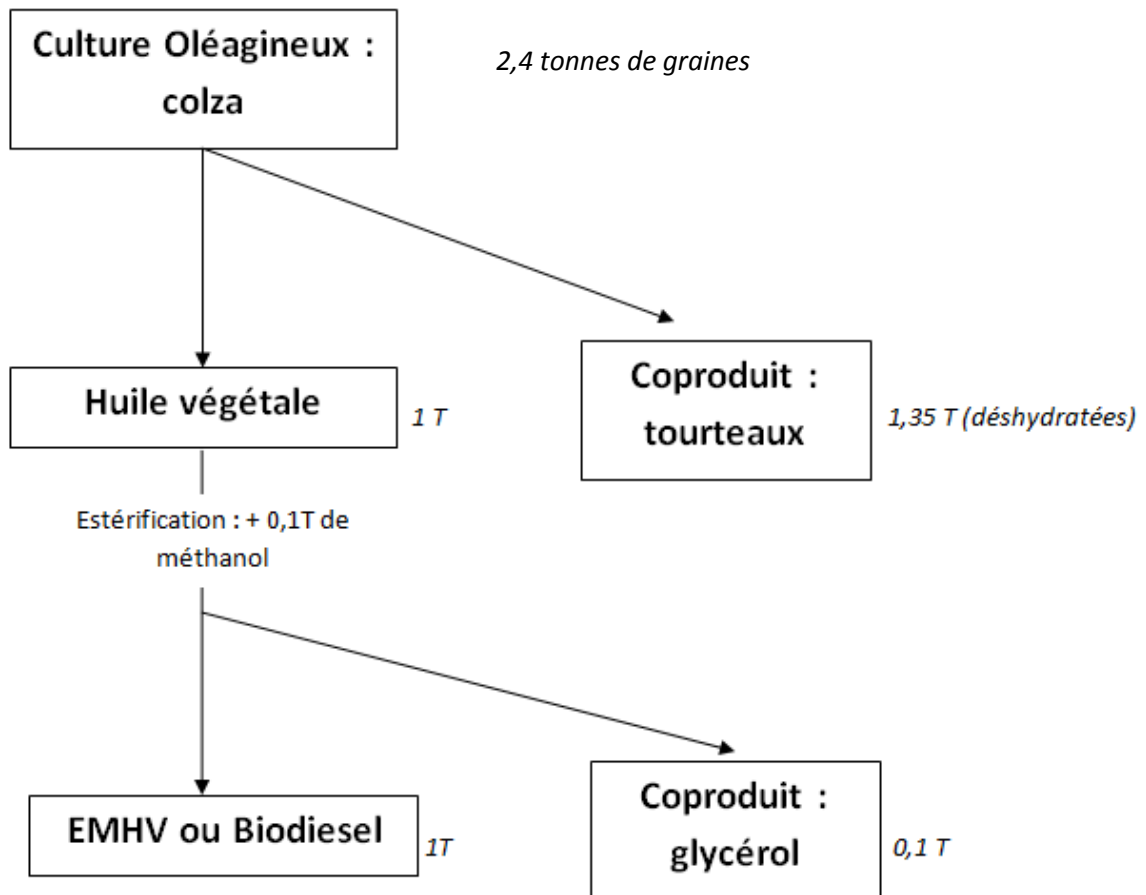


Figure 12 : Schéma de la production de Biodiesel à partir de colza

3.4.3.1.1 Extraction par pression

Après les opérations de préparation, l'huile est extraite par compression de la matière. Ces presses peuvent être soit discontinues (peu utilisées) soit continues. Ces presses continues sont des presses à vis (= expeller), elles fonctionnent selon le principe d'une vis d'Archimède de volume décroissant contenue dans une cage. La matière est donc entraînée dans un volume de plus en plus faible ce qui induit une augmentation de la pression. L'huile expulsée de la graine est alors drainée et collectée alors que le matériel solide résiduel est récolté sous forme d'un cake sec.

3.4.3.1.2 Extraction par solvant

L'extraction par solvant est une extraction de type solide/liquide. En effet, elle consiste en un contact intime entre la matière première (graines) et le solvant (hexane). Suite à ce contact, un mélange huile-solvant est obtenu, il s'agit du miscella. L'huile est alors séparée du solvant par distillation. Suite à l'extraction, un mélange tourteau-solvant est évidemment également obtenu. Les deux composants de ce mélange sont séparés par injection de vapeur. Afin de limiter la quantité de vapeur à injecter dans le tourteau, une cuisson est réalisée en tant que « prédésolvantisation ». Cette

utilisation limitée de vapeur, permet de diminuer la teneur finale en eau des tourteaux. Cependant, un chauffage trop intensif peut engendrer la perte de solubilité des protéines et de la biodisponibilité de certains composants des tourteaux bénéfiques pour la valorisation en alimentation animale.

3.4.3.1.3 Extraction combinée pression et solvant

Dans certains cas, une combinaison des deux procédés d'extraction est réalisée. Cette combinaison consiste à appliquer une « préextraction » par pression aux graines avant d'achever le processus d'extraction à l'aide de solvant. Habituellement, après l'extraction par pression, la teneur en matière grasse des tourteaux est de 10 à 20 % et la teneur résiduelle après la seconde étape d'extraction est de 3 à 8 %.

Dans le cas d'une extraction unique par solvant, la pellicule enveloppant les graines de colza résiste. La présence de cette enveloppe implique une diminution de la digestion des hydrates de carbones.

3.4.4 Coques de soja

3.4.4.1 Origine industrielle

Les coques de soja sont également issues des industries d'extraction d'huile. Contrairement aux graines de colza, l'enveloppe (téguments) des graines de soja doit être retirée pour permettre une bonne extraction. Ce sont ces enveloppes qui forment les coques de soja qui n'ont donc subi aucun phénomène d'extraction à l'inverse des tourteaux.

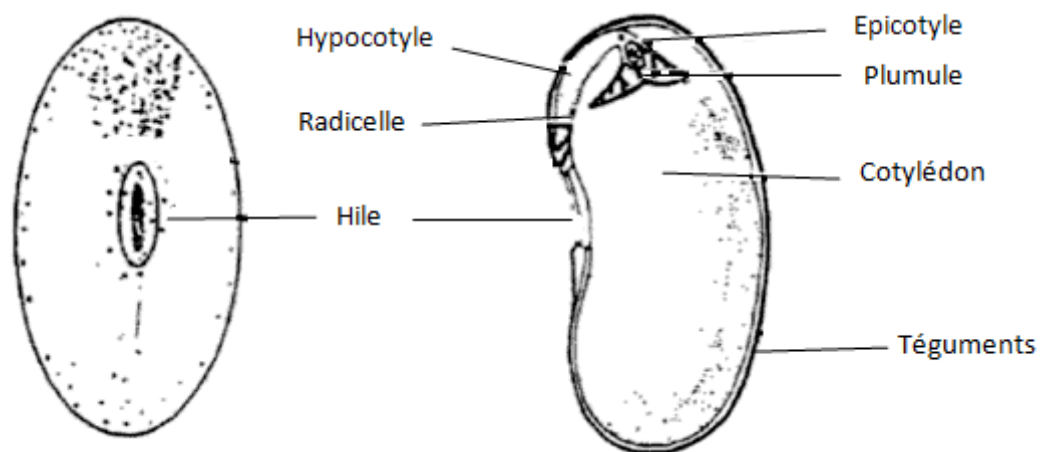


Figure 13 : Structure d'une graine de soja (d'après Keshun, 1999)

4 Enzymes exogènes en alimentation animale

La raison principale de l'incorporation d'enzymes dans les rations alimentaires des différents animaux d'élevage est d'améliorer la valeur nutritive des aliments en augmentant l'efficacité de la

digestion au sein du tube digestif des animaux. Cette efficacité de la digestion ayant un impact important sur les frais d'alimentation et sur l'impact environnemental des élevages.

Quatre raisons essentielles peuvent être invoquées pour justifier l'emploi des enzymes exogènes en alimentation animale (Beckers et Piron, 2009). La première est la destruction des facteurs antinutritionnels présents dans de nombreux aliments. Ils permettent également une augmentation de l'accessibilité des nutriments pour les enzymes endogènes et ainsi permettre une digestion de nutriments habituellement non accessibles ou présents sous une forme non digestible (ex : phosphore phytique). Enfin leur emploi permet de pallier l'absence d'enzymes hydrolysant des liaisons particulières chez certains animaux mais également de fournir aux jeunes individus dépourvus d'un système digestif mature capable de produire les enzymes en quantité suffisante, une aide à la digestion des aliments ingérés. Cet ajout permet de fournir davantage de nutriments à l'animal.

Actuellement, l'utilisation d'enzymes exogènes en alimentation animale fournit une marge bénéficiaire de l'ordre de 6 euros par tonne d'aliments.

Les enzymes exogènes sont utilisées depuis une vingtaine d'années. On dénombre quatre groupes d'enzymes selon le substrat spécifique qu'ils hydrolysent : les enzymes fibrolytiques, les protéases, les amylases et les phosphatases ou phytases. Actuellement parmi les enzymes fibrolytiques, les xylanases sont utilisées pour faciliter l'assimilation des céréales à paille (part importante du régime alimentaire des poulets de chair dans nos régions suite à leurs qualités nutritionnelles très intéressantes). Spécifiquement, elles diminuent la viscosité du contenu digestif engendré par des régimes alimentaires riches en céréales viscosantes (Beckers et Piron, 2009).

Tableau 2 : Exemples d'enzymes exogènes utilisées en alimentation animale

Enzymes	Substrat	Intérêt
Xylanase	Arabinoxylane, xylane	Réduction des effets négatifs engendrés par les hémicellulose sur le système digestif des volailles (ex : viscosité) ²
β -glucanase	β -glucane	
Cellulase	Cellulose	Libération de glucose métabolisable
Amylase	Amidon	Libération de glucose métabolisable
Phytase	Phytate	Extraction phosphore du phytate ²

¹ : Saryska, *et al.* (2005)

² : Beckers & Piron (2009)

Les enzymes exogènes peuvent être ajoutées en alimentation animale soit sous forme d'une seule activité enzymatique soit sous forme de combinaison de plusieurs activités. Dans ce cas-ci, ces mélanges portent souvent sur une phytase associée à une combinaison cellulase-hémicellulase (des protéases et des amylases peuvent même dans certains cas compléter ces régimes). Dans la plupart des cas, les études menées avec ces cocktails enzymatiques ont montré des effets synergiques dans des régimes à base notamment de tourteaux de soja (Cowieson et Adeola, 2005). Ces mélanges (xylanase, amylase et protéase) peuvent même limiter l'action de la microflore intestinale et ainsi diminuer les pertes endogènes d'azote (Hong *et al.*, 2002).

4.1 Formulation

Les préparations enzymatiques sont incorporées aux rations alimentaires sous forme de sprays liquides. Les quantités d'enzymes incorporées dans les aliments doivent être précises afin d'amener des résultats optimaux. L'inefficacité d'une préparation enzymatique peut être due aussi bien à un sous dosage qu'à un surdosage. Ce n'est pas parce qu'on ajoute une grande quantité d'enzymes que la réponse sera grande ; la réponse n'est pas linéaire (Emiola *et al.*, 2009). Dans le cas des enzymes fibrolytiques, ceci s'explique par le fait que plus on ajoute d'enzymes, plus la compétition pour les sites de liaison aux parois cellulaires du substrat est grande étant donné les propriétés structurales de ce type d'enzymes (Emiola *et al.*, 2009).

Le moment d'application est aussi un facteur déterminant car d'une part il est nécessaire d'ajouter les enzymes en fin de chaîne de production des aliments afin d'éviter les processus techniques de traitement impliquant des conditions drastiques (hautes températures) mais aussi d'éviter l'ajout des enzymes au dernier moment, lors du nourrissage des animaux (Beauchemin *et al.*, 2003) car les enzymes fibrolytiques n'ont alors pas le temps de se fixer aux parois cellulaires et sont donc moins protégées contre l'action d'éventuelles protéases.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

A. Validation in vitro du potentiel fibrolytique des enzymes ruminales chez la volaille de chair

Avant d'aborder les expérimentations réalisées au cours du travail, il est nécessaire de préciser que ce dernier a été divisé en deux phases distinctes. La première consistant en une analyse in vitro des activités enzymatiques du contenu ruminal et la seconde en une analyse microbiologique ex-vivo.

1 Protocole d'extraction des enzymes à partir du contenu ruminal

Matériel

➤ **Solution tampon**

1 litre de cette solution tampon est préparé comme suit :

- 62 ml de Na_2HPO_4 0,2M
- 438 ml de NaH_2PO_4 0,2M
- 500 ml d'eau distillée

Le pH du tampon est égal à 6.

➤ **Tampon d'extraction**

À 1 litre de solution tampon phosphate (pH=6) sont ajoutés successivement dans un ordre précis les composés suivants :

- 1 g de méthylcellulose (Sigma M0262)
- 8,5 g de NaCl
- 0,1543 g de dithiothreitol (Sigma) équivalent à 1mM

A noter qu'afin d'obtenir une dissolution parfaite de la méthylcellulose, la solution doit être chauffée jusqu'à 60-70°C.

➤ **Animal étudié**

Tous les prélèvements de phase solide ruminale effectués au cours de ce travail ont été effectués en période préprandiale et sur la même vache. Pour permettre ces prises d'échantillons, la vache dispose d'une canule au niveau de son rumen. La composition du régime alimentaire de l'animal a été maintenue pendant toute la durée de ce travail. Ce régime comporte 3,5 kg de foin (MS) et 1 kg de concentré protéique (Bovi Brio 20, SCAR).

Méthode

Les enzymes fibrolytiques ruminales sont extraites à partir de la phase solide du contenu ruminal. Le protocole appliqué est scindé en deux étapes principales et comprend à l'issue de chacune d'elle une phase de centrifugation:

- Phase 1 - Séparation des bactéries à partir des tissus végétaux
- Phase 2 - Extraction des enzymes membranaires à partir des bactéries cellulolytiques adhérentes

La solution obtenue à la suite de ce protocole est nommée extrait brut ruminal. Cet extrait brut d'enzymes ruminales est obtenu à la suite d'un procédé composé spécifiquement de sept étapes. Il nécessite une solution nommée tampon d'extraction.

Etape 1 : mise en contact du contenu ruminal avec un inhibiteur compétitif non hydrolysable

100 g de la phase solide du contenu ruminal sont prélevés et mis en présence avec la solution d'extraction dans un rapport massique de 1/1. Le mélange est effectué dans un récipient Durant (500 ml avec bouchon).

Etape 2 : Waring Blender

La totalité du mélange est mixée dans un Waring Blender (SEB Rondo 1000). Le broyage dure 3 fois 30 secondes et s'effectue en évitant la surchauffe.

Etape 3 : homogénéisation

L'homogénéisation est effectuée par agitation magnétique (barreaux orthogonaux : 73mm – 11mm) dans les récipients Durant. Cette agitation dure 4 heures à la température de 4°C.

Etape 4 : filtration

A l'issue de cette période de 4 heures, la suspension est filtrée sur une double couche de toile nylon filtrante (cheese-cloth de 100 µm de porosité : Fisher 82485). Le filtrat est récupéré pour la suite des opérations.

Etape 5 : centrifugation à basse vitesse

La première centrifugation s'effectue à basse vitesse dans le but de récupérer dans le surnageant les bactéries et de précipiter les particules végétales dans le culot. La centrifugation s'opère à 800xg (Centrifugeuse Beckman Avanti J25I) pendant 15 minutes à la température de 4°C.

Etape 6 : surfactant

2% de surfactant (triton X-100 Sigma) sont ajoutés au surnageant issu de la centrifugation à basse vitesse et la mise en solution de ce constituant est effectué grâce à l'ultrathurax (Yellow Line DI 25 basic : vitesse de 13500 min⁻¹). Deux périodes de 30 secondes sont nécessaires pour une bonne mise

en solution du surfactant. Il est ensuite nécessaire de laisser reposer la solution pour éviter la présence d'une mousse trop abondante pendant la centrifugation à haute vitesse.

Etape 7 : centrifugation à haute vitesse

A l'issue de cette centrifugation à haute vitesse (10 000 rpm pendant 15 min à 4°C avec la Centrifugeuse Beckman Avanti J25I), les enzymes fibrolytiques sont récupérées dans le surnageant. Les cellules bactériennes sont concentrées dans le culot. La solution concentrée en enzymes fibrolytiques est appelée extrait brut.

2 Mesure des activités fibrolytiques au sein du contenu ruminal

Matériel

➤ ***Solution d'acide dinitrosalicylique***

DNS est le nom donné à la solution formée de plusieurs composés. Ces différents composants sont dissous dans de l'eau distillée. Ci-dessous la composition de la solution :

- 10 g/l de NaOH
- 2 g/l de phénol
- 10g/l de DNS
- 0,5 g/l de Na₂SO₃
- 268,5 g/l de sel de Rochelle (Tartrate de NaK)

➤ ***Solution tampon***

Voir chapitre 3, partie A, point 1.

➤ ***Substrats spécifiques aux 5 activités enzymatiques dosées :***

- Le substrat spécifique à l'activité exoglucanase est la cellulose microcristalline (Avicell-Sigma Fluka 11365 PH 101). La mise en suspension est réalisée avec 1 % de cette poudre et avec le tampon phosphate à pH 6,5 ;
- Le substrat spécifique à l'activité endoglucanase est la carboxyméthylcellulose (« carboxyméthylcellulose sodium salt » de marque SIGMA C-5678). La solution de carboxyméthylcellulose (CMC) est préparée à partir de 2 % de poudre. La dissolution de la poudre s'effectue dans le tampon phosphate à pH 6,5. Afin d'assurer une dissolution complète du substrat, la solution est chauffée à 80°C sous agitation magnétique ;
- Le substrat spécifique à l'activité cellulase brute est du papier filtre de marque Whatman (modèle numéro 1) ;

- Le para nitrophénol glucopyranoside (PNPG) est le substrat spécifique de l'activité cellobiase (Sigma N7006). Il est dilué dans le tampon phosphate pour atteindre une concentration équivalente à $2,5 \cdot 10^{-3}$ molaire ;
- Le substrat spécifique à l'activité xylanase est le xylane de bouleau (« Xylane from brichwood » de marque Sigma). La mise en suspension est réalisée avec 1 % de cette poudre et avec le tampon phosphate à pH 6,5.

➤ ***Spectrophotomètre***

La marque et le modèle du spectrophotomètre utilisé sont : Thermospectronic, Genesys 20. La solution est placée dans des cupules destinées à la mesure de l'absorbance dans le domaine du visible.

Méthode

Pour mesurer les différentes activités enzymatiques, des substrats spécifiques à chacune d'entre elles sont utilisés. Le dosage proprement dit consiste à déterminer la quantité de sucre réducteur libéré par l'hydrolyse de ces substrats. Les propriétés réductrices de ces sucres, vont permettre à chaud et en un milieu alcalin de réduire l'acide 3,5-dinitrosalicylique en acide-3-amino-2-hydroxy-5-nitrobenzoïque, composé de couleur rouge. La mesure de l'absorbance de la solution à 550 nm permet de déterminer grâce à une droite d'étalonnage (graphique exprimant la concentration en glucose en fonction de l'absorbance dans les conditions déterminées par chaque dosage) la quantité de sucres produits par la réaction d'hydrolyse. L'activité enzymatique est définie comme le nombre de micromole de glucose libéré par minutes et par ml d'extrait brut.

Les dosages des enzymes d'intérêts pour ce projet sont définis pour chaque espèce enzymatique dans des conditions de pH et de températures particulières. L'activité enzymatique est exprimée en Unité Internationale.

Cependant, pour répondre aux objectifs de ce projet il est impératif d'étudier ces activités dans les conditions de température et de pH régnant d'une part dans le rumen (afin de démontrer l'importance de ces enzymes dans la dégradation de la cellulose) et d'autre part à celles de l'appareil digestif des volailles. Ainsi, les dosages sont effectués à pH 6,5 et à 40°C.

Les tubes utilisés pour les mesures d'activités sont des tubes à essais cylindriques à fonds plats de volume maximum équivalent à 30 ml et munis de bouchons vissés. Tous ces tubes sont homogénéisés par agitation magnétique (puce ronde de 1 cm de diamètres) à la température de 39°C. Les réactions d'hydrolyse s'effectuent dans une solution tamponnée à un pH de 6,5 (tampon phosphate de constitution définie précédemment). Toutes les réactions d'hydrolyse sont effectuées à 39°C. La mise en température de tous les constituants à cette température dure 5 minutes.

➤ ***Coloration au DNS et arrêt de l'hydrolyse enzymatique***

Pour l'ensemble des activités, les tubes sont sortis du bain-marie après le temps imparti et 3 ml de solution DNS sont ajoutés à chacun. Le tartrate NaK contenu dans la solution DNS va provoquer

une augmentation du pH stoppant la réaction d'hydrolyse. Ensuite, les tubes sont placés dans un bain durant 5 min à 100°C afin de permettre la coloration du DNS.

Pour mesurer les différentes activités enzymatiques, des substrats spécifiques à chacune d'entre elles sont utilisés. Le dosage proprement dit consiste à déterminer la quantité de sucre réducteur libéré par l'hydrolyse des substrats dans des conditions adaptées aux objectifs du projet, c'est-à-dire un pH de 6,5 et une température de 39°C.

➤ **Activité exoglucanase**

○ *Blanc enzymes*

1 ml de tampon phosphate (pH=5,85) et 3 ml de solution enzymatique (extrait brut) sont placés dans des tubes à fond plat. Ces tubes sont ensuite placés dans un bain marie à 39°C.

○ *Préparation des échantillons*

3 ml de solution enzymatique (extrait brut) sont placés dans les tubes et sont ensuite placés dans un bain-marie à 39°C. La mise en température dure 5 minutes. A l'issue de celle-ci, 1 ml de solution Avicell est ajouté à chaque tube. Le temps d'hydrolyse défini pour ce dosage est de 120 min.

○ *Droite d'étalonnage*

La droite d'étalonnage est réalisée en appliquant le même mode opératoire que celui relatif aux échantillons si ce n'est que les 3 ml de solutions enzymatiques sont remplacés par 3 ml de tampon phosphate et que le millilitre de substrat est remplacé par 1 ml de solution glucose à différentes concentrations : 0g/l, 0,25g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l, 2g/l.

➤ **Activité endoglucanase**

○ *Blanc enzymes*

1 ml de tampon et 0,5 ml de solution enzymatique (extraits bruts) sont placés dans les tubes à essais. Ceux-ci sont ensuite chauffés au bain marie jusqu'à 39°C et maintenus à cette température pendant toute l'hydrolyse.

○ *Préparation des échantillons*

0,5 ml de solution enzymatique (extrait brut) sont ajoutés dans les tubes. Ils sont ensuite placés dans un bain-marie à 39°C. La mise en température dure 5 minutes. A l'issue de celle-ci, 1 ml de solution CMC est ajouté à chaque tube. Le temps d'hydrolyse défini pour ce dosage est de 15 min.

○ *Droite d'étalonnage*

La droite d'étalonnage est réalisée en appliquant le même mode opératoire que celui relatif aux échantillons si ce n'est que les 0,5 ml de solutions enzymatiques sont remplacés par 0,5 ml de tampon phosphate et que le millilitre de substrat est remplacé par 1 ml de solution glucose à différentes concentrations : 0g/l, 0,25g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l, 2g/l.

➤ **Activité cellulase brute**

○ *Blanc enzymes*

2 ml de tampon et 0,5 ml de solution enzymatique (extrait brut) sont placés dans les tubes à essais. Ceux-ci sont ensuite chauffés au bain marie jusqu'à 39°C et maintenus à cette température pendant toute l'hydrolyse.

○ *Préparation des échantillons*

0,5 ml de solution enzymatique (extrait brut) et 2 ml de tampon sont ajoutés dans les tubes à essais. Ceux-ci sont ensuite placés dans un bain-marie à 39°C. La montée en température des échantillons dure 5 minutes, ensuite 50 mg de papier filtre sont ajoutés à chaque tube. Le temps d'hydrolyse défini pour ce dosage est de 60 minutes.

○ *Droite d'étalonnage*

La droite d'étalonnage est réalisée en appliquant le même mode opératoire que celui relatif aux échantillons si ce n'est que les 0,5 ml de solution enzymatique sont remplacés par 0,5 ml de tampon phosphate et que les 50 mg de papier sont remplacés par 1 ml de solution glucose à différentes concentrations : 0g/l, 0,25g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l, 2g/l. Enfin, au lieu de 2 ml de tampon, un seul ml de tampon est ajouté.

➤ **Activité xylanase**

○ *Blanc enzymes*

0,25 ml de tampon et 1,75 ml de solution enzymatique (extrait brut) sont placés dans les tubes à essais. Ceux-ci sont ensuite chauffés au bain marie jusqu'à 39°C et maintenus à cette température pendant toute l'hydrolyse.

○ *Préparation des échantillons*

1,75 ml de solution enzymatique (extrait brut) sont ajoutés dans les tubes. Ils sont ensuite placés dans un bain-marie à 39°C. La mise en température dure 5 minutes. A l'issue de celle-ci, 0,25 ml de solution xylane est ajouté à chaque tube. Le temps d'hydrolyse défini pour ce dosage est de 60 min.

○ *Droite d'étalonnage*

La droite d'étalonnage est réalisée en appliquant le même mode opératoire que celui relatif aux échantillons si ce n'est que les 1,75 ml de solutions enzymatiques sont remplacés par 1,75 ml de tampon phosphate et que les 250 microlitres de substrat sont remplacés par 0,25 ml de solution glucose à différentes concentrations : 0g/l, 0,25g/l, 0,5g/l, 1g/l, 1,5g/l, 2g/l.

➤ **Activité cellobiase**

Contrairement aux activités précédentes, la quantité de glucose produite au cours de l'hydrolyse du substrat, le para nitrophényl-β-D-1,4-glucopyranoside (PNPG), est déterminée grâce à une coloration provoquée par la dégradation du substrat. Suite à l'action des enzymes, le substrat est dégradé en glucose et en paranitrophénol (PNP) qui contrairement au PNPG incolore, prend une

couleur jaune en milieu alcalin. Ce composé est spectrophotométriquement mesurable à 400nm. L'absorbance mesurée est reliée à la concentration en PNP grâce à la droite d'étalonnage. La stœchiométrie de la réaction d'hydrolyse permet de déterminer la quantité de glucose produite.

- *Blanc enzymes*

1 ml de tampon et 1 ml de solution enzymatique (extrait brut) sont placés dans les tubes à essais. Ceux-ci sont ensuite chauffés au bain marie jusqu'à 39°C et maintenus à cette température pendant toute l'hydrolyse.

- *Préparation des échantillons*

1 ml de solution enzymatique (extrait brut) est ajouté dans des tubes à essais. Ceux-ci sont ensuite placés dans un bain-marie à 39°C. Après 5 min de montée en température des échantillons, 1 ml de substrat est ajouté à chaque tube. Le temps d'hydrolyse défini pour ce dosage est de 60 minutes.

- *Arrêt de l'hydrolyse enzymatique*

1 ml de solution Na₂CO₃ (concentration finale équivalente à 1 M) est ajouté à chaque tube afin de stopper l'hydrolyse enzymatique.

- *Droite d'étalonnage*

La droite d'étalonnage est réalisée en appliquant le même mode opératoire que celui relatif aux échantillons si ce n'est que le millilitre de solution enzymatique est remplacé par 1 ml de tampon phosphate et que le millilitre de substrat est remplacé par 1 ml de solution PNP à différentes concentrations : 0 M, 0,2.10⁻⁴ M, 0,5.10⁻⁴ M, 1.10⁻⁴ M, 2.10⁻⁴ M.

➤ **Mesure au spectrophotomètre**

Les contenus de chaque tube sont dilués dans un volume d'eau distillée variable selon l'activité mesurée (tableau 3). Ensuite, avant la mesure au spectrophotomètre, il est impératif de centrifuger le milieu. 1 ml de solution est alors prélevé dans chaque tube et placé dans des tubes Eppendorf coniques (volume maximum équivalent à 1,5 ml) afin d'être centrifugé (Centrifugeuse Sigma 2-16 P). La centrifugation dure 5 min à 14 000 rpm.

Tableau 3 : Volume d'eau distillée ajoutée en fonction du type d'activité enzymatique

Activités enzymatiques	Volume d'eau ajoutée
Endoglucanase	20 ml
Exoglucanase	10 ml
Cellulase brute	10 ml
Xylanase	10 ml
Cellobiase	40 ml

Après cette centrifugation, la coloration du surnageant peut alors être mesurée à 550 nm pour les activités mettant en œuvre le DNS et à 400 nm pour l'activité cellobiase se basant sur la coloration au PNP.

3 Protocole de simulation du tractus digestif de la volaille de chair (Tervilä-Wilo et al., 1996)

Matériel

Deux solutions ont été utilisées pour cet essai :

- Solution 1 : Simulated gastric fluid (SGF)

Cette solution contient 32 mg/ 100 ml de pepsine « Fluka 77161-100G » dissout dans une solution 0,03 M de NaCl à pH 1,2.

- Solutions 2 : Simulated intestinal fluid (SIF)

Cette solution contient 10 mg/ml de pancréatine « Sigma P7545-100G » dissout dans une solution 0,05 M de KH_2PO_4 à pH 6,8.

Les différents coproduits utilisés au cours de ces manipulations sont les suivants : drèches de blé, son de blé, coques de soja, tourteaux de colza issus d'un procédé d'extraction pas pression et tourteaux de colza issus d'un procédé d'extraction par solvant. Les teneurs en cellulose et lignine de ces composés sont reprises dans le tableau ci-dessous (tableau 4)

Tableau 4 : Teneur en cellulose et lignine des différents coproduits

	%age cellulose	%age lignine
Son de blé	3	12
Tourteau pressé	9	14
Tourteau extraction	9	14
Drèche de blé	9	13
Coques de soja	2	41

Méthode

La première partie des manipulations de l'analyse *in vitro* concernait essentiellement la mesure des activités fibrolytiques dans le contenu ruminal solide. Les expérimentations relatives à cette deuxième partie de l'analyse sont relatives à l'étude de la résistance des enzymes ruminales aux agents dénaturants et protéolytiques retrouvés dans le tractus digestif du poulet de chair. Trois protocoles (cinétiques) permettant de tester la résistance des enzymes à ces agents ont été établis.

- ***Cinétiques de simulation des conditions stomacales***

Afin de simuler les conditions rencontrées dans l'estomac des poulets de chair, deux protocoles composés de trois étapes et de quatre étapes ont été établis. Deux cinétiques ont donc été établies dans ces conditions. La première cinétique permet de mesurer le taux de dégradation des enzymes au pH acide de l'estomac et la deuxième teste l'influence de la pepsine sur les enzymes fibrolytiques (dans les conditions stomacales). Les solutions SGF, d'acide chloridrique (1 Molaire) et de NaHCO_3 (1 Molaire) ont été utilisées pour reproduire les conditions stomacales. Les échantillons sont placés dans un bain-marie à 39°C °C, température qui correspond à celle rencontrée tout au long du système digestif des volailles.

- *Influence de l'acidité de l'estomac*

Etape 1 : mise à pH

Le pH de l'extrait brut est ajusté à une valeur de 3 grâce à une solution HCl 1M.

Etape 2 : arrêt de la réaction

Des ajouts de NaHCO_3 ont été réalisés après 10, 20, 30, et 45 minutes sur les extraits bruts ruminal. Ces ajouts sont réalisés jusqu'à atteindre un pH de 6,5.

Etape 3 : dosage des activités

Chacune des quatre activités cellulases (endoglucanase, exoglucanase, cellobiase et cellulase brute) est dosée en suivant le mode opératoire décrit précédemment (Chapitre 3, partie A, point 2).

- *Influence de la pepsine dans les conditions stomacales*

Etape 1 : mise à pH

Le pH de l'extrait brut est ajusté à une valeur de 3 grâce à une solution HCl 1M.

Etape 2 : ajout pepsine

La solution SGF contenant la pepsine est ajoutée à l'extrait brut (pH 3). La solution est ajoutée selon un rapport 1:25 du volume d'extrait brut.

Etape 3 : arrêt de la réaction

Des ajouts de NaHCO_3 ont été réalisés après 10, 20, 30, et 45 minutes sur les extraits bruts ruminiaux. Ces ajouts sont réalisés jusqu'à atteindre un pH de 6,5.

Etape 4 : dosage activités

Chacune des quatre activités cellulases (endoglucanase, exoglucanase, cellobiase et cellulase brute) est dosée en suivant le mode opératoire décrit précédemment (Chapitre 3, partie A, point 2).

➤ *Cinétique de simulation des conditions intestinales*

Afin de simuler les agents protéolytiques rencontrés dans l'intestin grêle des poulets de chair, un protocole de dégradation des enzymes ruminales à la pancréatine a été établi. L'action d'une

pancréatine a été testée à un pH de 6,5. Les solutions SIF et de NaHCO₃ (1 Molaire) ont été utilisées. Les échantillons sont placés dans un bain-marie à 39°C °C.

Etape 1 : mise à pH

Le pH de l'extrait brut est ajusté à une valeur de 6,5 si nécessaire grâce à la solution NaHCO₃ 1M.

Etape 2 : ajout pancréatine

La solution SIF contenant la pancréatine est ajoutée à l'extrait brut (pH 6,5). Cette solution est ajoutée selon un rapport 1: 50 du volume d'extrait brut.

Etape 3 : arrêt de la réaction

Des ajouts de NaHCO₃ ont été réalisés après 10, 20, 30, et 45 minutes sur les extraits bruts ruminiaux. Ces ajouts sont réalisés jusqu'à atteindre un pH de 6,5.

Etape 4 : dosage des activités

Chacune des quatre activités cellulases (endoglucanase, exoglucanase, cellobiase et cellulase brute) est dosée en suivant le mode opératoire décrit précédemment (Chapitre 3, partie A, point 2).

➤ ***Protocole de digestion in vitro des coproduits chez la volaille de chair***

La digestion de différents coproduits en présence des enzymes de l'extrait brut a été simulée afin de déterminer la perte de digestibilité engendrée par la succession des agents protéolytiques et dénaturants.

- a) Digestion Tervilä-Wilo
- b) Digestion dans les conditions intestinales
- c) Digestion témoin

Afin de vérifier l'impact de ces agents dénaturants et protéolytiques sur l'hydrolyse des coproduits, une comparaison a été effectuée entre une hydrolyse dans les conditions physico-chimiques uniquement rencontrées dans l'intestin grêle (température de 39°C, pH 6,5 et temps d'action de 60 minutes), une hydrolyse tenant compte de l'ensemble de ces agents et des temps de rétention des digesta dans le gésier, le jabot et l'intestin grêle définis à la figure 14 selon le modèle de Tervilä-Wilo *et al.* (1996) et une hydrolyse témoin sans aucun agent et de durée identique au temps total de séjour des digesta dans le tractus digestif (135 minutes ; somme des temps de rétention des trois organes : jabot, gésier et intestin).

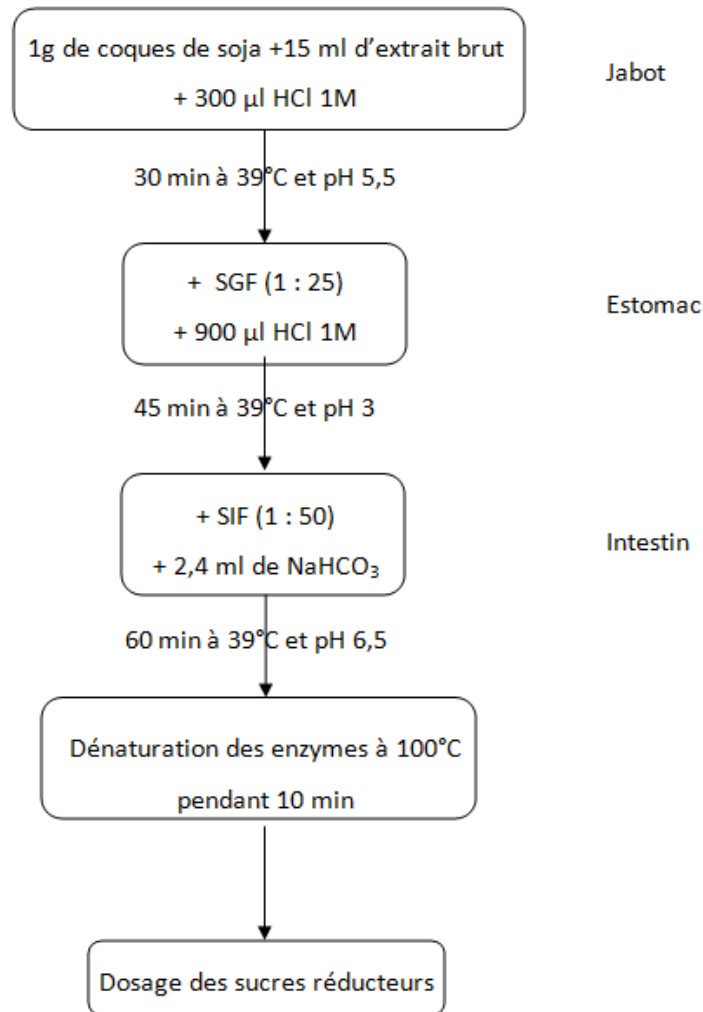


Figure 14 : Méthode de simulation du système digestif du poulet (d'après Tervilä-Wilo et al., 1996)

➤ *Dosage des sucres réducteurs*

Les sucres réducteurs ont été mesurés par la méthode de dosage à l'acide dinitrosalicylique. A la différence de la méthode explicitée précédemment, cette méthode a permis de déterminer la concentration en sucre produit par l'hydrolyse des coproduits par les enzymes contenues dans l'extrait brut. Les différentes étapes de cette méthode sont les suivantes :

Etape 1 : préparation des échantillons

1 ml de tampon phosphate et 3 ml de solution DNS sont ajoutés à 0,5 ml d'échantillons.

Etape 2 : coloration

Les solutions sont placées dans un bain-marie à 100°C durant 5 min (coloration des sucres).

Etape 3 : arrêt coloration

La réaction de coloration est stoppée par ajout de 15 ml d'eau distillée.

Etape 4 : mesure

L'intensité de la coloration des solutions est mesurée via le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 550 nm.

- Droite d'étalonnage

Pour l'établissement de la droite d'étalonnage, les 0,5 ml d'échantillons sont remplacés par 0,5 ml de solution glucose à différentes concentrations (0 g/l, 0,25 g/l, 0,5 g/l, 1 g/l, 1,5 g/l, 2 g/l). L'absorbance de ces concentrations est mesurée à 550nm avec le spectrophotomètre (Thermospectronic, Genesys 20). La relation linéaire entre l'absorbance et la quantité de sucres des solutions étalons permet d'établir une relation mathématique liant ces deux valeurs. La valeur d'absorbance obtenue par la coloration à l'acide dinitrosalicylique (même composition que celle décrite au Chapitre 3, partie A, point 2) permet de déterminer la concentration en sucres réducteurs présente dans les échantillons.

3.1 Étude de la cinétique de dénaturation des enzymes

La finalité du projet étant d'incorporer des enzymes fibrolytiques d'origine ruminale dans l'alimentation des poulets de chair, il était impératif d'étudier l'effet des conditions rencontrées dans le système digestif de ces volailles sur les enzymes et leur aptitude à hydrolyser la cellulose.

3.1.1 Conditions estomacs

Afin de simuler les conditions rencontrées dans l'estomac des poulets de chair qui se caractérisent notamment par l'action d'une enzyme protéolytique, la pepsine, et un pH de 3, la solution SGF et du HCl 1M sont utilisés. Il est important de noter que les échantillons sont placés dans un bain-marie à 40°C, température qui correspond à celle rencontrée tout au long du système digestif des volailles.

Etape 1 : mise à pH

Le pH de l'extrait brut est ajusté à une valeur de 3 grâce à une solution HCl 1M.

Etape 2 : ajout pepsine

La solution SGF contenant la pepsine est ajoutée à l'extrait brut (pH 3). La solution est ajoutée selon un rapport 1:25 du volume d'extrait brut.

Etape 3 : arrêt réaction

Après le nombre de minutes désiré, la réaction d'hydrolyse est stoppée par ajout de NaHCO₃ jusqu'à atteindre un pH de 6,5 et les échantillons sont sortis du bain à 40°C.

Etape 4 : Dosage activités

Chacune des quatre activités cellulases (endoglucanase, exoglucanase, cellobiase et cellulase brute) est déterminée en suivant le mode opératoire décrit au Chapitre 3, partie A, point 2.

3.1.2 Conditions intestin grêle

Afin de simuler les conditions rencontrées dans l'intestin grêle des poulets qui se caractérisent notamment par l'action d'une enzyme protéolytique, la pancréatine, et un pH de 6,5, la solution SIF et du NaHCO_3 1M sont utilisés. Il est important de noter que les échantillons sont placés dans un bain-marie à 40°C, température qui correspond à celle rencontrée tout au long du système digestif des volailles.

Etape 1 : mise à pH

Le pH de l'extrait brut est ajusté à une valeur de 6,5 si nécessaire grâce à la solution NaHCO_3 1M.

Etape 2 : ajout pancréatine

La solution SIF contenant la pancréatine est ajoutée à l'extrait brut (pH 6,5). La solution est ajoutée selon un rapport 1/50 du volume d'extrait brut.

Etape 3 : arrêt réaction

Après le nombre de minutes désiré, la réaction d'hydrolyse est stoppée par ajout de NaHCO_3 jusqu'à atteindre un pH de 6,5 et les échantillons sont retirés du bain.

Etape 4 : Dosage activités

Chacune des quatre activités cellulases (endoglucanase, exoglucanase, cellobiase et cellulase brute) est déterminée en suivant le mode opératoire décrit au Chapitre 3, partie A, point 2.

B. Modèle ex vivo de production des enzymes fibrolytiques ruminales

1 Techniques d'isolement des bactéries fibrolytiques

Matériel

➤ **Organismes**

Le protocole d'isolement des bactéries cellulolytiques adhérentes à la phase solide du contenu ruminal a été effectué selon une méthode similaire à la première phase du protocole d'obtention de l'extrait brut (phase 1 : séparation bactéries – particules végétales). Ce protocole d'isolement et de sélection des bactéries cellulolytiques à partir d'un consortium bactérien extrait de la phase solide du contenu ruminal s'est déroulé en anaérobiose et en présence d'inhibiteur compétitif non hydrolysable (à la différence du protocole d'obtention de l'extrait brut ruminal).

➤ **Milieu Rumen Glucose Cellobiose Agar (RGCA)**

Pour préparer ce milieu, 3 solutions sont nécessaires :

- Rumen clarifié
 - Prélèvement de rumen liquide dans la vache
 - Centrifugation 1 fois à 1000.g (Centrifugeuse Beckman Avanti J25I)
 - Centrifugation 2 fois à 14 000.g (Centrifugeuse Beckman Avanti J25I)
 - Autoclavage
- Solution Slu 1

Dans 1 l d'eau distillée on ajoute dans un ordre précis : 0,2 g de CaCl_2 , 1 g de KH_2PO_4 , 0,2 g de MgSO_4 , 2 g de NaCl et enfin 10 g de NaHCO_3 .

- Solution d'Hémine

50 mg d'hémine bovine sont diluées dans une solution de NaOH 1N. De l'eau distillée est ensuite ajoutée pour atteindre un volume total de 100ml.

- Préparation du milieu RGCA :

1) À 240 ml rumen clarifié sont ajoutés dans l'ordre suivant :

- 0,4 g amidon soluble
- 0,2 g glucose
- 0,2 g cellobiose
- 0,8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 14 g agar

- 140 ml d'eau distillée
 - 400 ml de Slu 1
- 2) Mettre à pH 6 avec une solution de HCl 25%.
 - 3) Stérilisation à l'autoclave.
 - 4) Les solutions suivantes sont filtrées (filtres nylon) et ajoutées stérilement (hôte à flux laminaire) au milieu :
 - 10 ml de Na₂S 20 g/l dissous dans l'eau distillée ;
 - 10 ml de cystéine (L-cystéine hydrochloride monohydraté) dissous dans l'H₂O 40 g/l;
 - 8 ml de solution d'hémine stérile (autoclave).

Ce milieu est propice au développement des bactéries ruminales. Parmi celles-ci, les bactéries cellulolytiques sont identifiables par une technique de double couche. Sur les colonies visibles une deuxième couche est ensuite coulée. Cette couche d'agarose ne contient aucune source de carbohydrates. L'élaboration de ce milieu nécessite la préparation de 4 solutions. La composition de chacune d'elle est explicitée ci-dessous.

- Solution 1
 - 3 g de K₂HPO₄ / l d'eau distillée
- Solution 2 (g/l d'eau distillée)
 - 0,6 g de CaCl₂
 - 1,8 g de KH₂PO₄
 - 1,0 g de MgSO₄.7H₂O
 - 0,5 g de NaCl
 - 4,5 g de (NH₄)₂SO₄
- Solution AGV (acides gras volatils)
 - 17 ml d'acide acétique
 - 6 ml d'acide propionique
 - 4 ml d'acide butyrique
 - 1 ml d'acide isobutyrique
 - 1 ml d'un mélange d'acide n-valérique, isovalérique et DL-α-méthyl butyrique
- Solution cystéine
 - 2,5 g de cystéine / l d'eau distillée

➤ **Milieu 10 (double couche)**

Mode opératoire pour la préparation de 100 ml de milieu :

1) Mélange de :

- 10 ml de solution 1
- 10 ml de solution 2
- 0,4 g de Na₂CO₃
- 0,05g d'extrait de levure
- 0,2 g de peptone
- 0,31 ml de solution AGV
- 0,8 g d'agar
- 0,1 g de CMC
- 70ml d'eau distillée

2) Mise à pH 6,8-7 du mélange.

3) Autoclavage.

4) Ajout de 10 ml de solution cystéine (2,5 g/l) filtrée stérilement.

➤ **Solution rouge Congo**

Dans un litre d'eau distillée, dissoudre :

- 1 g de rouge Congo
- 1 g de CMC

Méthode

➤ **Conditions de croissance**

- pH 6,5
- Température de 39°C
- jarre anaérobie
- dégazage au CO₂ régulier
- 7 jours de croissance

➤ **Isolement**

1) Croissance du consortium ruminal.

2) Repiquage des bactéries du consortium sur milieu RGCA en anaérobiose.

3) Après 24 h, la solution rouge Congo est ajoutée afin de recouvrir totalement le milieu.

4) Après 15 min, la solution rouge Congo est éliminée par rinçage avec une solution NaCl 1M.

5) Prélèvement des souches bactériennes autour desquelles s'est développé un halo de décoloration du rouge Congo.

- 6) Mise en collection des souches prélevées.

2 Caractérisation des bactéries fibrolytiques isolées

2.1 Mise en évidence des activités enzymatiques de *Bacillus niabensis* sur milieu gélosé

2.1.1 Activités fibrolytiques

2.1.1.1 Activité cellulolytique

Matériel

➤ **Milieu RGCA**

Voir chapitre 3, partie B, point 1.

➤ **Milieu 10**

Voir chapitre 3, partie B, point 1.

➤ **Solution rouge congo**

Voir chapitre 3, partie B, point 1.

➤ ***Bacillus Niabensis***

Culture de *Bacillus Niabensis* sur milieu 868 (solide).

Méthode

- 1) Repiquage de *Bacillus niabensis* sur milieu RGCA.
- 2) Après 24 h, la solution rouge Congo est ajoutée afin de recouvrir totalement le milieu.
- 3) Après 15 min, la solution rouge Congo est éliminée par rinçage avec une solution NaCl 1M.

2.1.1.2 Activité xylanase

Matériel

➤ **Milieu azurine crosslinked-xylane (azcl-xylane)**

➤ ***Bacillus Niabensis***

Culture de *Bacillus Niabensis* en milieu 863.

➤ **Solution enzymatique de référence**

0,1 g de xylanase (« endo 1,4-beta-xylanase Bel'Ase B210 Puratos ») est mis en solution dans 10 ml d'eau distillée.

Méthode

- 1) Dépôt de 10 µl de culture de *Bacillus Niabensis* sur le milieu azcl-xylane
- 2) Dépôt de 10 µl de la solution enzymatique de référence sur le milieu azcl-xylane
- 3) Mise à 39°C durant 24h

2.1.2 Activité protéolytique

Matériel

- **Milieu caséine solide**
- ***Bacillus niabensis***

Culture de *Bacillus Niabensis* en milieu 863

- **Solution enzymatique de référence**

0,1 g de papaïne est mis en solution dans 10 ml d'eau distillée

Méthode

- 1) Dépôt de 10 µl de culture de *Bacillus Niabensis* sur le milieu caséine.
- 2) Dépôt de 10 µl de la solution enzymatique de référence sur le milieu caséine.
- 3) Mise à 39°C durant 24h.

2.1.3 Activité amylolytique

Matériel

- **Milieu amidon solide**

L'amidon utilisé pour réaliser ce milieu est de l'amidon de riz.

- ***Bacillus niabensis***

Culture de *Bacillus Niabensis* en milieu 863.

- **Solution enzymatique de référence**

0,1 g d'amylase est mis en solution dans 10 ml d'eau distillée.

Méthode

- 1) Dépôt de 10 µl d'une culture de *Bacillus Niabensis* (en milieu 863) sur milieu caséine.
- 2) Dépôt de 10 µl de la solution enzymatique de référence sur milieu caséine.
- 3) Mise à 39°C durant 24h.

2.2 Antagonisme vis-à-vis de moisissures

Matériel

- Milieu potatoes-dextrose-agar (PDA)

Le PDA utilisé pour préparer ce milieu est du PDA «Merck 1.10130.0500».

- Souches bactériennes

- Souche référence positive :
 - *Bacillus amylolicofaciens*
- Souche vis-à-vis desquelles l'antagonisme a été testé

- *Penicillium crustosum*
- *Botritis Cinerea*
- *Trichoderma*
- *Pythium aphanidermatum*
- *Géotrichum candidum*
- *Fusarium oxysporum*
- *Penicillium expansium*
- *Cladosporium cucumérinul*
- *Aspergillus niger*

Toutes les souches utilisées pour réaliser ces tests d'antagonisme proviennent du laboratoire de Bio-industrie.

- *Bacillus Niabensis*

La souche utilisée est celle qui a été isolée à partir du consortium ruminal et conservée sur microbille à -80°C. Celle-ci est réactivée par étalement sur milieu 868.

2.3 Aspect Morphologique de *Bacillus niabensis*

Matériel

- *Bacillus niabensis*

- Culture de *Bacillus niabensis* sur milieu 868 solide
- Culture de *Bacillus niabensis* sur milieu RGCA

➤ **Microscope**

Méthode

Étude par microscopie de colonies provenant des milieux 868 et RGCA

2.4 Détermination masse cellulaire de *Bacillus niabensis*

Matériel

➤ **Filtre**

Les filtres utilisés sont des filtres en polypropylène hydrophile, de porosité 0,2 µm et de marque « Pall Life Sciences ».

➤ ***Bacillus niabensis***

Culture de *Bacillus niabensis* en milieu 863

Méthode

➤ **Matière sèche**

- 1) Filtration sous vide de x ml de milieu de culture
- 2) Mise à l'étuve à 105 °C durant 24 h

3 Production de biomasse fibrolytiques

Matériel

➤ **Milieux**

- Milieu 863 :
 - 20 g/l de glucose
 - 10 g/l peptone de caséine
 - 10 g/l d'extrait de levure
- Milieu 863 + CMC :
 - 18 g/l CMC
 - 2 g/l glucose
 - 10 g/l peptone de caséine
 - 10 g/l d'extrait de levure

Méthode

- 1) Inoculation des milieux avec *Bacillus niabensis*
- 2) Mise en culture à 39°C

3.1 Test de sporulation

Matériel

➤ **Milieu 863**

Milieu liquide, sa composition est la suivante :

- 20 g glucose
- 10 g peptone de caséine
- 10 g extrait de levure
- 1 l d'eau distillée

➤ ***Bacillus Niabensis***

Voir chapitre 3, partie B, point 2.2.

Méthode

➤ **Dénombrement par étalement**

Le dénombrement est réalisé par étalement sur des boîtes de milieu 868 de 100 µl des trois dernières dilutions de l'échantillon. Celles-ci s'effectuent de 10 en 10 dans de l'eau peptonée. Après étalement, les boîtes sont placées à 39°C durant 24h. Ce laps de temps écoulé, les colonies bactériennes présentes sur le milieu solide sont dénombrées.

➤ **Test de sporulation**

Étape 1 : Mise en culture

100 ml de milieu 863 sont inoculés avec *Bacillus niabensis*. La culture est ensuite placée durant 24h à 39°.

Étape 2 : Dénombrement

Un dénombrement par étalement est réalisé sur la culture de *Bacillus niabensis*.

Étape 3 : Induction de la sporulation

Les tubes d'eau peptonée utilisés au cours du dénombrement pour réaliser les dilutions sont plongés dans un bain à 80°C durant 10 min.

Étape 4 : Dénombrement des souches sporulées

Un nouveau dénombrement par étalement est effectué à partir des tubes d'eau peptonée ayant séjourné 10 min à 80°C.

3.2 Scale up – Culture en bioréacteur

Matériel

➤ **Bioréacteur**

Bioréacteur de 15 l de marque Biolafitte.

➤ **Milieu 863**

Voir chapitre 3, partie B, point 3.

➤ **Conditions de culture**

- volume total = 12 l
- pH 7, régulation basique par ajout de KOH 50 %
- 39°C
- surpression de 0,1 bar
- aération : 0,5 vvm
- agitation : 100 rpm

➤ **Bacillus niabensis**

Une préculture d'1 l de *Bacillus niabensis* en milieu 863 est réalisée.

➤ **Centrifugeuse SORVALL « RC 12 BP »**

Méthode

➤ **Culture biomasse en réacteur**

- 1) Inoculation de 11 l de milieu 863 avec 1 l de préculture.
- 2) Culture dans les conditions décrites ci-dessus.
- 3) Récupération d'un premier culot bactérien à partir de 4 l de milieu après 45 h (centrifugation milieu de culture à 7300.g pendant 10 min).
- 4) Récupération d'un second culot à partir du volume restant après 112 h.

➤ **Mesure des activités**

Voir Chapitre 3, partie A, point 2.

3.3 Technique post culture

Matériel

➤ **Lyophilisateur**

➤ **Cryoprotecteurs**

- Lait écrémé en poudre
- Glycérol

Méthode

➤ **Lyophilisation**

- 1) Ajout d'eau aux culots jusqu'à obtention d'une pâte.
- 2) Ajout des cryoprotecteurs (2 % massique de glycérol et 10 % massique de lait en poudre).
- 3) Mise au congélateur de la pâte.
- 4) Lyophilisation.

➤ **Calcul des rendements**

- Rendement de centrifugation : $\frac{\text{Nombre total de bactéries dans le milieu de culture liquide}}{\text{Nombre total de bactéries dans le culot bactérien}}$
- Rendement de lyophilisation : $\frac{\text{Nombre total de bactéries dans le culot bactérien}}{\text{Nombre total de bactéries au sein de la poudre lyophilisée}}$

3.4 Cytométrie en flux

Matériel

➤ **Cytomètre**

Pour effectuer nos analyses, nous avons utilisé le FACS.

➤ **Tampon PBS**

Composition du PBS :

- 8 g/l NaCl
- 0,2 g/l KCl
- 1,44 g/l Na₂HPO₄
- 0,24 g/l KH₂PO₄

➤ **Iodure de propidium**

Solution iodure de propidium 1 mg/ml.

Méthode

➤ **Comptage des cellules**

Pour effectuer un simple comptage des cellules, le culot bactérien obtenu après centrifugation à 13 000 rpm durant 1 min (Centrifugeuse Sigma 2-16 P) est remis en suspension dans du tampon PBS. Les échantillons sont ensuite analysés grâce au cytomètre.

➤ **Mortalité cellulaire**

Pour étudier la mortalité cellulaire, 10 µl de solution iodure de propidium sont ajoutés au culot bactérien. Ce mélange est ensuite remis en suspension dans du tampon PBS. Les échantillons sont ensuite analysés grâce au cytomètre.

4 Production d'enzymes fibrolytiques

Matériel

➤ **Milieu drèches de blé**

- 20 g/l drèches de blé
- 10 g/l peptone de caséine
- 10 g/l extrait de levure

➤ **Milieu drèches de blé - xylane**

- 20 g/l drèches de blé
- 1 g/l glucose
- 1 % (massique) xylane
- 10 g/l peptone de caséine
- 10 g/l extrait de levure

➤ **Milieu CMC, C/N=30**

- Milieu avec azote sous forme d'urée
 - 32,5 g/l de CMC
 - 1 g/l de glucose
 - 1 g/l d'urée
- Milieu avec azote sous forme de peptone et d'extrait de levure
 - 35 g/l de CMC
 - 1 g/l glucose
 - 2 g/l peptone de caséine
 - 2 g/l extrait de levure

➤ ***Bacillus niabensis***

Culture de *Bacillus niabensis* sur milieu solide 868.

Méthode

➤ **Culture**

- 1) Récupération des colonies présentes sur le milieu 868 avec de l'eau peptonée.
- 2) Inoculation des milieux avec les colonies récupérées.
- 3) Culture à 39°C.

➤ **Mesure des activités**

Voir Chapitre 3, partie A, point 2.

4.1 Chromatographie

Matériel

➤ **Chromatographe**

Le chromatographe utilisé est le DIONEX (HPAEC-PAD) du service de chimie biologique industrielle.

➤ **Azide de sodium**

Méthode

- 1) Dilution des échantillons
- 2) Filtration des échantillons
- 3) Ajout d'azide de sodium
- 4) Analyse DIONEX

Chapitre 4 : Résultats et discussion

A. Validation in vitro du potentiel fibrolytique des enzymes ruminales chez la volaille de chair

Les études bibliographiques montrent que le potentiel fibrolytique des enzymes associées à la phase solide du contenu ruminal (cellulosome) est plus important que celui des enzymes associées à la phase liquide. Des recherches ont donc été réalisées en vue de mettre au point une méthode d'extraction de ces enzymes attachées aux parois des bactéries associées à cette phase solide du rumen. Le résultat de ces recherches est la mise au point du protocole d'obtention de l'extrait brut d'enzymes fibrolytiques décrit précédemment au sein de la partie matériels et méthodes. La comparaison des activités obtenues dans l'extrait brut avec celles associées à la phase liquide confirme l'hypothèse théorique émise précédemment. Les conditions optimales de prélèvement du contenu ruminal solide ont été déterminées. Afin d'obtenir des activités enzymatiques maximales, la prise d'échantillons dans le rumen doit être réalisée une heure avant la distribution du repas chez les animaux nourris avec un régime à base d'ensilage d'herbe. Ces conditions ont été appliquées pour mesurer le potentiel fibrolytique de l'extrait brut sur des dérivés cellulosiques commerciaux.

1 Caractérisation des activités enzymatiques présentes au sein de l'extrait brut ruminal

La première étape de cette validation *in vitro* du potentiel fibrolytique des enzymes ruminiaux chez la volaille de chair est donc la détermination des capacités de cellulolyse des enzymes contenues au sein de cet extrait brut. Dans un premier temps, ces capacités de dégradation sont déterminées sur base de l'hydrolyse de produits cellulosiques purs. Ensuite, en relation avec le but final de ce projet, les capacités d'hydrolyse de ces enzymes ruminales sont testées sur des coproduits cellulosiques d'origine industrielle variée et dans les conditions rencontrées au sein de l'intestin des poulets.

1.1 Produits cellulosiques purifiés

Les activités enzymatiques présentes au sein de l'extrait brut ruminal ont donc été déterminées par digestion de différents produits cellulosiques synthétiques et spécifiques à chacune d'entre elles. Ces substrats sont les suivants : la carboxyméthylcellulose pour l'activité endoglucanase, l'Avicel pour l'activité exoglucanase, du PNPG pour l'activité cellobiase et enfin du papier Whatman pour l'activité cellulase brute.

Ci-dessous (figures 15, 16) sont repris les résultats obtenus au cours de ces dosages réalisés sur trois extraits bruts (prélevés à un moment préprandial et à trois jours différents)

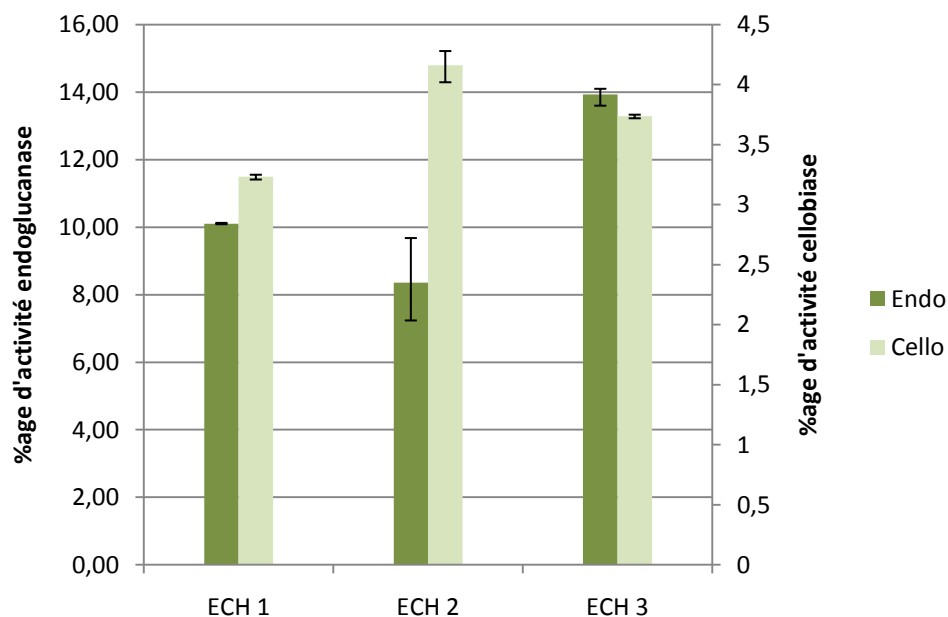


Figure 15 : Activités enzymatiques endoglucanase et cellobiase des différents extraits ruminiaux

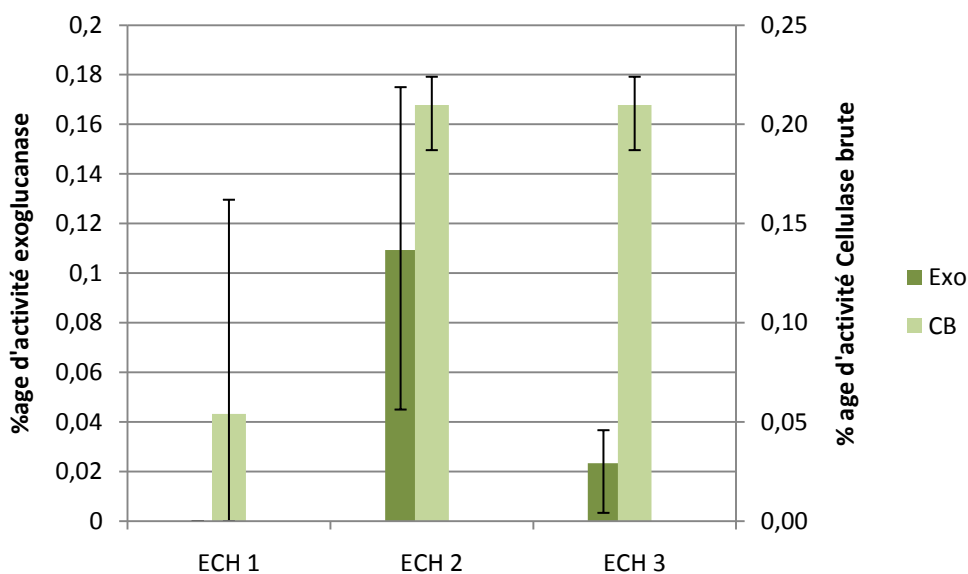


Figure 16 : Activités enzymatiques exoglucanase et cellulase brute des différents extraits ruminiaux

Les activités prédominantes de ces extraits sont l'activité endoglucanase et l'activité cellobiase. Contrairement aux deux autres activités présentes en quantités moindres, ces activités sont mesurées spécifiquement sur des substrats solubles. L'insolubilité de la suspension Avicel et du papier rend la cellulolyse plus difficile. Il est intéressant de noter qu'en vue de la digestion de coproduits, le dosage des activités sur des substrats insolubles s'avère très intéressant.

1.2 Coproduits celluloseux industriels

La présence en quantités significatives d'activités cellulolytiques au sein de l'extrait brut ayant été confirmée, il a été décidé de déterminer l'efficacité de ces capacités d'hydrolyse sur des

coproduits durant une période correspondant au temps de rétention du chyme alimentaire dans l'intestin du poulet de chair (60 minutes) et dans les conditions physico-chimiques régnant dans cet organe (pH équivalent à 6,5 et température de 39°C). L'intestin est en effet l'organe où se déroule l'absorption des différents nutriments. C'est donc au niveau de cet organe que la libération des monomères suite à l'hydrolyse des coproduits doit être maximale.

Cette digestion enzymatique des coproduits est mise en évidence par mesure des quantités de sucres réducteurs libérés suite à l'action de 15 ml d'extrait brut sur 1g de coproduit (broyé à 1mm) durant le temps d'hydrolyse imparti. Les résultats de ces dosages sont représentés sur le graphique ci-dessous. De plus, grâce aux valeurs des différents teneurs en cellulose des coproduits (Tableau 4), les pourcentages de cellulose hydrolysée peuvent être déterminés.

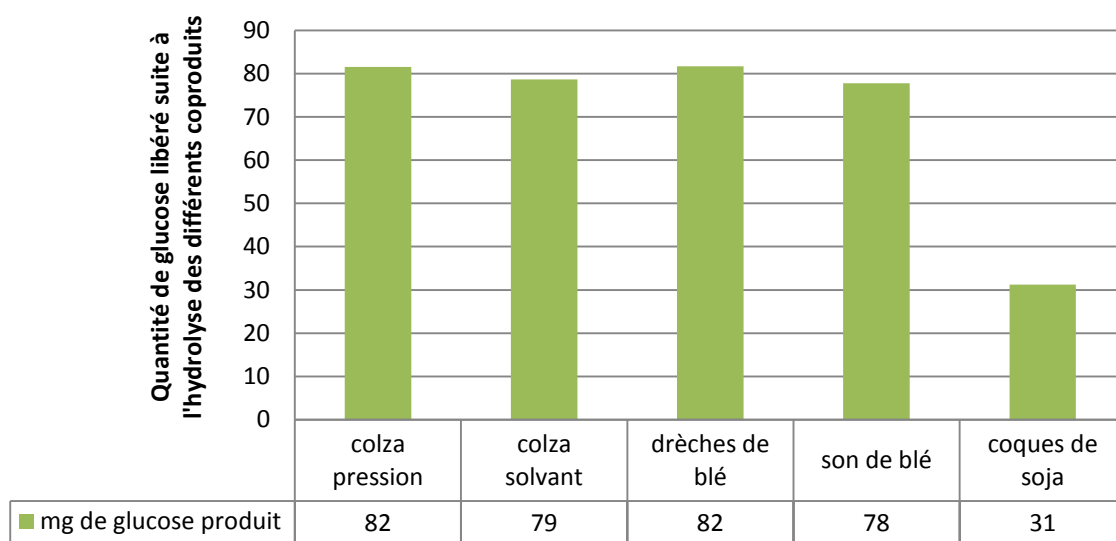


Figure 17 : Hydrolyse des coproduits par l'extrait ruminal dans les conditions intestinales du poulet de chair (15 ml/g de substrat)

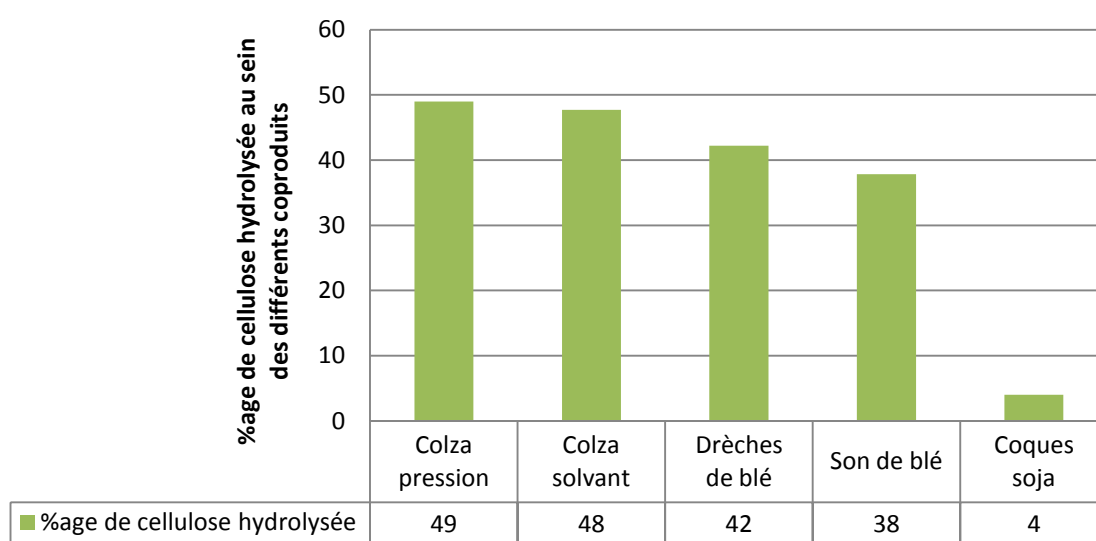


Figure 18 : %age de cellulose hydrolysée au sein de chaque coproduit suite à l'action de 15 ml d'extrait brut dans les conditions intestinales du poulet de chair

Comme le montrent ces résultats, les activités enzymatiques déterminées précédemment se sont bien traduites par une capacité d'hydrolyse de la cellulose constituant les différents coproduits dans les conditions intestinales des poulets de chair. Les quantités de glucose libérées étant proches pour l'ensemble des coproduits exceptées les coques de soja. En effet, pour celles-ci seuls 31 mg de glucose sont libérés suite à l'action de l'extrait brut dans les conditions intestinales alors que les quantités libérées sont de l'ordre de 80 mg pour les autres coproduits avec une quantité maximale de 82 mg enregistrée pour les drèches de blé et les tourteaux de colza issus d'une extraction par pression.

En ce qui concerne les pourcentages de cellulose hydrolysée, la Figure 8 montre que de nouveau, l'action des enzymes sur les coques de soja est plus difficile, seulement 13 % de cellulose hydrolysée, alors que cette même action est très efficace sur les autres coproduits et notamment au niveau des deux types de tourteaux de colza qui présentent des pourcentages d'hydrolyse de l'ordre de 50 % pour 40 % chez les drèches et le son de blé.

2 Incidence des conditions régnant au sein du système digestif des poulets de chair sur les activités enzymatiques

Après avoir caractérisé les activités présentes au sein des extraits bruts, la seconde partie de la validation *in vitro* consiste à étudier l'incidence des conditions qui règnent au sein du système digestif des poulets de chair sur ces activités. En effet, en vue d'une bonne valorisation des coproduits, il est impératif que les enzymes cellulolytiques d'origine ruminale incorporées aux rations alimentaires des poulets résistent à ces conditions protéolytiques (pepsine au niveau du gésier et pancréatine au niveau de l'intestin) et dénaturantes (pH acide au sein du proventricule et du gésier) afin d'exprimer leur potentiel dans l'intestin grêle.

Des travaux réalisés au cours de ce projet ont déjà montré que les activités endoglucanase et cellulase brute résistent bien aux deux protéases citées précédemment. Par contre, le pH se révèle plus agressif sur ces deux activités de l'extrait brut et surtout sur l'activité endoglucanase. Une chute de 60 % de celle-ci est en effet enregistrée après passage par les conditions du gésier (pH = 3 et présence de pepsine). Afin de déterminer le temps nécessaire aux agents dénaturants et protéolytiques pour induire cette chute (temps d'action des enzymes fibrolytiques), les cinétiques de dégradation des activités enzymatiques, endoglucanase, cellobiase et cellulase brute sont établies pour chacun de ces agents.

2.1 Étude de l'effet des conditions régnant au sein de l'estomac sur les enzymes ruminiaux

Pour débiter, ce sont donc les effets des agents rencontrés au sein de l'estomac qui sont testés. Les premières cinétiques établies montrent le résultat d'une action conjuguée du pH de 3 et de la

pepsine alors qu'en second lieu, ce sont les cinétiques de dégradation correspondant à l'action du pH seul qui sont établies. Ces cinétiques sont représentées ci-dessous sous forme de graphique et les valeurs des activités s'y rapportant sont reprises au sein de tableaux.

2.1.1 Cinétique de dégradation des activités enzymatiques suite à l'action conjuguée de la pepsine et d'un pH = 3

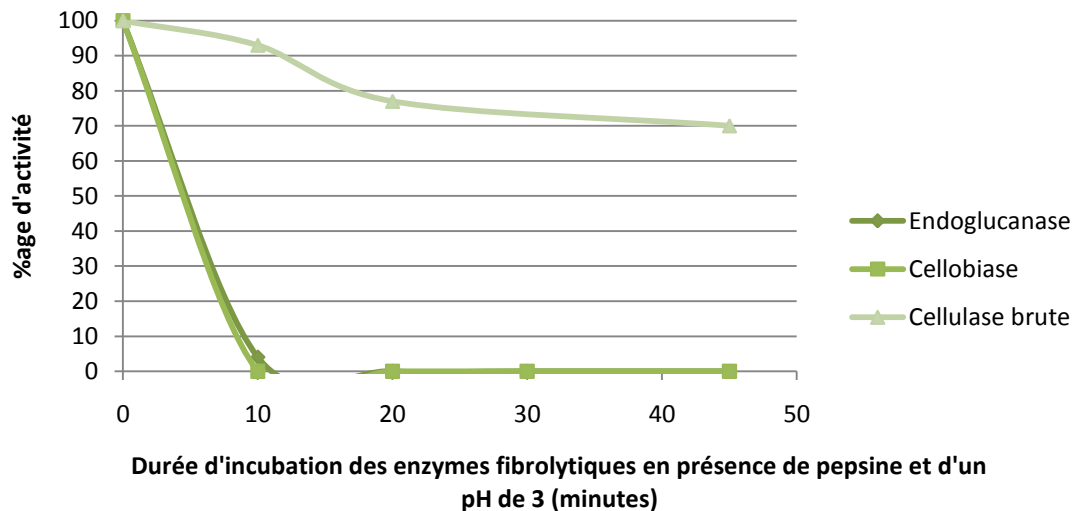


Figure 19 : Perte d'activité enzymatique de l'extrait ruminal induite par l'action conjuguée de la pepsine et du pH = 3

Les résultats obtenus lors de l'étude de la cinétique de dégradation des enzymes cellulolytiques suite à l'effet conjugué d'un pH = 3 et de la pepsine montrent une chute rapide et très importante des deux activités enzymatiques majoritairement présentes dans l'extrait brut, l'endoglucanase et la cellobiase. L'activité endoglucanase passant en 10 min d'une valeur de 10,1 UI/ml d'EB à 0,41 UI/ml d'EB et la seconde passant de nouveau en 10 min d'une valeur de 3,23 à une valeur nulle. La diminution subie par l'activité cellulase brute est quant à elle plus limitée et moins brusque, puisque le pourcentage minimum d'activité de 70 % est enregistré après 45 min d'incubation. Les valeurs d'activité de l'exoglucanase sont quant à elles trop faibles pour qu'une cinétique de dégradation soit observable.

2.1.2 Cinétique de dégradation des activités enzymatiques suite à l'action du pH = 3 seul

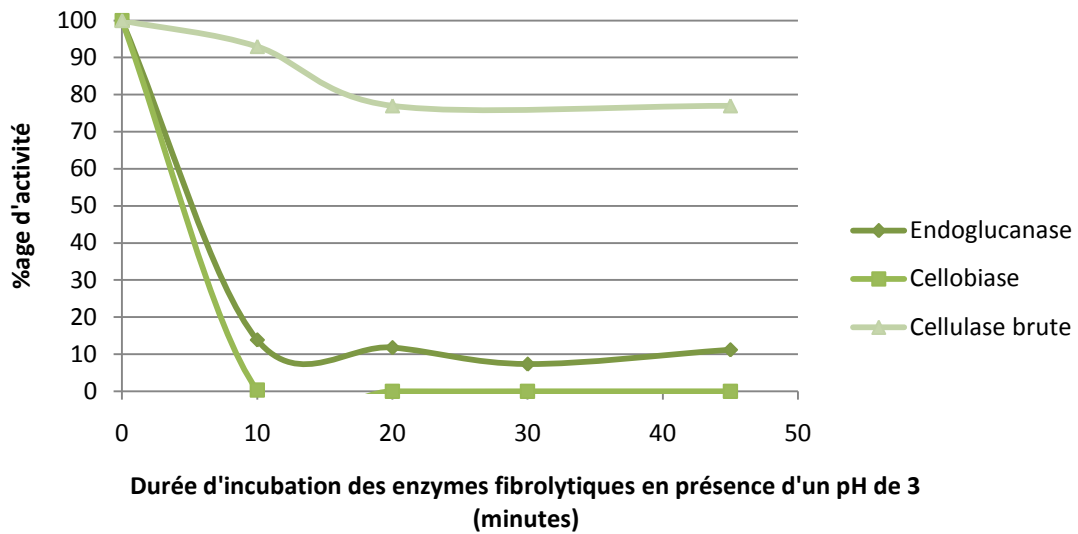


Figure 20 : Perte d'activité enzymatique de l'extrait ruminal induite par l'action dénaturante du pH = 3

Tout comme pour l'effet conjugué du pH et de la pepsine, l'effet du pH seul sur les activités enzymatiques est très rapide puisqu'une chute des valeurs des deux activités majeures est de nouveau observée après seulement 10 min en présence de l'agent dénaturant. En effet, après ce laps de temps, la diminution pour l'activité endoglucanase est de l'ordre de 86 % et de 100 % pour l'activité cellobiase. Pour la cellulase brute, les mêmes observations que celles effectuées lors de l'action conjuguée de la pepsine et du pH sont valables, si ce n'est que le pourcentage minimum est de 77 % et qu'il est déjà enregistré après 20 min. Il est également impossible de déterminer l'effet engendré par le pH sur l'activité exoglucanase.

2.2 Étude de l'effet des conditions régnant au sein de l'intestin grêle sur les enzymes ruminales

De la même manière que pour les conditions rencontrées au sein du gésier, les cinétiques de dégradation des activités enzymatiques suite à l'action de la pancréatine sont établies. Celles-ci sont représentées sur le graphique ci-dessous

2.2.1 Cinétique de dégradation des activités enzymatiques suite à l'action de la pancréatine

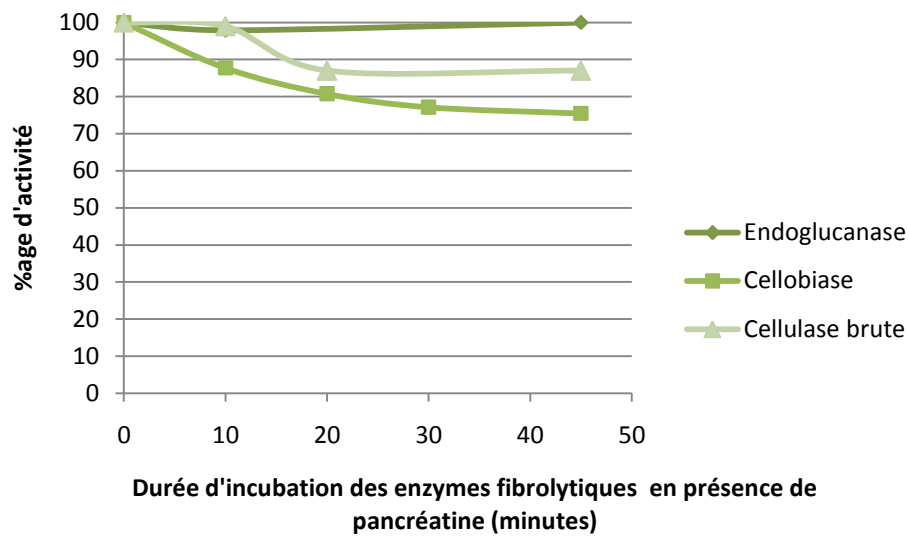


Figure 21 : Perte d'activité enzymatique de l'extrait ruminal induite par l'action protéolytique de la pancréatine

Comme on peut le voir sur la figure 21, la plus forte diminution observée concerne l'activité cellobiase qui passe en effet de 4,16 à 3,14 en 45 min. Cette chute représente une perte de 25 % de l'activité de départ. Cependant, contrairement aux deux cinétiques établies précédemment, cette chute augmente tout au long des 45 min de contact avec l'agent protéolytique alors que précédemment après 10 min de contact la chute d'activité était à son maximum ou presque. L'activité endoglucanase, quant à elle, est stable et ne semble donc pas affectée par la pancréatine. Enfin, l'activité cellulase brute diminue de nouveau légèrement durant les 20 premières minutes d'incubation, pour atteindre un pourcentage minimum de 87 %. L'activité exoglucanase étant de nouveau trop faible pour établir une cinétique de dégradation.

2.3 Simulation *in vitro* de la digestion complète de coproduits (Tervilä-Wilo et al., 1996)

Après l'étude indépendante de l'effet de chacun des facteurs protéolytiques, une simulation *in vitro* de la digestion complète de coproduits industriels cellulosiques a été réalisée. De plus, afin d'évaluer la perte de digestibilité induite dans ces conditions, une hydrolyse durant 2h15 (temps total de rétention du bol alimentaire depuis l'ingestion jusqu'à la sortie de l'intestin grêle) des mêmes coproduits par les enzymes de l'extrait brut dans des conditions optimales (pH = 6,5 ; 39°C ; absence d'agents dénaturants et protéolytiques) a été effectuée. Les deux hydrolyses ont alors été comparées sur base des pourcentages de cellulose hydrolysée et de la quantité de glucose libérée. Les résultats de ces études comparatives sont représentés ci-dessous sur la Figure 22 et la Figure 23.

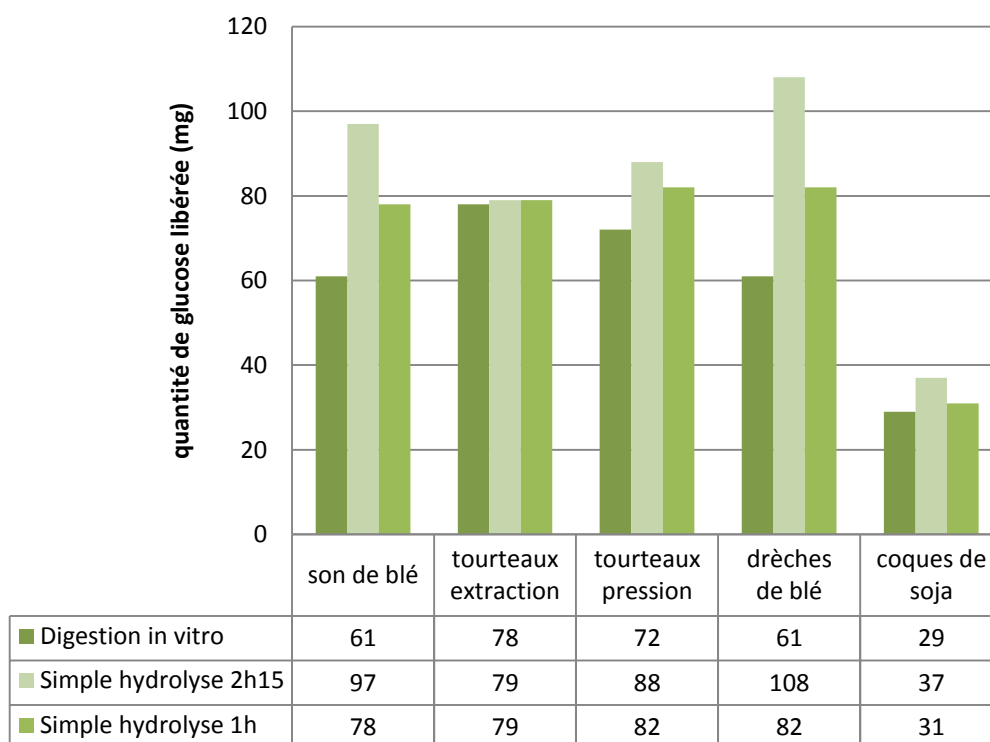


Figure 22 : Quantité de glucose solubilisée par les extraits ruminiaux à partir des différents coproduits au cours de la digestion simulée *in vitro* et d'une simple hydrolyse (15 ml/ g de substrat)

Dans le cas d'une simple hydrolyse (l'absence des conditions protéolytiques), ce sont les drèches de blé qui lorsqu'elles sont mises en contact avec 15 ml d'extrait brut impliquent la plus forte libération de glucose. Le taux d'hydrolyse diminue ensuite pour les autres coproduits : le son de blé, les deux types de tourteaux de colza et les coques de soja.

Lorsque la digestion complète est simulée (conditions dénaturantes et protéolytiques), ce sont les tourteaux de soja obtenus par extraction au solvant qui produisent par hydrolyse la plus importante concentration en glucose. Ensuite, viennent les tourteaux issus du procédé d'extraction par pression, les drèches et son de blé et enfin, les coques de soja qui, comme dans le cas de l'hydrolyse simple, permettent une libération nettement inférieure à celles observées pour les autres coproduits.

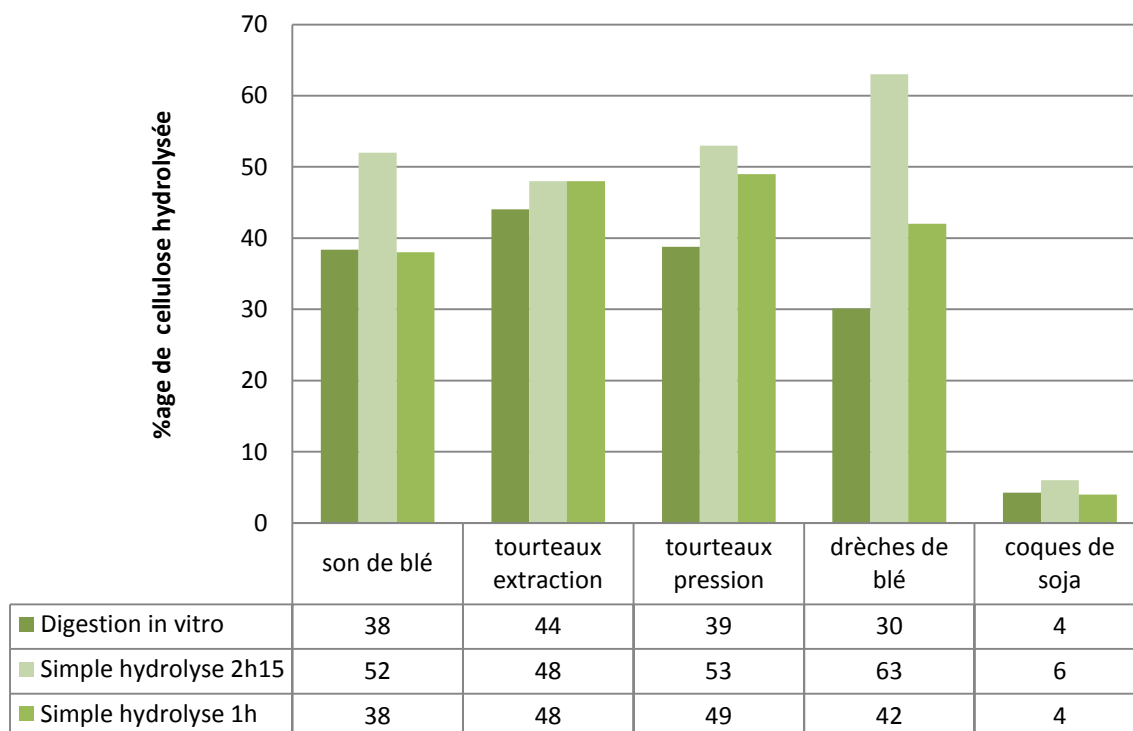


Figure 23 : %age de cellulose hydrolysée par extrait ruminal à partir des différents coproduits au cours de la digestion simulée *in vitro* et d'une simple hydrolyse (15 ml/g de substrat)

Grâce aux teneurs en cellulose déterminées au cours d'expérimentations réalisées dans le cadre de ce projet pour chacun des coproduits, il a été possible de déterminer le pourcentage de cellulose hydrolysée au cours des deux types d'hydrolyse. Ces résultats sont en parfait accord avec les quantités de glucose libéré dans le milieu. Les drèches de blé présentent le pourcentage de cellulose hydrolysée le plus important mais sont également le coproduit subissant la diminution la plus importante suite à la simulation de la digestion *in vitro*. Les tourteaux de colza issus du procédé d'extraction par solvant résistent très bien à la digestion et présentent le pourcentage de cellulose hydrolysée le plus important au cours de cette digestion *in vitro* alors que les coques de soja sont, quant à elles, le type de coproduit qui présente le pourcentage d'hydrolyse le plus faible.

De plus, les deux figures ci-dessus montrent que si la digestion *in vitro* entraîne une chute des quantités de glucose libéré et des pourcentages de cellulose hydrolysée pour chacun des coproduits, cette diminution n'est pas si importante par rapport aux valeurs obtenues lors de l'hydrolyse simple de ces mêmes coproduits.

B. Modèle ex vivo de production des enzymes fibrolytiques ruminales

La première partie de nos travaux a bien mis en évidence le potentiel hydrolytique de l'extrait ruminal sur les coproduits lignocellulosiques.

Le but de cette seconde recherche est de produire *ex vivo* des enzymes cellulolytiques à partir de souches isolées du rumen afin de maximiser la quantité d'enzymes produites.

1 Isolement de souches cellulolytiques ruminales

La première étape de la production d'enzymes en modèle *ex vivo* (bioréacteurs) consiste en l'isolement d'une population bactérienne reproduisant efficacement les potentialités cellulolytiques du microbiome ruminal. Comme explicité au chapitre Matériels et Méthodes, la technique d'isolement mise en place correspond à la méthode d'extraction des bactéries cellulolytiques ruminales associées à la phase solide développée pour la production de l'extrait brut ruminal. Des conditions d'anaérobioses sont nécessaires au maintien d'une biomasse suffisante et viable pour constituer un inoculum efficace pour la production de bactéries cellulolytiques en bioréacteur. Le consortium est mis en culture sur un milieu gélosé spécifique où les vitamines et les facteurs de croissance essentiels ont été apportés par du liquide ruminal clarifié et stérilisé.

Des bactéries cellulolytiques sont sélectionnées à partir de ce consortium grâce à un milieu enrichi en carboxyméthylcellulose et coloré avec du rouge Congo pour visualiser les souches positives. Les souches manifestant les halos d'hydrolyse les plus importants ont été mises en collection par cryoconservation.



Figure 24 : Halo d'hydrolyse observé lors de l'isolement de souches cellulolytiques d'origine ruminale.

Parmi les bactéries sélectionnées, l'une d'entre elles s'avère être plus efficace que les autres en termes de cellulolyse, elle est donc choisie en vue de la mise au point d'un modèle *ex-vivo* de production d'enzymes fibrolytiques. Au préalable, elle a été identifiée par le laboratoire de BCCM/LMG via un test 16s-rDna. Le résultat de ce dernier montre une homologie de 99,6% entre la souche isolée et *Bacillus niabensis* au niveau de ce fragment d'ADN.

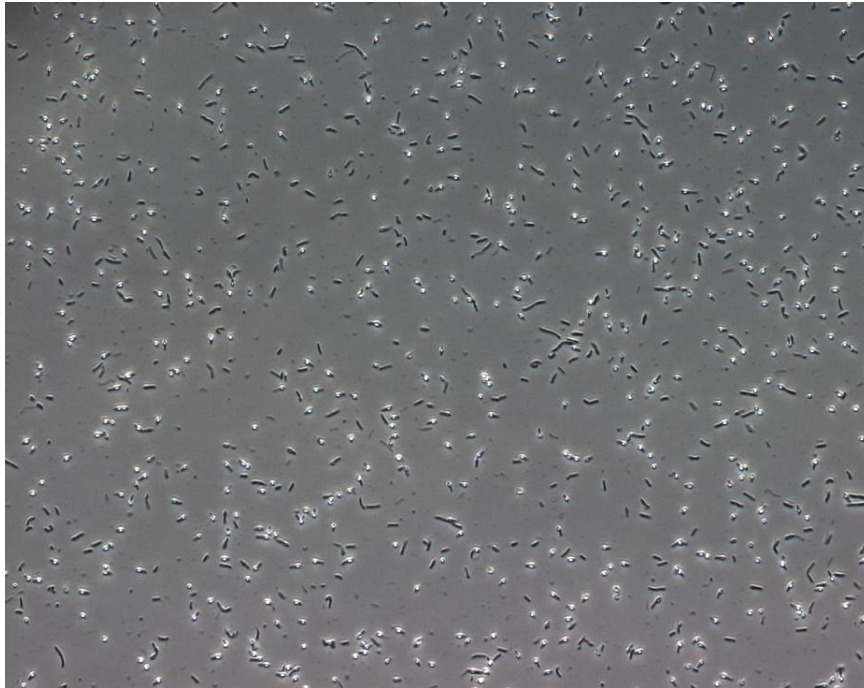


Figure 25 : Photographie par microscopie de cellules bactériennes du type *Bacillus niabensis* issues d'une culture sur milieu RGCA

2 Conservation des souches

Toutes les souches cellulolytiques isolées sont conservées à -80°C. Deux méthodes de conditionnement sont utilisées en vue de ce stockage à très basse température. La première consiste à conserver les bactéries à la surface de microbilles alors que la deuxième consiste à réaliser des « working seed ». Après plusieurs tests mettant en jeu ces deux méthodes, il s'est avéré que les « working seed » sont nettement plus sensibles aux contaminations que les microbilles. C'est donc cette méthode de conservation qui a été privilégiée par la suite, notamment au cours des expériences visant à caractériser la souche cellulolytique, *Bacillus niabensis*. En effet, ce travail s'est seulement porté sur la culture de cette souche. Les autres souches isolées seront étudiées ultérieurement dans le cadre du projet.

3 Caractérisation de *Bacillus niabensis*

Dans l'arbre phylogénétique des Bacilles basé sur les homologues de séquence des RNA 16S, *Bacillus niabensis* est relativement proche de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, ...

Nos tests visant à caractériser *Bacillus niabensis* se sont donc basés sur les propriétés des souches voisines connues dans le laboratoire et plus particulièrement :

- La morphologie et l'aptitude à sporuler ;
- La recherche de propriétés antagonistes vis-à-vis de moisissures ;
- La mise en évidence des activités enzymatiques.

3.1 Aspect morphologique

Bacillus niabensis a été cultivée sur deux milieux différents : un milieu riche en glucose (868) et un milieu pauvre en glucose (RGCA).

Sur ces deux milieux, les colonies bactériennes se présentent différemment comme le montrent les photographies réalisées.

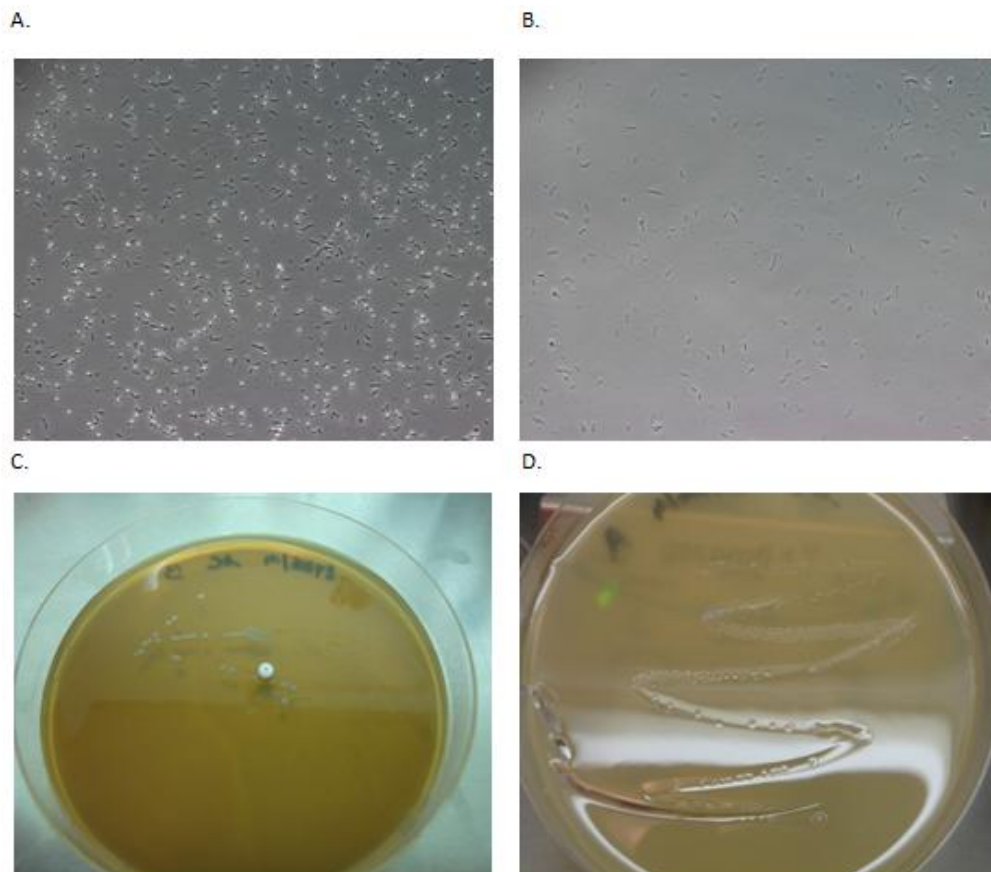


Figure 26 : Morphologie de *Bacillus niabensis*: A. : Photo par microscopie d'une colonie de *Bacillus niabensis* repiquée sur milieu RGCA – B. : Photo par microscopie d'une colonie de *Bacillus niabensis* repiquée sur milieu 868 – C. : Colonies de *Bacillus niabensis* repiquées sur milieu RGCA – D. : Colonies de *Bacillus niabensis* repiquées sur milieu 868

Sur milieu RGCA la présence de spores est visible et les colonies ont un aspect extérieur blanchâtre alors que sur le milieu riche (868) les souches ne sporulent pas et les colonies apparaissent transparentes.

Suite aux résultats montrant le caractère sporulant de la souche sur boîte de petri, un test standard visant à mesurer le taux de sporulation en milieu liquide (culture de 24h) a été réalisé. Celui-ci consiste à imposer aux colonies une température de 80°C durant 10 min et d'ensuite réétaier celles-ci sur un milieu riche. Contrairement à ce qui était attendu (Soon-Wo *et al.*, 2007), le test se révéla négatif. Les résultats du dénombrement des bactéries après traitement à la température figurent au sein du tableau suivant.

Tableau 5 : Dénombrements effectués au cours des tests de sporulation de *Bacillus niabensis* cultivé en milieu liquide durant 24h (CFU/ml)

	Dénombrement avant 80°C	Dénombrement après 80°C
Culture 1	3×10 ⁸	Aucune colonie pour les taux
Culture 2	2,5×10 ⁸	Aucune colonie pour les taux

Aucune colonie n'est donc obtenue pour des taux de dilution $\geq 10^5$. Si le taux de sporulation est faible dans ces conditions de culture, le nombre de cellules sporulées est donc inférieur à 10^5 .

3.2 Antagonisme vis-à-vis de moisissures

La seconde étape de cette caractérisation est la recherche d'antagonismes entre *Bacillus niabensis* et diverses moisissures phytopathogènes ou contaminantes d'aliments.

Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus au cours des tests d'antagonismes réalisés entre la souche isolée, *Bacillus niabensis*, et les différentes souches pathogènes.

Tableau 6 : Tests d'antagonisme de *Bacillus niabensis* vis-à-vis de moisissures

Souche	Négatif
Penicillium crustosum	×
Botrytis cinerea	×
Trichoderma	×
Pythium aphanidermatum	×
Géotrichum candidum	×
Fusarium oxysporum	×
Penicillium expansum	×
Cladosporium cucumérinul	×

Comme on peut le voir, *Bacillus niabensis* n'exprime aucune action antagoniste vis-à-vis des souches testées.

3.3 Mise en évidence des activités enzymatiques de BN sur milieu gélosé

Différents tests préliminaires visant à mettre en évidence les activités enzymatiques présentes chez *Bacillus niabensis* ont été réalisés sur des milieux gélosés spécifiques contenant les substrats des enzymes choisies et permettant une visualisation directe de l'activité (halo transparent d'hydrolyse) ou indirecte (modification de couleur suite à la réaction entre le substrat hydrolysé et un réactif de coloration spécifique).

Les activités suivantes ont été recherchées :

- Cellulase sur milieu RGCA avec décoloration de rouge Congo car le substrat est hydrolysé ;
- Xylanase sur milieu AZCL-xylane avec apparition d'une coloration bleue lorsque le substrat est hydrolysé ;
- Protéase sur milieu caséine avec apparition d'un halo transparent lorsque le substrat est hydrolysé ;
- Amylase sur milieu à base d'amidon de riz avec apparition d'un halo transparent lorsque le substrat est hydrolysé.

Un témoin positif avec les enzymes de référence a été utilisé lors de chaque test.

Les résultats montrent que *Bacillus niabensis* possède une activité cellulase ce qui confirme notre test d'isolement (Figure 27).



Figure 27 : Mise en évidence activité cellulolytique de *Bacillus niabensis* par un test au rouge Congo

Une activité xylanase est aussi bien présente. Comme le montre la figure ci-dessous (Figure 28), cette activité est assez importante puisque les halos de coloration observés pour les échantillons de

Bacillus niabensis sont comparables à celui observé au niveau du témoin positif (xylanase en solution). Par contre, nous n'avons pas observé d'activité protéolytique ni d'activité amylolytique. Ce dernier résultat est intéressant car la présence de protéase causerait une dégradation des autres activités.

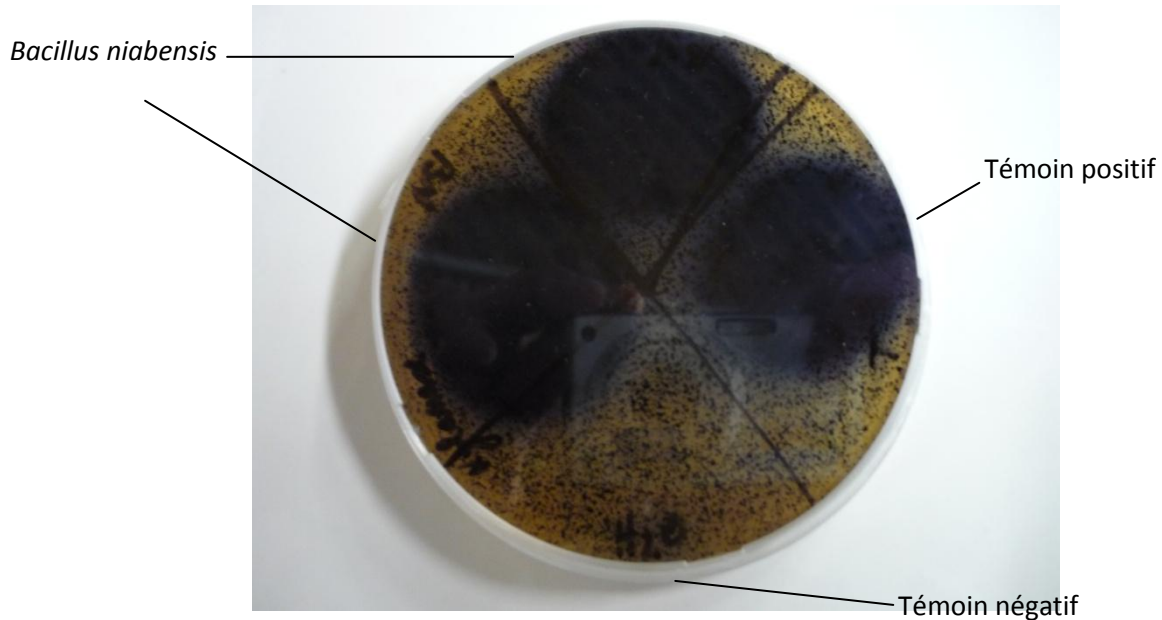


Figure 28 : Mise en évidence activité xylanase de *Bacillus niabensis* sur milieu AZCL-xylane

4 Production de biomasse fibrolytique

Bacillus niabensis a d'abord été mis en culture liquide sur milieu 863, milieu soluble qui permet de suivre la biomasse par mesure de l'évolution de la densité optique à 600 nm.

Le dénombrement de cellules vivantes a aussi été réalisé en parallèle sur milieu 868.

La Figure 29 et le tableau 7 montrent l'évolution de la culture durant 55 h et de ses différents paramètres. Le graphique montre bien la présence de 4 phases caractéristiques de la croissance bactérienne sur milieu non renouvelé : la phase de latence, de 0 à 7 h ; la phase exponentielle, de 7 à 28 h ; la phase stationnaire, de 28 à 31 h et la phase de déclin de 48 à 55 h. Il met également en évidence un parallélisme entre l'évolution de la biomasse et celle de la densité optique au sein de la culture durant la phase de croissance bactérienne

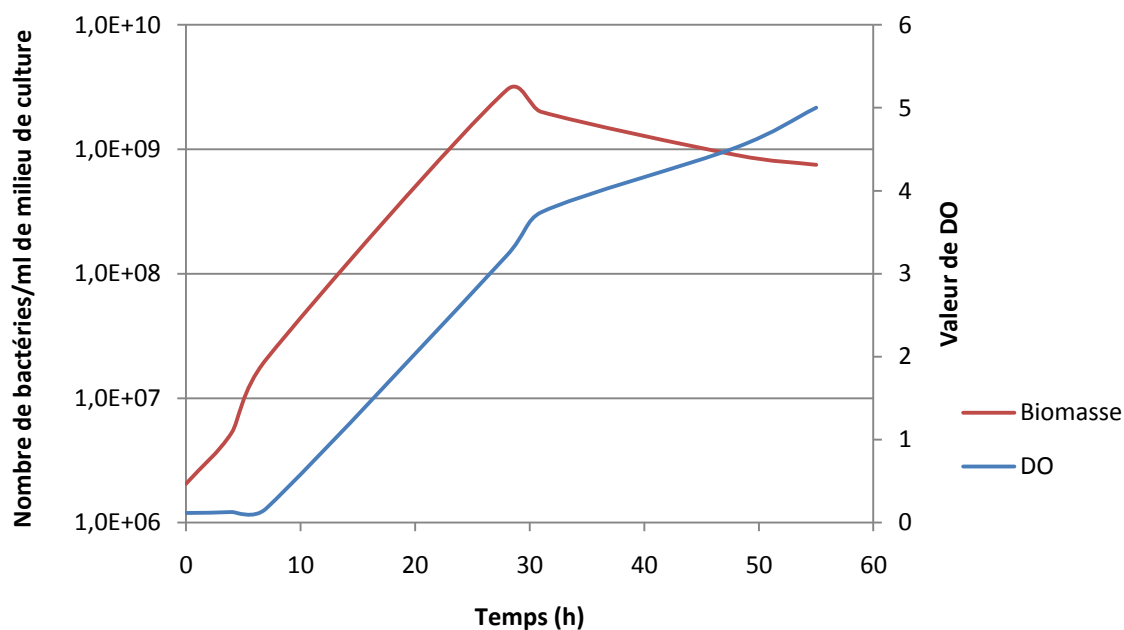


Figure 29 : Evolution de la biomasse et de la densité optique au sein d'une culture de *Bacillus niabensis* en milieu 863

Tableau 7 : Valeurs en fonction du temps de la DO, du pH et de la biomasse au sein d'une culture de *Bacillus niabensis* en milieu 863

Temps (h)	DO	pH	Biomasse
0	0,12	6,25	2,05.10 ⁶
4	0,13	6,16	5,30.10 ⁶
7	0,17	6,14	2,05.10 ⁷
28	3,22	4,79	3,00.10 ⁹
31	3,74	4,75	2,00.10 ⁹
48	4,52	4,55	9,00.10 ⁸
55	5,00	4,40	7,50.10 ⁸

En inoculant à une concentration de 2.10^6 CFU/ml le maximum de cellules est obtenu après 28h soit 3.10^9 CFU/ml. Ensuite, la population a diminué. Le pH s'est acidifié durant la culture et est passé de 6,25 à 4,40 ; ce qui signifie que seul le glucose est consommé comme source de carbone.

À cet égard il faut savoir que nous avons mesuré la quantité de matière que représentent les cellules (Tableau 8).

Tableau 8 : Masse cellulaire de *Bacillus niabensis*

Echantillon	masse de 10 ⁸ cellules (mg)
Ech. A	0,23
Ech. B	0,21
Ech. A	0,25
Ech. B	0,27

La production de $3 \cdot 10^9$ CFU/ml correspond donc à 7,2 mg/ml de matière ; ce qui représente un rendement sur glucose de 36 % ($\frac{\text{biomasse}}{\text{masse de glucose}} \times 100$). Cette valeur est donc légèrement inférieure aux 50 % préconisés théoriquement.

Un second essai de production de biomasse a été réalisé sur milieu 863 supplémenté en CMC, cellulose soluble.

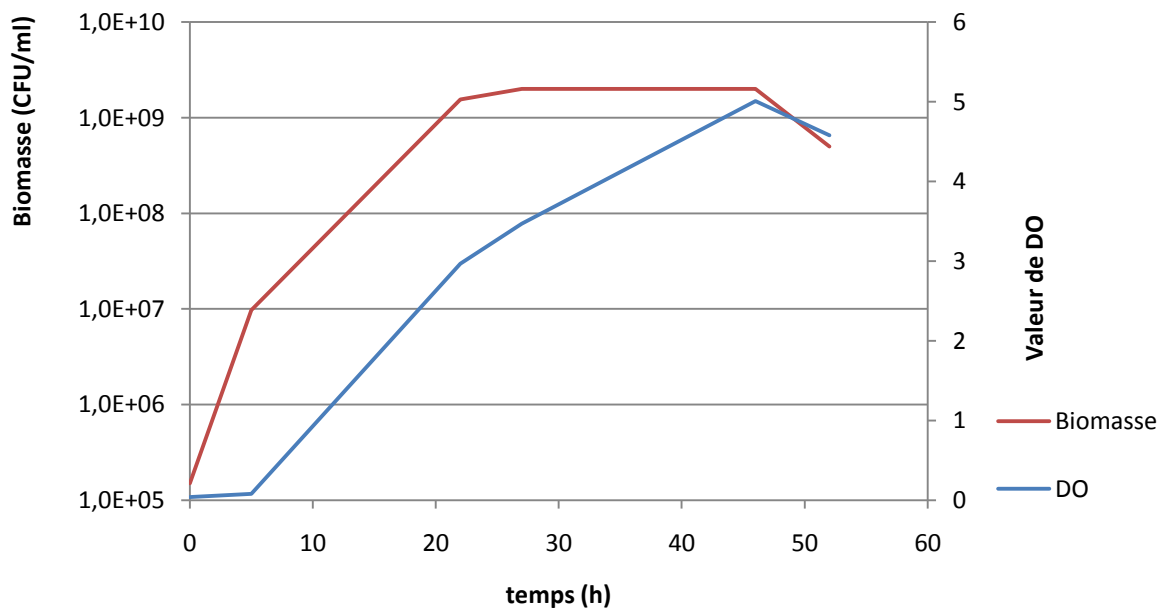


Figure 30 : Evolution de la biomasse et de la densité optique au sein d'une culture de *Bacillus niabensis* en milieu 863 + CMC

Tableau 9 : Valeurs en fonction du temps de la DO, du pH et de la biomasse au sein d'une culture de *Bacillus niabensis* en milieu 863 + CMC

Temps (h)	DO	Biomasse
0	0,04	$1,50 \cdot 10^5$
5	0,08	$9,70 \cdot 10^7$
22	2,97	$1,55 \cdot 10^9$
27	3,47	$2,00 \cdot 10^9$
46	5,01	$2,00 \cdot 10^9$
52	4,58	$5,00 \cdot 10^8$

Comme le montrent la représentation graphique de l'évolution au cours du temps de la biomasse et les valeurs de cette dernière reprise au sein du tableau, la population bactérienne maximale est atteinte après 27h de culture. En 27h le nombre de cellules est ainsi passé de $1,5 \cdot 10^5$ à $20 \cdot 10^8$, le nombre de bactéries ayant donc été multiplié par 10^4 au cours de ce laps de temps (phase exponentielle de croissance). Après avoir atteint ce maximum, la population se stabilise (phase stationnaire) avant de commencer à décroître légèrement pour atteindre $5 \cdot 10^8$ souches après 52h de culture (phase de déclin).

Grâce aux courbes représentées sur la Figure, un parallélisme entre l'évolution de la biomasse et celle de la densité optique au sein de la culture est mis en évidence.

Cette culture s'est donc comportée de manière semblable à celle réalisée ci-avant.

En fin de culture et puisque de la CMC avait été apportée, nous avons dosé les activités endoglucanase et cellulase brute. Elles étaient respectivement de 0,94 UI/ml et 0,10 UI/ml, ce qui est relativement faible par rapport aux activités mesurées dans l'extrait ruminal.

4.1 Scale up

Après ces productions de biomasse en petits volumes d'environ 100 ml, une montée en échelle fut réalisée. Cette dernière s'est traduite par la réalisation d'une culture en bioréacteur de 15 l sur milieu 863.

Ci-dessous sont repris les résultats des différents dénombrements effectués au cours du temps sur la culture de *Bacillus niabensis* en bioréacteur.

Tableau 10 : Evolution de la biomasse de *Bacillus niabensis* au sein du bioréacteur

Temps (h)	Biomasse(CFU/ml)
0	$17 \cdot 10^5$
17	$2,5 \cdot 10^8$
41	$2,5 \cdot 10^8$
45	$2 \cdot 10^8$
112	$1,5 \cdot 10^8$

Selon les résultats obtenus, la biomasse maximale est atteinte en seulement 17h, et est équivalente à $2,5 \times 10^8$ souches par ml de milieu 863, ce qui est faible par rapport aux résultats obtenus en fioles.

4.2 Technique post-culture

Différentes techniques peuvent être mises en œuvre pour conditionner de la biomasse sous une forme facilement stockable et transportable. Afin de conserver toutes les propriétés intéressantes présentes au sein du milieu de culture liquide, il est nécessaire que la méthode mise en œuvre soit la moins dégradante possible.

4.2.1 Lyophilisation

La lyophilisation est une technique couramment utilisée en microbiologie en vue de la conservation d'une biomasse bactérienne. La résistance de *Bacillus niabensis* à ce traitement a donc été testée au cours de cette étape du travail.

Au cours de la culture en bioréacteur, décrite précédemment, le culot bactérien obtenu après centrifugation du milieu de culture a été récupéré à deux reprises, une première récupération partielle après 45h et la récupération finale après 112h. Les concentrations cellulaires obtenues dans le fermenteur, la pâte bactérienne et la poudre bactérienne après ces deux laps de temps, les rendements de centrifugation et de lyophilisation sont présentés ci-dessous.

Tableau 11 : Effet de la lyophilisation sur la population bactérienne

Temps (h)	Conc. cell. milieu de culture (CFU/ml)	Conc. cell. pâte bactérienne (CFU/ml)	Conc. cell. poudre (CFU/g)
45	$2 \cdot 10^8$	$13,3 \cdot 10^9$	$15,5 \cdot 10^8$
112	$1,5 \cdot 10^8$	$8,5 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^8$

Tableau 12 : Rendement de centrifugation et de lyophilisation obtenus à partir des milieux de culture en bioréacteur

Temps (h)	Rendement de centrifugation (%)	Rendement de lyophilisation (%)
45	71	3
112	93	2

Comme le montre le tableau ci-dessus, le rendement de centrifugation calculé après 45 h de culture (71 %) est inférieur à celui obtenu après 112 h (93 %). Les rendements de lyophilisation sont quant à eux très faibles aussi bien après 45 h (3 %) qu'après 112 h (2 %). Malgré ces valeurs très faibles, le Tableau 11 montre que les concentrations cellulaires au sein des poudres lyophilisées sont encore de l'ordre de $10^8 - 10^9$ CFU/g.

4.3 Cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique au cours de laquelle, les particules sont entraînées par un flux liquide. Celles-ci défilent à très grande vitesse dans le faisceau d'un laser. Suite à la réémission de lumière par diffusion ou fluorescence, les bactéries peuvent être dénombrées et caractérisées selon plusieurs critères.

En vue de la détermination du nombre de souches présentes dans un milieu liquide, cette technique pourrait donc concurrencer les techniques habituelles de dénombrements sur milieu solide. L'avantage majeur de cette technique optique, est son temps de réponse presque instantané alors que les résultats des dénombrements classiques ne peuvent être obtenus en moins de 24 h. De plus, grâce à des marqueurs spécifiques, la caractérisation des bactéries cellulolytiques pourrait être réalisée au sein d'une population bactérienne complexe ; ce qui permettrait de vérifier efficacement et rapidement la qualité de la culture.

Une analyse par cytométrie de flux a donc été réalisée sur une culture de *Bacillus niabensis*. Malheureusement, les résultats obtenus ne peuvent être exploités car les suspensions étaient trop peu concentrées en cellules.

5 Production d'enzymes fibrolytiques

Les essais précédents montrent qu'il est possible d'obtenir une biomasse importante de *Bacillus niabensis* par culture en milieu liquide, il était nécessaire de passer à l'étape suivante en vue de la mise au point du modèle *ex-vivo* de production enzymatique, l'induction enzymatique. Selon la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), celle-ci peut se définir comme étant le processus par lequel une enzyme inductible par opposition à une enzyme constitutive (enzyme produite de manière continue par le noyau, sans égard à l'environnement biochimique de la cellule)

est synthétisée en réponse à une molécule spécifique (inducteur). La molécule inductrice est souvent le substrat ou un composé contenant le substrat de l'enzyme.

Plusieurs essais ont été entrepris pour produire les enzymes toujours en ajoutant des inducteurs mais de natures différentes et en n'apportant pas de glucose :

- Un milieu contenant uniquement des drèches de blé comme source de sucre ;
- Un milieu contenant des dèches de blé et du xylane en tant que source de sucre.

Un dernier essai a été réalisé en utilisant un milieu au rapport $\frac{\text{carbone}}{\text{azote}}$ élevé (=30) pour favoriser la cellulolyse.

5.1 Milieu à base de drèches de blé

Ce milieu contenait 20 g/l de drèches de blé qui contiennent elles-mêmes 13 % de cellulose.

Le tableau ci-dessous présente les activités enzymatiques induites au sein du milieu. Au moment du dosage des activités cellulosiques, c.-à-d. après 72h de culture, les taux de biomasse au sein des milieux de culture étaient les suivants :

- Culture 1 : 12×10^8 souches / ml de culture
- Culture 2 : 16×10^8 souches / ml de culture

Tableau 13 : Activités enzymatiques induites au sein du milieu à base de drèches de blé

	Endoglucanase (UI/ml)	Exoglucanase (UI/ml)	Cellobiase (UI/ml)	Cellulase brute (UI/ml)	Xylanase (UI/ml)
Fiole 1	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00
Fiole 2	0,00	0,37	0,03	0,00	0,00
Moyenne	0,00	0,19	0,03	0,00	0,00
Ecart type	0,00	0,26	0,01	0,00	0,00

Comme le montrent ces résultats, aucune activité enzymatique ne peut être mise en évidence au sein de ces cultures de *Bacillus niabensis* alors qu'une croissance microbienne a bien lieu puisqu'à partir d'une population d'environ 10^6 , 12×10^8 et 16×10^8 cellules / ml de culture ont été dénombrées après 72h au sein des deux échantillons. Ces croissances microbiennes importantes ayant eu lieu au sein de ces milieux dépourvus de glucose sous forme libre, impliquent que les souches ont utilisé le glucose de la cellulose au sein des drèches et qu'une cellulolyse a donc bien eu lieu malgré l'absence de production d'enzymes extracellulaires relatives à ce type d'hydrolyse. Cette absence pourrait être expliquée par le fait que les enzymes cellulolytiques seraient intramembranaires. Afin de confirmer cette hypothèse, les protocoles de dosages des activités enzymatiques ont été modifiés. Les modifications apportées sont relatives à la nature des échantillons mis à réagir avec les substrats cellulosiques spécifiques au dosage de chaque activité enzymatique. Alors que durant un dosage

classique, les échantillons utilisés correspondent à du milieu de culture centrifugé et donc dépourvu de toute bactérie. La première méthode alternative consiste à travailler avec des échantillons correspondant à du milieu de culture n'ayant pas subi de centrifugation et contenant donc les bactéries et leurs enzymes intracellulaires. La seconde méthode, quant à elle, est basée sur l'utilisation d'échantillons de milieu de culture non centrifugés, mais traités avec le détergent Triton X-100 et mixés par l'ultrathurax. L'ajout du détergent et l'utilisation de l'ultrathurax en vue de déstabiliser les membranes cellulaires et ainsi d'engendrer une libération d'enzymes dans le milieu extérieur, ont en effet déjà montré leur efficacité lors de la mise au point du protocole d'obtention des extraits bruts. Cependant, au lieu de confirmer cette hypothèse, les résultats de ces dosages montrent l'absence en quantité décelable de toute activité cellulolytique, intracellulaire ou extracellulaire, dans ce milieu présentant une faible teneur en glucose libre.

Une autre hypothèse est tout simplement que dans ces conditions de culture, *Bacillus niabensis* se développe bien et effectue une cellulolyse sans pour autant produire des quantités significatives d'enzymes extracellulaires. En effet, selon Okeke & Paterson (1992), des microorganismes sont capables de croître sur de la cellulose sans pour autant sécréter des quantités significatives d'enzymes extracellulaires dans le milieu.

5.2 Milieu à base de drèches de blé et de xylane

Pour ce deuxième type de milieu, un second substrat inducteur est utilisé en plus des drèches de blé (20 g/l), le xylane de bouleau (10 g/l). En effet, au cours de leurs travaux, Chia-Wen *et al.* (2009) ont mis en évidence que la production par *Bacillus niabensis* d'enzymes cellulolytiques extracellulaires était induite par ce substrat et que celui-ci pouvait donc être considéré en tant qu'inducteur d'enzymes fibrolytiques extracellulaires.

Le tableau ci-dessous présente les activités enzymatiques induites au sein du milieu. Au moment du dosage des activités cellulolytiques, c'est-à-dire après 72h de culture, le taux de biomasse au sein du milieu de culture était le suivant :

Culture 1 : 6×10^8 souches / ml de culture

Tableau 14 : Activités enzymatiques induites au sein du milieu à base de drèches et de xylane

Endoglucanase (UI/ml)	Exoglucanase (UI/ml)	Cellobiase (UI/ml)	Cellulase brute (UI/ml)	Xylanase (UI/ml)
0,00	0,16	0,00	0,00	4,50

Comme on peut le voir au sein du tableau ci-dessus, seule une activité xylanase est induite au sein de cette culture. Après 72h de culture dans ce milieu composé essentiellement de drèches de blé et complété par du xylane de bouleau, les valeurs des activités cellulolytiques sont en effet toutes nulles ou presque. Ces résultats prouvent que le xylane est bien un inducteur d'une activité xylanase extracellulaire chez *Bacillus niabensis* mais par contre ils ne confirment pas la théorie de

Chia-Wen *et al.* (2009) selon laquelle ce substrat est également inducteur d'une activité cellulolytique extracellulaire chez *Bacillus niabensis*, du moins dans les conditions de milieu utilisées au cours de cette culture.

5.3 Milieu à base de Carboxyméthylcellulose, rapport C/N = 30

Deux sources d'azote différentes ont été testées au cours de cette tentative d'induction, la première composée d'extrait de levure (EXT) et de peptone (PEPT) et la seconde composée uniquement d'urée.

Le milieu de base contenait 32,5 g/l de CMC lorsque l'azote était amené sous forme d'urée et 35 g/l lorsque l'azote était amené sous forme d'extrait de levure et de peptone. Dans les deux cas, son rapport $\frac{\text{carbone}}{\text{azote}}$ était de 30.

Les essais réalisés pour chacune des deux sources ont été répétés deux fois.

Sur la figure ci-dessous, sont représentées les activités enzymatiques induites après 72h de culture dans ces deux types de milieux qui ne se démarquent donc l'un de l'autre que par l'origine de l'azote utilisé. Après ces 72h de culture, les populations bactériennes au sein des différentes cultures étaient les suivantes : 1 (urée) : 6×10^8 ; 2 (urée) : $7,5 \times 10^8$; 3 (pept. + ext. levure) : $6,5 \times 10^8$; 4 (pept. + ext. levure) : 5×10^8 .

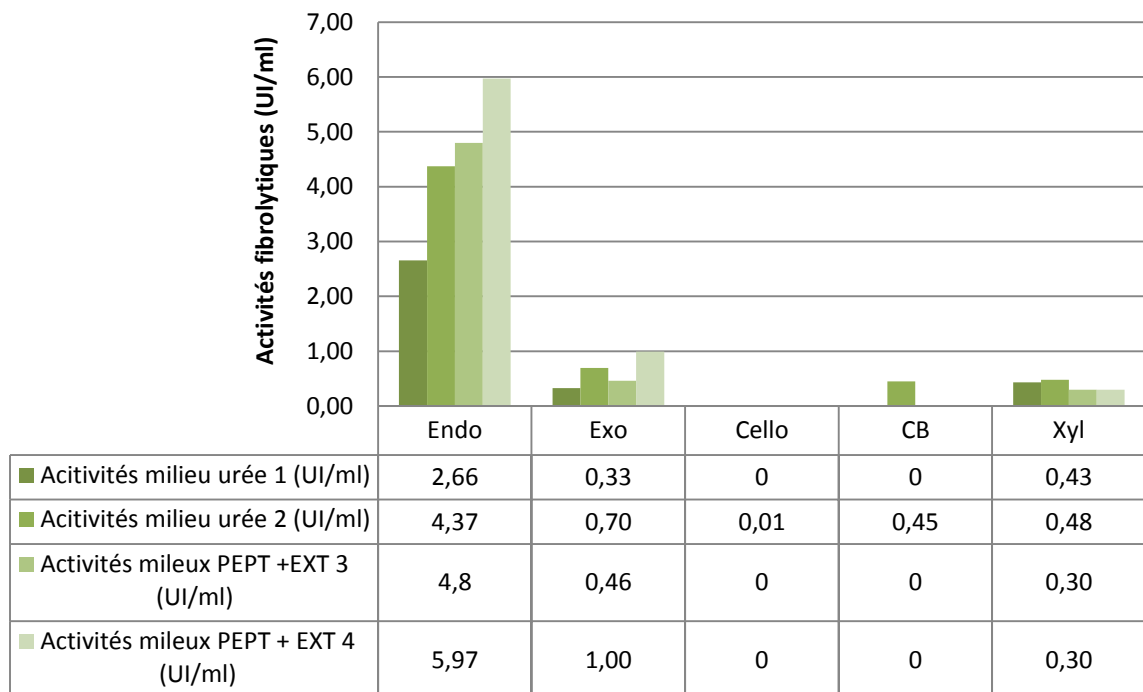


Figure 31 : Activités fibrolytiques induites au sein des milieux caractérisés par un rapport C/N = 30

La Figure 30Figure met en évidence l'induction, après 72h de culture de *Bacillus niabensis* au sein de ces milieux, d'une activité endoglucanase significative. En comparaison à des valeurs

obtenues par Okeke et Paterson (1992) lors de l'induction d'activité cellulolytique et xylanolytique chez *Streptomyces sp.* également à partir de carboxyméthylcellulose (0,64 unité/ml), les valeurs d'activités endoglucanase qui sont obtenues au cours de cette expérience sont très nettement supérieures. De plus, selon les valeurs déterminées au cours de ces dosages, les milieux contenant de l'azote d'origine organique induisent une activité endoglucanase plus élevée que les milieux composés d'azote sous forme uréique.

La carboxyméthylcellulose dans ces conditions de culture notamment caractérisées par le rapport $\frac{\text{carbone}}{\text{azote}} = 30$, semble donc être un bon inducteur d'une activité endoglucanase extracellulaire chez *Bacillus niabensis*.

5.4 Analyse des degrés de polymérisation des produits d'hydrolyse

Afin de mieux comprendre l'action d'hydrolyse de *Bacillus niabensis* sur un substrat cellulosique, les produits de dégradation obtenus suite à l'incubation d'une culture de *Bacillus niabensis* sur du papier Whatman ont été analysés par chromatographie (DIONEX) afin de mettre en évidence les degrés de polymérisation des sucres obtenus. Dans un but identique, cette analyse a été réalisée sur les produits d'hydrolyse de xylane mis en contact avec une culture de *Bacillus niabensis*.

Cependant, les résultats obtenus ne peuvent être exploités. En effet, par manque de temps, il n'a pas été possible de mettre au point une méthode de préparation optimale des échantillons en vue de leur analyse par cette méthode particulière de chromatographie. Un taux de dilution correct des échantillons n'a pu être déterminé.

Chapitre 5 : Discussion générale

A. Validation *in vitro* du potentiel fibrolytique des enzymes ruminales chez la volaille de chair

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet de recherche visant à étudier la possibilité d'utiliser des enzymes fibrolytiques extraites du rumen dans l'alimentation des volailles de manière à valoriser d'avantage des aliments riches en hydrates de carbone de structure, dont la cellulose.

Nous avons donc appliqué différents résultats obtenus précédemment pour réaliser ce TFE, à savoir :

- prélèvements d'échantillons de la phase solide du rumen chez des vaches alimentées avec un régime stable composé de foin et de concentrés protéiques ;
- prélèvements d'échantillons de la phase solide du rumen toujours effectués en période préprandiale ;
- extraction des enzymes fibrolytiques de la fraction solide du rumen dans les conditions développées dans le cadre de la convention DGARNE 1291.

La première étape de notre travail a été la validation *in vitro* du potentiel fibrolytique des enzymes ruminales chez la volaille de chair, tout d'abord via la caractérisation du pouvoir hydrolytique présent au sein des différents extraits bruts ruminiaux réalisés. Ces manipulations ont permis de démontrer la capacité des enzymes fibrolytiques extraites du rumen à hydrolyser des dérivés cellulosiques purifiés. Il ressort également de ces travaux que deux des quatre activités cellulolytiques sont présentes en quantité prédominante : l'activité endoglucanase et l'activité cellobiase.

À la suite de cette vérification du potentiel hydrolytique des enzymes fibrolytiques ruminales *in vitro*, l'aptitude de ces enzymes à hydrolyser la cellulose contenue au sein de coproduits lignocellulosiques industriels a été testée. Une première approche a consisté à déterminer la quantité de sucres produits par hydrolyse dans des conditions physico-chimiques régnant dans l'intestin du poulet de chair (organe où a lieu l'assimilation des monomères), c'est-à-dire : un pH de 3, une température de 40°C et une durée d'une heure qui correspond au temps de rétention du chyme dans cet organe. Les résultats obtenus montrent que jusqu'à 49 % de la cellulose contenue dans des tourteaux de colza peuvent être dégradées durant ce laps de temps. Pour déterminer ces pourcentages de cellulose hydrolysée, les teneurs en cellulose des différents coproduits, obtenues par la méthode de Van de Soest ont été utilisées. Les dosages effectués selon cette méthode indiquent également que la teneur en lignine des différents coproduits est variable (voir Tableau 4). La lignine est l'un des principaux composés des parois végétales au même titre que la cellulose et les principales fonctions de ce constituant sont d'amener rigidité et imperméabilité aux plantes ; ce qui en limite l'accessibilité des enzymes cellulolytiques au substrat. Une forte teneur en lignine du coproduit devrait donc rendre l'hydrolyse de la cellulose de ce même produit par les enzymes du rumen plus difficile.

Cependant, en comparant ces teneurs en lignine et les résultats obtenus au cours des expérimentations, on remarque que les pourcentages de cellulose hydrolysée au sein des coques de soja et du son de blé (coproduits comportant le moins de lignine ; respectivement 2 % et 3 % contre 9 % chez les autres coproduits), ne sont pas supérieurs aux pourcentages de cellulolyse déterminés pour les autres coproduits. Cette teneur en lignine ne semble donc pas être un frein à la digestion des substrats.

Ensuite, nous avons étudié la résistance des enzymes ruminales aux conditions dénaturantes et agents protéolytiques rencontrés tout au long du système digestif des poulets de chair. Les résultats montrent que la principale cause de diminution des activités cellulolytiques (spécifiquement endoglucanase et surtout cellobiase) est le pH acide de l'estomac. En effet, la chute engendrée par ce facteur seul est proche de la chute engendrée par la combinaison pepsine – pH 3, la protéolyse due à la pepsine est donc mineure. En ce qui concerne l'activité cellulase brute, une chute est également observée mais celle-ci est faible et moins rapide. Tout comme pour les deux autres activités, la pepsine ne semble jouer qu'un rôle mineur dans cette diminution d'activité.

Les enzymes ingérées par l'animal rencontrent ensuite dans l'intestin grêle un nouvel environnement caractérisé par la présence d'une autre enzyme protéolytique, la pancréatine. Nos résultats montrent que la pancréatine ne semble pas être un frein à l'incorporation des enzymes ruminales dans l'alimentation des volailles car elle engendre une très faible perte d'activités. Suite à ces différentes expérimentations, on voit donc que le principal obstacle à l'action des enzymes cellulolytiques au sein du système digestif des poulets est le passage par un environnement très acide au niveau de l'estomac. Une acidité élevée provoque des perturbations au niveau des diverses interactions ioniques et des liaisons impliquées dans le maintien de la protéine sous une forme stable. Suite à ce déséquilibre, la structure tertiaire (structure tridimensionnelle dans l'espace) des protéines est modifiée, ce qui engendre une perte de leur activité. À noter que lorsque l'altération des enzymes est modérée, la dénaturation des protéines est réversible, la protéine retrouvant sa forme de départ suite à la suppression de l'agent dénaturant. Avec ce retour à sa forme initiale, l'enzyme retrouve également ses propriétés biologiques.

L'action de la pepsine, de la pancréatine et des autres protéases est totalement différente de cette réaction de dénaturation engendrée par le pH acide. En effet, alors que la dénaturation n'implique qu'une modification de l'organisation tridimensionnelle des protéines, les enzymes protéolytiques dégradent les enzymes en brisant des liaisons peptidiques au sein de ces dernières. La pepsine hydrolyse les liaisons peptidiques où une fonction amine d'un acide aminé aromatique comme la tyrosine, la tryptophane ou encore la phénylalanine est engagée. La pancréatine, quant à elle, correspond à un extrait de pancréas, elle contient des enzymes digestives de différents types sécrétées par cette glande. Parmi ces enzymes, on retrouve donc notamment des enzymes protéolytiques mais également des estérases (lipase), de l'amylase. Son spectre d'action est certainement plus large. Cette rupture de liaison est bien entendu irréversible et l'enzyme ne peut donc retrouver ses propriétés initiales.

Les enzymes cellulolytiques ruminales d'origines bactériennes (excepté *Fibrobacter*) s'associent pour former une structure en complexe enzymatique nommé cellulosome. Cette structure en complexe pourrait expliquer la résistance de ces enzymes ruminales à la protéolyse.

Après l'étude de l'effet de chacun des facteurs protéolytiques rencontrés dans les différents organes du système digestif des volailles de manière indépendante, une simulation de la succession de ces conditions, comme c'est le cas au cours d'une digestion complète des coproduits chez le poulet, a été réalisée. Grâce aux résultats obtenus au cours de la simulation de la digestion et de l'hydrolyse simple, la perte de digestibilité induite par ces conditions défavorables a pu être estimée en se basant sur les pourcentages de cellulose hydrolysée et les quantités de glucose libérées dans le milieu.

La comparaison des résultats obtenus pour la simple hydrolyse, d'une durée équivalente à la durée totale de la digestion, et la simulation de la digestion, montre que contrairement à ce qui pouvait être attendu au vu des renseignements obtenus précédemment, la perte de digestibilité n'est pas énorme. En effet, alors que les pertes imputées aux activités majoritaires de l'extrait brut (endoglucanase et cellobiase) suite aux conditions néfastes pour les protéines rencontrées dans l'estomac sont proches des 100 %, les diminutions de glucose libéré respectivement pour le son de blé, les tourteaux d'extraction au solvant, les tourteaux d'extraction par pression, les drèches de blé et enfin des coques de soja ne sont que de 37 %, 1 %, 18 %, 43 % et 21 %. Ces résultats en opposition pourraient être dus au fait que le pH de 3 touchant les enzymes durant 45 min n'impliquent pas une dénaturation irréversible de toutes ces protéines ; une part de ces enzymes retrouvant donc leur forme initiale et tout leur potentiel cellulolytique lorsque ces conditions acides sont franchies.

Même si ces pertes d'activités sont moins catastrophiques que ce à quoi on pouvait s'attendre, il est nécessaire de trouver une solution à ce problème. Ces chutes d'activités pourraient par exemple être compensées par l'augmentation du rapport $\frac{\text{enzymes}}{\text{substrats}}$ au sein de la ration alimentaire ou par un conditionnement permettant la résistance au pH acide aux enzymes. C'est en vue de cette demande plus importante en enzymes qu'il est impératif de mettre au point un modèle de production *ex-vivo* de ces molécules. C'est ce qui constitue la seconde partie de notre travail.

B. Mise au point d'un modèle de production d'enzymes ex vivo

La deuxième partie de ce travail a consisté à étudier un modèle de production des enzymes *ex vivo* à partir de microorganismes du rumen.

Parmi les microorganismes du rumen, une souche bactérienne s'est avérée cellulolytique sur milieu gélosé spécifique. En vue de faciliter la mise au point du modèle *ex vivo*, il a été décidé de travailler avec cette seule souche plutôt qu'avec le consortium bactérien. Cette souche après identification s'est avérée appartenir à l'espèce *Bacillus niabensis*.

Bacillus niabensis est une bactérie récemment identifiée (2007) et isolée à partir de produits lignocellulosiques tels les pailles de riz et le compost de coton, cette souche est capable de croître en aérobie. Une approche morphologique de la souche a tout d'abord été réalisée. L'analyse microbiologique de cette bactérie Gram + mobile a permis d'identifier la présence de particules réfringentes semblables à des spores situées à l'extrémité de la structure en chaînette. Soon-Wo *et al.* (2007) ont démontré dans leur publication que ce bacille était capable de former des spores de forme ellipsoïdale ou ovale apparaissant en position terminale ou subterminale.

Afin de vérifier l'aptitude à sporuler des *Bacillus niabensis*, nous avons fait une culture en milieu liquide et soumis les cellules produites à 80° durant 10 minutes. Dans cette culture, s'il y avait des spores, elles représenteraient moins d'une cellule sur mille.

Selon Soon-Wo *et al.* (2007) l'intervalle de température dans lequel cette souche est capable de se développer est compris entre 15 et 50°, avec cette température optimale de croissance équivalente à 30°C. Le pH, quant à lui, doit être compris entre les valeurs de 6,0 et 8,0 et pour atteindre un maximum de croissance, il faut que celui-ci soit de 7,0. Ces valeurs de température et de pH sont similaires à celles rencontrées dans l'intestin des poulets de chair. Les enzymes associées à ce microorganisme rencontreront donc les conditions adéquates pour exprimer leurs activités fibrolytiques.

Après cette caractérisation préliminaire, *Bacillus niabensis* a été mis en croissance sur un milieu spécifique et couramment utilisé au laboratoire de l'Unité de bio-industries pour la croissance des bacilles. Ce milieu pour la production de biomasse a été testé dans les conditions optimales de croissance de la souche (pH équivalent à 6,5 et température de 30°C). La biomasse atteinte dans ces conditions est de 3.10^9 CFU/ml en 28 heures.

La croissance de *Bacillus niabensis* a ensuite été testée sur le même milieu que celui utilisé précédemment mais en remplaçant la majorité de la source de carbone directement assimilable par de la cellulose synthétique (cellulose soluble facilement hydrolysable par des microorganismes cellulolytiques). La biomasse atteinte est très proche de celle obtenue sur le milieu glucosé (2.10^9 CFU/ml). Le dosage des activités enzymatiques associées aux enzymes libres (dosage dans le surnageant de culture) montrent des activités faibles. Selon ces résultats, les enzymes cellulolytiques associées à cette bactérie ne seraient pas extracellulaires ; ce qui est compatible avec le fait que cette bactérie a été isolée et extraite à partir du contenu ruminal solide.

Pour vérifier cette hypothèse, trois types de milieux inducteurs ont été testés. L'objectif de ces milieux était de favoriser la libération des enzymes fibrolytiques et donc d'induire leurs activités enzymatiques.

Selon Chia-Wen *et al.*, (2009), la production de cellulases extracellulaires par *Bacillus niabensis* nécessite l'action inductrice de xylane seul ou l'action combinée de xylane et de cellulose. C'est pourquoi, nous avons testé la production d'enzymes en présence de coproduits industriels, contenant ces deux composés, seuls ou enrichis en xylane de bouleau.

Malgré une bonne production de biomasse (10^9 CFU/ml), nous n'avons pas obtenu d'activités fibrolytiques importantes.

Le dernier milieu utilisé s'est par contre révélé être beaucoup plus efficace en terme de production d'activités cellulolytiques extracellulaires. La composition en azote de ce milieu a été diminuée et celle en carbone de type cellulose (cellulose purifiée facilement utilisable : carboxyméthylcellulose) augmentée de manière à atteindre un rapport $\frac{\text{carbone}}{\text{azote}}$ compris entre 25 et 30. Deux sources d'azote différentes (urée et peptone associée à l'extrait de levure) ont été testées dans ces conditions de milieu. L'activité cellulolytique obtenue est comparable à celle de l'extrait brut. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que la biomasse associée à cette forte activité est relativement faible (de l'ordre de 10^8 CFU/ml). La faible concentration en *Bacillus* dans ces milieux se justifie par le fait que ces derniers ne sont pas appropriés à la production de biomasse mais bien à la cellulolyse. Ces résultats démontrent que certaines enzymes associées à *Bacillus niabensis* seraient sécrétées dans le milieu et inductibles en fonction de la composition de celui-ci.

Chapitre 6 : Conclusion et perspectives

1 Conclusion

Ce travail a donc été réalisé en deux étapes. La première étape a bien montré l'efficacité des enzymes fibrolytiques ruminales *in vitro* sur les coproduits lignocellulosiques industriels. Elle a également mis en évidence l'effet *in vitro* des agents dénaturants et protéolytiques potentiels du système digestif du poulet : un pH stomacal acide (égal à 3), la pepsine et la pancréatine (enzymes protéolytiques respectivement rencontrées dans l'estomac et dans l'intestin des poulets). Le pH acide s'est avéré le plus dénaturant mais les essais réalisés en mode digestion complète ont montré des effets moins dénaturants.

La seconde partie s'est intéressée à l'isolation et à la production d'une bactérie cellulolytique du rumen, *Bacillus niabensis*. Cette bactérie, découverte récemment (2007), est aérobie facultative et ne montre pas d'activité antagoniste de moisissures.

Du point de vue de la production de biomasse, les essais menés sur milieux riches en fioles ont permis d'atteindre une population bactérienne de l'ordre de 10^9 CFU/ml en seulement 24h et ont également mis en évidence des cinétiques de croissance intéressante.

Elle s'est également révélée capable de produire des enzymes fibrolytiques extracellulaires après induction. Les activités suivantes ont pu être atteintes suite à l'utilisation de différents milieux inducteurs.

- Activité endoglucanase maximale : 5,97 UI/ml
- Activité exoglucanase maximale : 1,00 UI/ml
- Activité cellulase brute maximale : 0,45 UI/ml
- Activité xylanase : 4,50 UI/ml

À noter que les activités cellulolytiques ci-dessus sont comparables à celles obtenues au sein des extraits bruts ruminiaux.

2 Perspectives

- 1) Tenant compte des effets dénaturants du pH, une protection des enzymes pourrait être envisagée afin d'augmenter le taux de cellulolyse. La microencapsulation pourrait être une solution.
- 2) La bactérie cellulolytique *Bacillus niabensis* isolée du rumen a été partiellement caractérisée. Le caractère sporulant de celle-ci n'a pas pu être démontré au cours de cette caractérisation. Ce paramètre mérite des investigations supplémentaires, notamment au sujet des milieux de culture et des stress environnementaux pouvant induire cette sporulation. La cytométrie en flux permettrait également de mieux caractériser les populations bactériennes.

- 3) L'essai de production d'enzymes en milieu C/N = 30 a montré des résultats à approfondir ; notamment en essayant de maximiser les activités par le choix des types et des quantités du substrat inducteur ou encore de la source d'azote, mais également en tentant de caractériser les activités fibrolytiques produites par étude chromatographique des produits d'hydrolyse.
- 4) La caractérisation des enzymes fibrolytiques par la mesure des degrés de polymérisation des produits d'hydrolyse devrait également être approfondie.
- 5) Enfin, *Bacillus niabensis* est connue pour sa résistance au sel et aptitude à dégrader des polluants. Ces aspects n'ont pas été abordés au cours de notre étude mais ils méritent notre attention

Chapitre 7 : Références bibliographiques

Akin, D. E. (1989). Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal*, 81, pp. 17-23.

Bayer, E. A., & Lamed, R. (2006). The Cellulosome Saga : Early History. Dans V. Uversky, & I. A. Kotaeva, *Cellulosome* (pp. 11-46). Nova Science Publishers Inc.

Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R., & Shoham, Y. (1998). Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Current Opinion in Structural Biology*, 8, pp. 548-557.

Beauchemin, K. A., Colombatto, D., Morgavi, D. P., Yang, W. Z., & Rode, L. M. (2003). Mode of action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. *Canadian Journal Animal Science*, 84, pp. 13-22.

Beckers, Y., & Piron, F. (2009). Utilisation des enzymes exogènes en alimentation porcine et avicole. *9ème Journée Productions porcines et avicoles*, pp. 45-53.

Carré, B. (2000). Effets de la taille des particules alimentaires sur les processus digestifs chez les oiseaux d'élevage. *INRA Production animale*, 13, pp. 131-136.

Champ, M. (1985). Digestion des glucides chez le monogastrique. *Reproduction Nutrition Development*, 25 (4 B), pp. 819-842.

Chari, N., & Shunmugiah Karutha, P. (2010). Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiological Research*, 165, pp. 578-593.

Chia-Wen, H., Chia-Chun, L., Jhong-Jie, C., & Kuan-Lun, H. (2009). Degradation of Rice Straw by *Bacillus niabensis* HCYU-B2 Hemicellulases and Contribution of Scaffolding Protein. *SIM Annual Meeting and Exhibition - Industrial Microbiology and Biotechnology*. Toronto.

Cowieson, A. J., & Adeola, O. (2005). Carbohydrases, protease and phytase have an additive beneficial effect in nutritionally marginal diets for broiler chicken. *Poultry Science*, 84, pp. 1860-1867.

Craig, W. M., Broderick, G. A., & Ricker, D. B. (1987). Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *Journal of nutrition*, pp. 56-64.

Craig, W. M., Brown, D. R., Broderick, G. A., & Ricker, D. B. (1987). Post-prandial compositional changes of fluid and particle associated ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, 65, pp. 1042-1048.

Didderen, I., Destain, J., & Thonart, P. (2008). *Le bioéthanol de seconde génération - La production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique*. Gembloux: Les presses agronomiques de Gembloux.

Emiola, I. A., Opapeju, F. O., Slominski, B. A., & Nyachoti, C. M. (2009). Growth performance and nutrient digestibility in pigs fed wheat DDGS based diets supplemented with a multicarbohydrase enzyme. *Journal of animal science*, 87, pp.2315-2322.

Fontes, C. M., & Gilbert, H. J. (2010). Cellulosomes : Highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual Review of Biochemistry* , pp. 655-681.

Fonty, G., Jouany, J.-P., Forano, E., & Gouet, P. (1995). L'écosystème microbien du réticulo-rumen. Dans R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, & M. Journet, *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion* (pp. 297-347). Paris: INRA Editions.

Gabriel, I., Mallet, S., & Sibille, P. (2005). La microflore digestive des volailles : facteurs de variation et conséquences pour l'animal. *INRA Production Animale* 18 (5) , pp. 309-322.

Gadoud, R., Joseph, M.-M., Jussiau, R., Lisberney, M.-J., Mangeol, B., Montmeas, L., et al. (1992). *Nutrition et alimentation des animaux d'élevage (Volume 1)*. Paris: Les éditions Foucher.

Hong, & al., e. (2002). Addition of enzyme to starter and grower diets for ducks. *Poultry Science* , 81, pp. 1842-1849.

Hornick, J.-L., Akoutey, A., & Istasse, L. (2003). *Nutrition animale et bromatologie tropicale : Nutrition spéciale des monogastriques*. Faculté de Médecine Vétérinaire, ULg.

Jarrige, R., Grenet, E., Demarquilly, C., & Besle, J.-M. (1995). Les Constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. Dans R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, & M. Journet, *Nutrition des ruminants domestique:, ingestion et digestion* (pp. 25-81). Paris: INRA éditions.

Jouany, J.-P., Broudiscou, L., Prins, R., & Komisarczuk-Bony, S. (1995). Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. Dans R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, F. M.-H., & M. Journet, *Nutrition des ruminants domestiques : ingestion et digestion* (pp. 349-381). Paris: INRA éditions.

Kaufman, W., Hagemester, H., & Durksen, G. (1980). Adaptation to changes in dietary composition level and frequency of feeding. Dans Y. Ruckebusch, & P. Thivend, *Digestive physiology and Metabolism in Ruminants* (p. 587).

KeShun, L. (1999). *Soybeans: chemistry, technology and utilization* . Aspen Publishers, Inc. .

Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T., et al. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen : microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* , pp. 663-693.

Larbier, M., & Leclercq, B. (1992). *Nutrition et alimentation des volailles*. INRA éditions.

Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002, Septembre). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , pp. 506-577.

Martin, C., Millet, L., Fonty, G., & Michalet-Doreau, B. (2001). Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reproduction Nutrition Development* , 41, pp. 413-424.

Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L., & Fonty, G. (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development* , 41, pp. 187-194.

Miron, J., Ben-Ghedalia, D., & Morrison, M. (2001). Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria. *Journal of Dairy Science* , 84 (6), pp. 1294-1306.

Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Yokoyama, M. T., & Lamed, R. (1990). Some aspects of cellobiose effect on cell surface structures involved in lucerne cell walls utilization by fresh isolates of rumen bacteria. *Animal feed science and technology* , 30, pp. 107-120.

Miron, J., Yokoyama, M., & Lamed, R. (1989). Bacterial cell surface structures involved in lucerne cell wall degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 32, pp. 218-222.

Morrison, M., & Miron, J. (2000). Adhesion to cellulose by Ruminococcus albus: a combination of cellulosomes and Pil-proteins? *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS* , 185, pp. 109-115.

Nsereko, V. L., Morgavi, D. P., Rode, L. M., Beauchemin, K. A., & McAllister, T. A. (2000). Effects of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. *Animal Feed Science and Technology* , pp. 153-170.

Okeke, B., & Paterson, A. (1992). Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in a Streptomyces sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 8, pp. 483-487.

Pell, A. N., & Schofield, P. (1993). Microbial adhesion and degradation of plant cell walls. Dans R. D. Hatfield, H. G. Jung, J. Ralph, D. R. Buxton, D. R. Mertens, & P. J. Weimer, *Forage Cell Wall Structure and Digestibility* (pp. 397-423). Madison, WI: eds. ASA-CSSA-SSSA.

Rémond, B., Brugère, H., Poncet, C., & Baumont, R. (1995). Le contenu du réticulo-rumen. Dans R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M.-H. Farce, & M. Journet, *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion* (pp. 253-298). Paris: INRA editions.

Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bondy, S., & Gouet, P. (1990, Octobre). Effects of physiochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria Ruminococcus flavefaciens and Fibrobacter succinogenes. *Applied and Environmental Microbiology* , 56, pp. 3081-3087.

Sariyska, M., Gargova, S., Koleva, L., & Angelov, A. (2005). Aspergillus niger phytase : purification and characterization. *Biotechnology & Biotechnology Equipment* , pp. 98-105.

Schroeder, J. W. (2010). *Distillers Grains Protein energy supplement for Dairy Cattle*. Fargo, ND 58108: North Dakota State University Extension Service.

Soon-Wo, K., Seon-Young, L., Byung-Yong, k., Hang-Yeon, W., Jung-Bong, K., Seung-Joo, G., et al. (2007). *Bacillus niabensis* sp. nov., isolated from cotton-waste composts for mushroom cultivation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 57, pp. 1909-1913.

Tervilä-Wilo, A., Parkkonen, T., Morgan, A., Hopekoski-Nurminen, M., Poutanen, K., Heikkinen, P., et al. (1996). In vitro Digestion of Wheat Microstructure with Xylanase and Cellulase from *Trichoderma reesei*. *Journal of Cereal Science* , 24, pp. 215-225.

Thorburn, C. C., & Willcox, J. S. (1965). The caeca of the domestic fowl and digestion of the crude fibre complex. Digestibility trials with normal and caecectomised birds. *British Poultry Science* (6), pp. 23-31.

Van der Klis, J.D. (1993). Physico-chemical chyme conditions and mineral absorption in broilers. *PhD thesis*. Agricultural University Wageningen, The Netherlands.

Weimer, P. J. (1996). Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster? *Journal of Dairy Science* , 79, pp. 1496-1502.