



HAL
open science

ETUDE DE LA DIVERSITE ET DES PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DE BACTERIES ACIDIFIANTES ORIGINAIRES DU BURKINA FASO

Ali Bayane

► **To cite this version:**

Ali Bayane. ETUDE DE LA DIVERSITE ET DES PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DE BACTERIES ACIDIFIANTES ORIGINAIRES DU BURKINA FASO. Sciences du Vivant [q-bio]. UNIVERSITÉ DE LIÈGE, GEMBLOUX AGRO-BIO TECH, GEMBLOUX, BELGIQUE, 2005. Français. NNT: . tel-02568346

HAL Id: tel-02568346

<https://theses.hal.science/tel-02568346>

Submitted on 11 May 2020

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

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

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE

**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES
AGRONOMIQUES DE GEMBOUX**

**ETUDE DE LA DIVERSITE ET DES PROPRIETES
TECHNOLOGIQUES DE BACTERIES ACIDIFIANTES
ORIGINAIRES DU BURKINA FASO**

Ali BAYANE

Dissertation originale présentée
en vue de l'obtention du grade de docteur en
sciences agronomiques et ingénierie biologique.

Promoteur: **Pr. Philippe THONART**

5 septembre 2005

Directeur de thèse : Professeur Philippe Thonart

BAYANE Ali (2005). Etude de la diversité et des propriétés technologiques de bactéries acidifiantes originaires du Burkina Faso. (Thèse de Doctorat). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique., 191 p., 39 tabl., 43 fig.

Résumé : L'intérêt des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* dans les formulations industrielles réside à la fois dans leurs propriétés fonctionnelles et dans leur capacité à former des endospores. Cette dernière propriété leur permet de supporter plusieurs types de stress environnementaux sans perdre les propriétés fonctionnelles recherchées. Ce travail est une contribution à l'étude de la diversité de ces bactéries sporulantes capable d'accumuler de l'acide lactique. A partir de trois échantillons prélevés dans les fermes du Burkina Faso, dix-sept (17) nouvelles bactéries acidifiantes ont été isolées. Six de ces isolats ont été caractérisés et identifiés par une approche combinant des critères phénotypiques et génétiques. Les analyses ont montré que ces nouvelles bactéries sont toutes différentes des bactéries acidifiantes et sporulantes connues. Elles produisent de l'acide L (+) lactique de manière homo-fermentaire. Plusieurs propriétés technologiques intéressantes ont été observées chez ces bactéries, pouvant favoriser leur utilisation comme probiotiques. Il s'agit notamment de leur résistance aux conditions physicochimiques du tractus digestif (acidité et sels biliaries), de leur profil fermentaire et de leur production d'enzymes intéressantes (amylases, protéases). La production de biomasse sous forme de spores a été étudiée chez ces bactéries en prenant *Bacillus coagulans* LMG 6326 comme modèle. Cette étude de la sporulation a confirmé les observations antérieures concernant la difficulté pour les bactéries acidifiantes de sporuler dans les cultures liquides. Les travaux réalisés dans le but d'optimiser la sporulation ont montré que les cultures immobilisées sont mieux adaptées à la production de spores. Un schéma de production de spores a ainsi été décrit pour *Bacillus coagulans* sur billes d'alginate permettant d'obtenir un rendement de sporulation de 80% environ, alors qu'il n'est que de 1% en culture liquide. L'accumulation de facteurs de sporulation dans le milieu extracellulaire a été identifiée comme mécanisme intervenant dans l'optimisation de la sporulation dans les cultures immobilisées. Ce mécanisme fait référence au phénomène de "quorum sensing" observé dans la sporulation de *Bacillus subtilis* et de *Clostridium perfringens*.

BAYANE Ali (2005). Study of the diversity and the technological properties of acidifying bacteria originating from Burkina Faso. (PhD thesis in French). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgium., 191 p., 39 tabl., 43 fig.

Abstract: The interest of acidifying bacteria from the genus *Bacillus* in industrial formulations stems from their functional properties and from their ability to form endospores. This last property enables them to resist to several types of environmental stresses without losing the required functional properties. This work is a contribution to the study of the diversity of these spore forming bacteria able to accumulate lactic acid. From three samples taken in the farms of Burkina Faso seventeen (17) new acidifying bacteria were isolated. Six of these isolates were characterized and identified by an approach combining phenotypical and genetic properties. The analyses showed that all of these new bacteria are different from the known acidifying spores forming bacteria. They produced L (+) lactic acid in homo-fermentive way. Several technological properties were observed in these bacteria, which can favour their use as probiotic. In particular their resistance to physical-chemical conditions of the digestive tract (bile salts and acidity), their fermentative profiles and the production of interesting enzymes (amylases, proteases). The production of biomass in the form of spores was studied with these bacteria taking *Bacillus coagulans* LMG 6326 as a model. This study confirmed the difficulty for spore forming acidifying bacteria to sporulate in liquid media. The work carried out for optimizing the sporulation showed that the immobilized cultures can favour sporulation. A process for spore production was thus described for *Bacillus coagulans* on alginate beads. Thus, it is possible to obtain a yield of approximately 80% of sporulation with this procedure whereas a maximum yield of only 1% can be achieved in liquid media. The accumulation of sporulation factors in the extracellular medium was identified as a key mechanism responsible for sporulation in the immobilized cultures. This mechanism refers to the "quorum sensing" phenomenon observed in the sporulation of *Bacillus subtilis* and *Clostridium perfringens*.

© *Aux termes de la loi belge du 22 mars 1886, sur le droit d'auteur, seul l'auteur a le droit de reproduire cet ouvrage ou d'en autoriser la reproduction de quelque manière et sous quelque forme que se soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la loi.*

à papa **Dan Michel BAYANE** (1936-2004), je
sais que tu aurais été très heureux d'apprendre
l'aboutissement de mes travaux de doctorat, je
suis particulièrement soulagé à l'idée du visage
que tu aurais montré à l'annonce de cette
nouvelle

à maman **Kayo Disso**, j'espère que ce travail te
donnera le courage de continuer le combat pour
tes enfants. Trouve ici un témoignage de
l'immense amour que nous te portons

REMERCIEMENTS

Cette thèse de doctorat a été réalisée dans le cadre d'une coopération entre le Centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI), unité de bio-industries, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique) et le Département de Technologie Alimentaire (DTA/IRSAT) du Centre National de Recherche Scientifique et Technologique (CNRST) du Burkina Faso.

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma profonde gratitude à toutes les personnes, professeurs, parents et amis qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Ma gratitude s'adresse en premier lieu au *Pr. Philippe THONART*, promoteur de ce travail, pour les précieux conseils et soutiens qu'il m'a prodigué durant mon séjour dans son unité de recherche et pour la formation scientifique et humaine que j'ai pu acquérir jour après jour à travers les nombreux entretiens que j'ai eu la chance de partager avec lui.

Ma gratitude s'adresse en second lieu au *Dr. Bréhima DIAWARA*, responsable scientifique du DTA/IRSAT/CNRST (Burkina Faso) dont je garde un excellent souvenir de mes premiers pas dans la recherche. Je le remercie également pour la compréhension qu'il a eue en venant chaque fois que de besoin à mon secours afin que ce travail soit réalisé.

J'exprime ma reconnaissance envers les membres de la commission d'évaluation et du jury de thèse : *Pr. André THEWIS (recteur)*, *Pr. Daniel PORTETELLE*, *Pr. Marc CULOT*, *Pr. Michel PAQUOT* et *Dr. Jacqueline DESTAIN*, tous de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, pour leurs disponibilités et leurs judicieuses remarques à l'heure de la rédaction et le grand intérêt qu'ils ont accordé à ce travail malgré leurs multiples occupations.

C'est avec un immense plaisir que je remercie *Mme Dominique ROBLAIN* qui n'a cessé de m'aider durant toutes ces années consacrées à la réalisation de la thèse.

Je remercie chaleureusement tout le personnel administratif, scientifique et technique du CWBI, en particulier *Marina Chanet*, *Marguerite Demi*, *Micheline Grégoire*, *Robin Dubois Dauphin*, *Patrice Antoine*, *Jean Louis Arpigny* et *Samuel Telek* pour leurs aides, leur amitié et pour toutes ces années formidables et inoubliables passées ensemble et dont je garderai toujours un excellent souvenir.

Ce travail de thèse a été subsidié par le *Commissariat Général des Relations Internationales de la Communauté française de Belgique (CGRI)* que je souhaite remercier ici en mon nom et au nom des autorités Burkinabé.

Mes remerciements s'adressent également aux responsables administratifs et scientifiques du *CNRST* (Burkina Faso) et à *Mr Prosper NTEMA*, qui ont compris la nécessité de renforcer le partenariat établi entre le CWBI et le DTA/CNRST pour améliorer le niveau de valorisation de la recherche au Burkina Faso.

Je ne laisserais passer l'occasion de remercier *Jean François Collignon* et *Luc Van Humskerken* pour leur contribution à la réalisation de ce travail lors de leurs stages de fin d'études d'ingénieur à l'Unité de Bio-industries.

Je remercie chaleureusement tous mes compagnons avec lesquels j'ai passé des journées entières au labo, week-end compris (la précision est importante): *Maimouna, Antoine C, Johnny, Mireille, Manel, Patience, Laurencia, Ibrahim, Bassirou, Hakim, Privat, Pascal, Michel D, Antoine A, Sana, Benoit, Lamia, Ana, Carine, Dalie, Michel M* et *Roland* pour leur franche camaraderie. Comme nous nous amusons à le dire : « le métier est dur mais passionnant », courage et plein succès à tous.

Je ne laisserais non plus passer cette formidable occasion qui m'est offerte pour remercier mes amis et compagnons résidant au Burkina Faso ainsi que les communautés estudiantines que j'ai rencontré durant mon séjour en Belgique, je remercie plus particulièrement mon cher ami *Alec (Mister Agbok)*, mes compatriotes Burkinabé du *CEGL*, la communauté ivoirienne de Gembloux à travers l'*ASETIB* et la famille *Naré* à Namur.

Enfin je n'oublierai de témoigner ma reconnaissance à *Claudine* ainsi qu'à mes *frères* et *sœurs* car ce travail n'aurait pas vu le jour sans leur soutien et leur présence effective durant ces années consacrées au Doctorat. Qu'ils sachent que ce travail est aussi le leur !!

Que toutes les personnes que j'aurais oublié de citer trouvent dans ce dernier paragraphe ma sincère reconnaissance et mes remerciements.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE-----	1
----------------------------	---

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE
--

AVANT - PROPOS-----	3
---------------------	---

<u>CHAPITRE 1. L'IMPORTANCE DES FERMENTS LACTIQUES DANS LES BIO-INDUSTRIES -----</u>	4
--	---

1.1. Introduction -----	4
1.2. Les fermentations lactiques-----	4
1.2.1. Les fermentations homolactiques-----	5
1.2.2. Les fermentations hétérolactiques-----	5
1.2.3. Intérêt de l'acide lactique d'origine microbienne -----	6
1.3. Propriétés technologiques recherchées chez les ferments lactiques -----	7
1.3.1. Production de CO ₂ et de composés aromatiques -----	7
1.3.2. Production de substances inhibitrices -----	8
1.3.3. Intérêt des ferments lactiques dans le maintien de la santé -----	12

<u>CHAPITRE 2. LES BACTERIES SPORULANTES PRODUCTRICES D'ACIDE LACTIQUE -----</u>	14
--	----

2.1. Introduction -----	14
2.2. Les bactéries acidifiantes appartenant au genre <i>Bacillus</i> -----	14
2.2.1. Quelques généralités sur le genre <i>Bacillus</i> -----	14
2.2.2. Les bactéries acidifiantes du genre <i>Bacillus</i> -----	17
2.3. Les bactéries acidifiantes appartenant au genre <i>Sporolactobacillus</i> -----	19
2.4. Les propriétés technologiques des bactéries acidifiantes-----	21
2.4.1. Rôle dans la production industrielle d'acide lactique -----	21
2.4.2. Rôle dans la production de bactériocine -----	23
2.4.3. Rôle dans les formulations probiotiques -----	23

<u>CHAPITRE 3. LES PRINCIPES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES BACTERIES ACIDIFIANTES -----</u>	24
---	----

3.1. Introduction -----	24
3.2. Critères de sélection d'un ferment acidifiant-----	24
3.2.1. La production de biomasse pour ensemercer -----	24
3.2.2. La tolérance aux procédés industriels -----	25
3.2.3. Matériaux couramment utilisés pour la recherche de bactéries acidifiantes ----	25
3.2.4. Milieux de culture favorables à l'isolement des bactéries acidifiantes-----	26
3.3. La classification d'une nouvelle bactérie -----	26
3.3.1. Introduction -----	26
3.3.2. Pourquoi une approche polyphasique dans les travaux d'identification ? -----	27
3.3.3. Les outils de la taxonomie polyphasique -----	28

<u>CHAPITRE 4. LA SPORULATION CHEZ LES BACTERIES DU GENRE <i>BACILLUS</i> --</u>	33
--	----

4.1. Introduction	33
4.2. Les événements majeurs de la sporulation des <i>Bacillus</i>	35
4.2.1. L'initiation de la sporulation	35
4.2.2. Les événements morphologiques, biochimiques et génétiques de la sporulation	37
4.3. Les signaux extracellulaires de la sporulation	40
4.3.1. Introduction	40
4.3.2. Bref historique de la découverte du <i>quorum sensing</i>	41
4.3.3. Le <i>quorum sensing</i> dans la sporulation	44
CHAPITRE 5. LA TECHNOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISEES DANS LES PRODUCTIONS MICROBIENNES.....	52
5.1. Introduction	52
5.2. Les techniques d'immobilisation des cellules bactériennes	52
5.3. L'immobilisation cellulaire par inclusion dans les billes d'alginate	55
5.3.1. Origine et structure des alginates.....	55
5.3.2. Le principe de la gélification des alginates	55
5.3.2. Fabrication de billes d'alginate pour l'immobilisation de bactéries	56
5.3.3. Avantages des billes d'alginate pour l'immobilisation des cellules	57
5.4. Technique de suivi des cultures immobilisées	58
5.5. Effets de l'immobilisation sur la physiologie et la morphologie des cellules.....	59
OBJECTIFS ET STRATEGIE DE LA RECHERCHE.....	60
DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES	
CHAPITRE 6. ISOLEMENT ET SELECTION DE BACTERIES ACIDIFIANTES ET SPORULANTES.....	62
6.1. Echantillonnage	62
6.2. Conditions d'enrichissement et d'isolement	62
6.2.1. Milieu de culture pour l'enrichissement et l'isolement	62
6.2.2. Technique d'isolement.....	62
6.3. Conditions de sélection	63
6.4. Technique de conservation des isolats	63
CHAPITRE 7. CONDITIONS DE CROISSANCE ET PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DES ISOLATS	64
7.1. Milieux et techniques de suivi des cultures	64
7.1.1. Milieux de culture	64
7.1.2. Solution physiologique utilisée pour les dilutions	64
7.1.3. Evaluation de la biomasse par dénombrement	64
7.1.4. Evaluation de la biomasse par la densité optique des cultures	64
7.2. Détermination de la température optimale de croissance.....	65
7.3. Détermination du pH optimal de croissance.....	65
7.4. Détermination de l'effet du chlorure de sodium sur la croissance	65
7.5. Détermination des paramètres cinétiques de croissance	65

7.6. Détermination des types fermentaires	66
7.7. Profil de production d'acide lactique	66
7.8. Détermination de la tolérance aux sels biliaires	68
7.9. Détermination de la tolérance aux pH acides	68
7.10. Production d'enzymes d'intérêts	68
7.10.1. Production de lipases	68
7.10.2. Production d'amylases	68
7.10.3. Production de protéases	69

CHAPITRE 8. TAXONOMIE POLYPHASIQUE POUR LA CARACTERISATION ET L'IDENTIFICATION DES ISOLATS ----- 70

8.1. Détermination des propriétés microbiologiques	70
8.1.1. Analyses de la morphologie des cellules et des spores	70
8.1.2. Détermination du caractère Gram	70
8.1.3. Détermination de la catalase	70
8.1.4. Détermination de la pseudocatalase	70
8.2. Analyse des profils fermentaires (test API 50 CH)	71
8.2.1. Inoculation et lecture des galeries	71
8.2.2. Analyse numérique des résultats	71
8.3. Analyse des acides gras cellulaires (EMAG)	72
8.3.1. Production de la biomasse	72
8.3.2. Méthylation et extraction des acides gras cellulaires	72
8.3.3. Chromatographie en phase gazeuse des EMAG	72
8.3.4. Analyse des données et identification des isolats	73
8.4. Analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S	73
8.4.1. Extraction et purification de l'ADN génomique	73
8.4.2. PCR du gène de l'ARNr 16S	74
8.4.3. Contrôle de la réaction de PCR par électrophorèse	75
8.4.4. Séquençage du gène de l'ARNr 16S	75
8.4.5. Analyse phylogénétique des séquences obtenues	76

CHAPITRE 9. ETUDE DE LA SPORULATION DES BACTERIES ACIDIFIANTES ----- 77

9.1. Conduite générale de l'étude	77
9.1.1. Milieux de culture utilisés pour la sporulation	77
9.1.2. Méthode de calcul des rendements de sporulation	77
9.2. Production de spores en fiole (milieu liquide)	77
9.3. Production de spores en fermenteur (milieu liquide)	78
9.4. Production de spores sur milieu gélosé (milieu solide)	78
9.5. Production de spores dans les gels de k-carraghénane (milieu solide)	78
9.6. Production de spores dans les billes d'alginate (milieu solide)	78
9.6.1. Immobilisation des cellules par inclusion dans les billes d'alginate	79
9.6.2. Immobilisation sur des billes d'alginate préformées	80
9.6.3. Technique de récolte des cellules immobilisées sur bille d'alginate	81
9.6.4. Lyophilisation des produits récoltés	81
9.7. Evaluation du <i>quorum sensing</i> dans la sporulation de <i>B. coagulans</i>	82
9.7.1. Extraction des substances actives sur la sporulation	82
9.8. Caractérisation des facteurs de sporulation	85
9.8.1. Test de stabilité aux températures extrêmes	85
9.8.2. Test de résistance aux pH extrêmes	85
9.8.3. Test de résistance aux protéases	85

9.8.4. Séparation des facteurs de sporulation sur colonne SPE-C18-----	85
9.9. Activité des facteurs de sporulation de <i>B. coagulans</i> sur la croissance de <i>B. subtilis</i> S499 -----	86
9.9.1. Extraction des lipopeptides produits -----	87
9.9.2. Dosage des lipopeptides par HPLC-C18 -----	87

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE 10. CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE BACTERIES ACIDIFIANTES-----	89
10.1. Introduction-----	89
10.2. Echantillonnages et conditions de sélections-----	89
10.3. Expérience -----	89
10.4. Résultats des isolements -----	89
10.5. Conclusions -----	91
CHAPITRE 11. CONDITIONS DE CROISSANCE ET PROPRIETES TECHNOLOGIQUES -----	92
11.1. Introduction-----	92
11.2. Détermination des conditions de croissance -----	92
11.2.1. Croissance en fonction de la température d'incubation -----	92
11.2.2. Croissance en fonction du pH du milieu d'incubation -----	93
11.2.3. Croissance en fonction de la concentration en NaCl-----	94
11.2.4. Paramètres cinétiques de croissance -----	94
11.3. Détermination des propriétés technologiques -----	95
11.3.1. Introduction -----	95
11.3.2. Profils de production d'acide lactique -----	96
11.3.2.1. Expérience -----	96
11.3.2.2. Résultats et discussion -----	96
11.3.3. Tolérance aux pH acides et aux sels biliaires-----	98
11.3.4. Production d'enzymes d'intérêts : amylases, protéases et lipases -----	100
11.4. Conclusions -----	101
CHAPITRE 12. TAXONOMIE POLYPHASIQUE POUR LA CARACTERISATION ET L'IDENTIFICATION DES ISOLATS -----	102
12.1. Introduction-----	102
12.2. Caractérisation par l'analyse des propriétés microbiologiques -----	102
12.2.1. Détermination du caractère Gram -----	102
12.2.2. Analyse de la morphologie des cellules et des spores -----	103
12.2.3. Recherche de la catalase et la pseudocatalase-----	104
12.2.4. Détermination des types respiratoires et des voies fermentaires -----	105
12.2.5. Conclusions-----	106
12.3. Identification par l'analyse des profils d'assimilation des substrats carbonés---	107
12.3.1. Introduction -----	107
12.3.2. Expérience -----	107
12.3.3. Résultats et discussion -----	107
12.3.4. Conclusions-----	109

12.4. Identification par l'analyse des acides gras cellulaires -----	109
12.4.1. Introduction -----	109
12.4.2. Expérience -----	110
12.4.3. Résultats et discussion -----	110
12.4.4. Conclusions -----	112
12.5. Identification par l'analyse de la séquence des ADNr 16S -----	113
12.5.1. Introduction -----	113
12.5.2. Expérience -----	113
12.5.3. Résultats et discussion -----	114
12.6. Conclusions -----	119
CHAPITRE 13. ETUDE DE LA SPORULATION DES BACTERIES ACIDIFIANTES ---	120
13.1. Introduction -----	120
13.2. Rôle de la composition du milieu dans la sporulation -----	120
13.2.1. Expérience -----	120
13.2.2. Résultats et discussion -----	121
13.2.3. Conclusions -----	124
13.3. Importance des milieux solides pour la sporulation -----	124
13.3.1. Expérience -----	124
13.3.2. Résultats et discussion -----	124
13.4. Conclusions -----	126
CHAPITRE 14. ETUDE DE LA SPORULATION DE <i>B. COAGULANS</i> EN CULTURE	
IMMOBILISÉE -----	127
14.1. Introduction -----	127
14.2. Analyse des variations environnementales susceptibles	
d'influencer la sporulation -----	127
14.2.1. Rôle de l'aération sur la sporulation -----	127
14.2.2. Rôle de l'accumulation de métabolites dans la sporulation -----	129
14.2.3. Conclusion -----	132
14.3. Production de spores de <i>B. coagulans</i> en culture immobilisée -----	132
14.3.1. Introduction -----	132
14.3.2. Systèmes d'immobilisation pour la production de spores de <i>B. coagulans</i> ---	133
14.3.3. Essais d'optimisation de la croissance de <i>B. coagulans</i>	
dans les billes d'alginate -----	134
14.4. Etude d'un schéma de production de spores sur billes d'alginate -----	136
14.4.1. Importance de l'étape de récolte des biomasses -----	136
14.4.2. Importance du séchage et de la conservation des poudres -----	137
14.5. Conclusions -----	138
CHAPITRE 15. ETUDE D'UNE REGULATION DE TYPE QUORUM SENSING	
DANS LA SPORULATION DE <i>B. COAGULANS</i> LMG 6326 -----	139
15.1. Introduction -----	139
15.2. Sporulation de <i>B. coagulans</i> en présence de quantités variables	
de facteurs de sporulation -----	139
15.2.1. Expérience -----	139
15.2.2. Résultats et discussion -----	140
15.3. Relations entre la sporulation de <i>B. coagulans</i> et <i>B. subtilis</i> -----	141
15.3.1. Expérience -----	141
15.3.2. Résultats et discussion -----	141

15.4. Facteurs extracellulaires de sporulation chez d'autres bactéries acidifiantes---	144
15.4.1. Résultats et discussion -----	145
15.5. Propriétés physicochimiques des facteurs de sporulation de <i>B. coagulans</i> -----	145
15.5.1. Résistance des facteurs de sporulation vis-à-vis des conditions environnementales-----	145
15.5.2. Séparation des facteurs de sporulation sur colonne à phase inverse SPE-C18 -----	148
15.6. Conclusions -----	149
CHAPITRE 16. DISCUSSION GÉNÉRALE-----	150
16.1. Concernant la diversité des bactéries acidifiantes isolées dans les environnements du Burkina Faso -----	150
16.2. Concernant la caractérisation et l'identification des bactéries acidifiantes-----	151
16.3. Concernant l'isolement du <i>Lactobacillus sp. CWBI-P2</i> -----	155
16.4. Concernant les propriétés technologiques des bactéries isolées -----	156
16.5. Concernant la sporulation des bactéries acidifiantes-----	157
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES-----	161
REFERENCES-----	164
ANNEXES	

LISTE DES ABREVIATIONS

A	: adénine
ADN	: acide désoxyribonucléique
ADNr 16S	: fragment d'ADN codant pour la sous-unité 16S du ribosome
ADNr 23S	: fragment d'ADN codant pour la sous-unité 23S du ribosome
AFLP	: amplified fragment length polymorphism (sur tout le génome)
ARDRA	: amplified ribosomal DNA restriction analysis
ARN	: acide ribonucléique
ATCC	: American type culture collection
B.	: <i>Bacillus</i>
BLS	: bactérie lactique sporulante
C	: cytosine
°C	: degré celsius
CFU	: colonies formant unités
CMI	: concentration minimale inhibitrice
CPG	: chromatographie en phase gazeuse
CWBI	: centre wallon de biologie industrielle
D.O	: densité optique
Da	: dalton
dNTP	: didésoxy nucléoside tri-phosphate
DSM	: Deutsche sammlung von mikroorganismen.
EDTA	: éthylène diamine tétraacétate
EMBL	: European molecular biology laboratory
EMAG	: esters méthylique d'acide gras
G	: guanine
GTP	: glutamate pyruvate transaminase
GYP	: glucose- yeast (Extrait de levure)-peptone
HPLC	: high performance liquid chromatography
ICSP	: international committee on systematics of prokaryotes
ITS	: internal transcribed spacer
Kb	: kilobases (10 ³ bases)
L.	: <i>Lactobacillus</i>
l	: litre
LDH	: lactate déhydrogénase
LMG	: laboratoire de microbiologie de Gent
min	: minute
MeOH	: méthanol
mM	: millimolaire = 10 ⁻³ mole par litre
N	: normalité
NAD	: nicotinamide adénine dinucléotide
NCBI	: national center for biotechnology information
p/v	: poids / volume
pb	: paire de bases
PCR	: polymerization chain reaction
pH	: potentiel hydrogène
PMSF	: phenyl methyl sulfonyl fluoride
RFLP	: restriction fragments length polymorphism
SDS	: dodécylsulfate de sodium (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophorèse
T	: thymine
t	: temps
TAE	: tris acide acétique-EDTA
Taq	: polymérase extraite de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TFA	: acide trifluoroacétique
U	: unité d'activité enzymatique
UV	: ultra-violet
µmol	: micromolaire = 10 ⁻⁶ mole par litre
v/v	: volume /volume

Liste des abréviations

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Durant le vingtième siècle, l'écologie microbienne a accompli d'importants progrès dans la connaissance des communautés microbiennes pour devenir une discipline majeure de la microbiologie. Le développement des techniques d'isolement en culture pure et de taxonomie est à l'origine de la description de plus de quatre mille espèces de procaryotes (Brenner *et al.*, 2001). Ces progrès ont énormément contribué à faire de la microbiologie une science riche, en constante évolution et surtout un pilier du développement des biotechnologies. L'étude de la diversité des micro-organismes et de leurs fonctions dans les écosystèmes est devenue l'un des enjeux fondamentaux de la microbiologie moderne.

Plusieurs propriétés permettent aux bactéries de résister ou de se développer de manière optimale dans des milieux extrêmes, notamment en présence de très fortes concentrations en sel, de basses températures (moins de 0°C), de hautes températures (plus de 100°C), de fortes pressions, de très faibles activités d'eau (sécheresse), etc. Tous les mécanismes impliqués dans ces comportements ne sont pas encore élucidés. La détermination de ces mécanismes d'adaptation est un défi majeur pour les biotechnologies, car elle leur donnera les moyens de les maîtriser et/ou de les amplifier pour des applications agronomiques, environnementales, et pharmaceutiques.

Les bactéries lactiques font partie des micro-organismes les plus utilisés dans les fermentations industrielles. Ces bactéries interviennent dans plusieurs aspects de la vie des hommes. Le pouvoir antibactérien de l'acide lactique produit dans les cultures est exploité dans plusieurs formulations alimentaires *in vitro* (conservations) et *in vivo* (probiotiques). Dans le groupe des bactéries lactiques, les espèces appartenant au genre *Lactobacillus* sont les plus connues et utilisées dans les fermentations alimentaires (laiteries, fromagerie...), Collins *et al.* (1998) ; Gomez et Malcata (1999). La plupart des espèces appartenant à ce genre ont d'importants besoins nutritionnels et possèdent peu de résistance vis-à-vis des conditions environnementales entourant leur production (séchage, stockage...), et leur utilisation *in vivo* (propriétés physicochimiques du tractus digestif), Buckenhüskes (1993). Cette situation emmène régulièrement les industries à développer avec les microbiologistes, des projets pour la recherche de nouvelles bactéries lactiques capables d'apporter plus de satisfaction en supportant l'ensemble des procédés de production, de stockage et de formulation sans perdre leurs propriétés fonctionnelles recherchées (Berner et O'Donnell, 1998 ; Klein *et al.*, 1998 ; Schillinger, 1999).

C'est dans ce cadre qu'il faut situer notre travail portant sur la recherche, dans les environnements du Burkina Faso, de

nouvelles bactéries acidifiantes (acide lactique), capables de résister aux conditions environnementales extrêmes par le biais de la sporulation. Les bactéries sporulantes impliquées dans la production d'acide lactique connues à ce jour, appartiennent aux genres *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. racemilacticus*, *B. laevolacticus*, etc.) et *Sporolactobacillus* (*Sp. inulinus*, *Sp. racemicus*, *Sp. lactosus*, etc.). Ces bactéries ont l'avantage de posséder peu d'exigences nutritionnelles, une bonne résistance aux stress et partagent la plupart des propriétés fonctionnelles recherchées chez les bactéries lactiques. De ce fait, elles sont d'excellentes candidates pour les formulations industrielles (probiotique, acide lactique). Certaines parmi ces bactéries sont déjà utilisées comme probiotiques pour la nutrition humaine et animale (Cavazzoni *et al.*, 1993 ; Hyronimus *et al.*, 2000).

Dans ce travail il s'agit précisément, d'une part de rechercher de nouvelles bactéries acidifiantes et sporulantes avec des propriétés technologiques intéressantes. Et d'autre part de mettre en évidence la diversité de ces bactéries par rapport aux classifications connues et de trouver des moyens de production de spores adaptables à l'échelle industrielle. Les milieux liquides étant peu efficaces pour la sporulation, des moyens de production en milieux solides ont été envisagés. Des études ont été entreprises pour comprendre le rôle joué par ces cultures immobilisées (milieux infiniment mélangés) dans la sporulation afin d'amplifier les phénomènes observés.

AVANT - PROPOS

Cette partie du doctorat est consacrée à la synthèse des connaissances sur le sujet abordé.

Le lecteur constatera que le terme "bactéries acidifiantes" est régulièrement utilisé dans ce travail pour désigner les bactéries productrices d'acide lactique. Il faut dire que le terme "bactéries lactiques" est généralement utilisé pour désigner un groupe spécifique de micro-organismes, d'intérêt industriel dans lequel les bactéries sporulantes ne sont pas retrouvées. C'est pour éviter d'éventuelles confusions avec les espèces appartenant à ce groupe que le terme "bactéries acidifiantes" est utilisé en lieu et place de "bactéries lactiques".

Le travail bibliographique que nous présentons est organisé en cinq chapitres jugés importants pour la compréhension des objectifs et des stratégies adoptés dans ce travail. Cette revue bibliographique aborde successivement les sujets traitant de la production d'acide lactique par les micro-organismes et de l'importance des bactéries acidifiantes pour les industries biologiques. Un aperçu est donné sur la diversité des bactéries acidifiantes et sporulantes dans la nature, ainsi que l'intérêt de ces bactéries pour les bio-industries. La production de spores étant un objectif spécifique de ce travail, un chapitre entier est consacré à la formation des endospores chez les espèces du genre *Bacillus*. Les événements majeurs intervenant dans la transformation des cellules végétatives en spores sont analysés chez *Bacillus subtilis* qui reste un modèle dans l'étude de la sporulation des cellules procaryotes. Le phénomène de *quorum sensing* dans l'initiation de la sporulation est abordé dans la perspective de mieux comprendre le déroulement de la sporulation chez les *Bacillus*. Une description des mécanismes de synthèse et d'action des phéromones de sporulation participant au *quorum sensing* chez *Bacillus subtilis* est présentée. La revue bibliographique est clôturée par un résumé des techniques d'immobilisation cellulaires utilisées pour la production de biomasse. Un accent particulier est mis sur l'utilisation des billes d'alginate dans l'immobilisation des micro-organismes, car ce système de culture est envisagé pour la production de spores dans le travail.

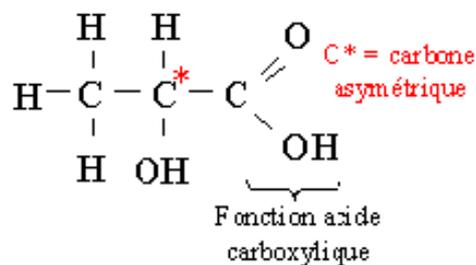
CHAPITRE 1. L'IMPORTANCE DES FERMENTS LACTIQUES DANS LES BIO-INDUSTRIES

1.1. Introduction

Depuis plusieurs millénaires, les bactéries lactiques contribuent à l'élaboration et à la conservation des produits alimentaires. Les premiers ferments lactiques ont été découverts par Pasteur entre 1857 et 1876 dans une distillerie française (Gasser *et al.*, 1994). Mais il a fallu attendre la moitié du 20^{ème} siècle pour que les voies biochimiques de l'accumulation de l'acide lactique par ces bactéries soient connues. L'avènement de l'industrie agroalimentaire avec des exigences toujours plus grandes concernant la constance de la qualité des produits et leur durée de conservation a donné aux bactéries lactiques une place prédominante dans l'économie mondiale et dans les recherches en microbiologie.

1.2. Les fermentations lactiques

L'altération du lait est la manifestation la plus connue de la fermentation lactique. L'acidification qui en résulte est responsable de la coagulation des protéines du lait. Les bactéries dites lactiques convertissent les sucres fermentescibles en acide lactique. Ces bactéries produisent soit du D(-) lactate, soit du L(+) lactate, soit le mélange racémique (DL) lactate (Desmazeaud et de Roissart 1994). Selon les micro-organismes, l'isomère optique de l'acide lactique formé est différent. La bioconversion des sucres fermentescibles aboutit aussi à l'accumulation d'autres produits en plus de l'acide lactique. Il s'agit de l'acide acétique, de l'acide formique, de l'éthanol et du gaz carbonique (CO₂). Il existe deux voies de bioconversion des sucres fermentescibles en acide lactique, aboutissant à l'accumulation de différentes proportions de produits (figure 1.1).



Formule de l'acide lactique (CH₃-CHOH-COOH)

1.2.1. Les fermentations homolactiques

La fermentation est dite homolactique lorsque la conversion des sucres aboutit à l'accumulation d'une quantité d'acide lactique supérieure à celles des autres produits (plus de 90%). La fermentation homolactique utilise une voie métabolique appelée voie de Embden-Meyerhof-Parnas, ou voie du Fructose-diphosphate. La fermentation homolactique est surtout observée chez les *Streptococcus* et certaines espèces du genre *Lactobacillus* et *Thermobacterium* (Desmazeaud et de Roissart 1994). Les bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. laevolacticus*, *B. raecmilacticus*) et *Sporolactobacillus* (*S. inulinus*, *S. laeva*, *S. kofuensis*, *S. racemicus*, *S. lactosus*, etc.), utilisent également cette voie pour convertir les sucres fermentescibles en acide lactique (Nakayama et Yanoshi, 1967a ; Yanagida *et al.*, 1997).

1.2.2. Les fermentations hétérolactiques

La fermentation est dite hétérolactique lorsque la bioconversion des sucres aboutit à la formation de quantité quasi stœchiométrique d'une molécule de CO₂, d'une molécule d'éthanol et d'une molécule d'acide lactique. La dégradation des pentoses aboutit dans ce cas à l'accumulation de quantités égales d'acide lactique et d'éthanol. Outre ces produits, les fermentations hétérolactiques forment aussi de petites quantités d'acide acétique et de glycérol (correspondant à 20% du glucose métabolisé). Le chemin de catabolisme utilisé dans ce type de fermentation est la voie des Pentose-phosphates. Les fermentations hétérolactiques concernent les espèces du genre *Leuconostoc* (*Leuconostoc mesanteroides*, etc.) et certaines espèces du genre *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. buchneri*, etc.), Desmazeaud et de Roissart 1994.

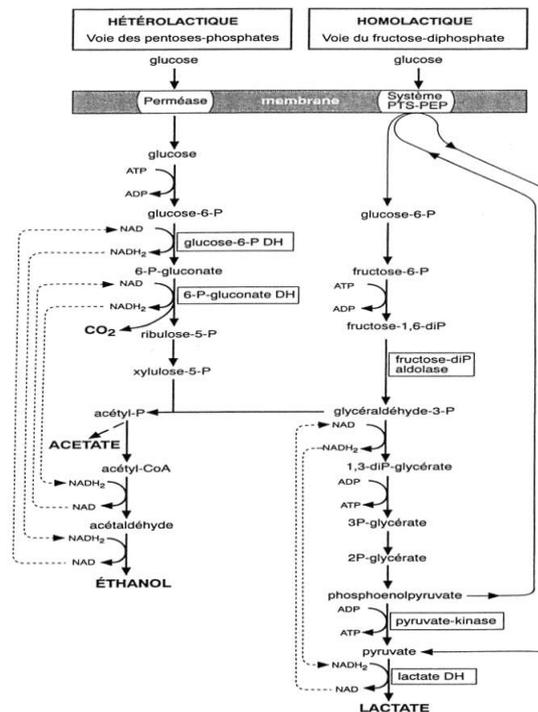


Figure 1.1: Principales voies de fermentation du glucose par les bactéries lactiques (d'après Desmazeaud et de Roissart, 1994).

1.2.3. Intérêt de l'acide lactique d'origine microbienne

L'utilisation des micro-organismes pour la production d'acide lactique connaît beaucoup de succès. Elle intéresse à la fois les industries alimentaires, chimiques et pharmaceutiques (Jarry, 1994):

- Dans l'industrie agroalimentaire, l'acide lactique est utilisé comme additif acidulant et agent conservateur, participant à la stabilisation des produits alimentaires. Il est retrouvé dans presque toutes les boissons. Dans les industries laitières, l'acide lactique détermine la texture des fromages et participe aux qualités organoleptiques des produits fermentés (Russell et Diez-Gonzalez, 1998).
- Dans les industries chimiques, l'acide lactique est utilisé dans la fabrication de polymères naturels, biodégradables et sans danger pour la santé (Jarry, 1994). Les micro-organismes ont l'avantage de ne produire qu'un seul énantiomère, éliminant de ce fait les étapes de purification du produit (Ohara et Yahata, 1996).
- Dans les formulations probiotiques, l'organisation mondiale de la santé (FAO/WHO, 2001), recommande l'utilisation de

ferments lactiques produisant l'énantiomère L(+) de l'acide lactique, dont l'assimilation et le métabolisme sont plus facilement réalisés contrairement à l'acide D(-) lactique (Vaughan *et al.*, 1999).

1.3. Propriétés technologiques recherchées chez les ferments lactiques

1.3.1. Production de CO₂ et de composés aromatiques

La production de gaz carbonique par les bactéries hétérofermentaires est recherchée dans certaines industries alimentaires. C'est le cas dans la fabrication des fromages à pâtes molles, pressées et persillées (Mietton *et al.*, 1994). Pour les fromages à pâtes molles et pressées, c'est la production de CO₂ qui assure la formation d'ouverture dans les caillés. Dans la production des fromages à pâtes persillées comme le Roquefort®, la production du CO₂ crée les cheminées d'aération nécessaires à la croissance de *Penicillium roqueforti*, à l'intérieur du fromage. Dans la fermentation des choucroutes, la production de CO₂ favorise l'installation de l'anaérobiose nécessaire à l'activité des bactéries micro-aérophiles (Mietton *et al.*, 1994).

Le principal composé aromatique produit par les bactéries lactiques est le diacétyle. Le diacétyle est un composé instable qui est désiré dans de nombreux produits frais (beurres, fromages frais, crèmes, "buttermilk", etc.). Selon Jordan *et al.* (1996), la synthèse du diacétyle est relativement simple et se fait en deux étapes à partir du pyruvate (figure 1.2). Tous les gènes codant pour les enzymes impliquées dans cette synthèse ont été caractérisés (Kleerebezem *et al.*, 2002). Le diacétyle est produit par *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* var *diacetylactis* et *Leuconostoc mesenteroides*. D'autre part, les bactéries lactiques produisent de l'acétoïne et du 2,3-butanediol (figure 1.2), qui sont également des composés aromatiques recherchés dans certaines technologies.

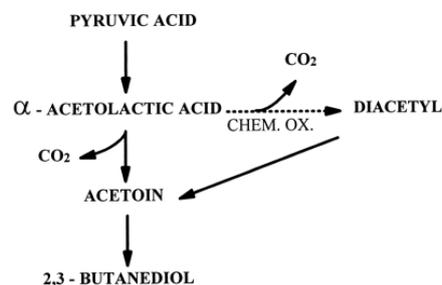


Figure 1.2. Voies de bioconversion du Pyruvate en composé aromatique par les bactéries lactiques (adaptée de Nielsen et Richelieu, 1999)

1.3.2. Production de substances inhibitrices

Les bactéries lactiques créent des conditions défavorables à la croissance des micro-organismes contaminants, par la production de substances inhibitrices. Les agents inhibiteurs le plus souvent recherchés dans l'utilisation des bactéries lactiques sont : l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les bactériocines (Buckenhuskes, 1993).

1.3.2.1. Activité antibactérienne de l'acide lactique

Le pouvoir antibactérien des acides organiques est connu et exploité depuis plusieurs dizaines d'années (Presser *et al.*, 1997 ; Russell et Diez-Gonzalez, 1998 ; Roe *et al.*, 1998). Les acides organiques ont des spectres d'action très différents d'une molécule à l'autre (tableau 1.1). L'action de certains acides organiques est étendue à la fois aux bactéries, aux levures et aux moisissures, comme c'est le cas pour l'acide acétique et l'acide propionique (Bloom et Mortvedt, 1991).

Tableau 1.1. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) pour différentes formes de trois acides organiques (adapté de Presser *et al.*, 1997)

Micro-organismes	Acides organiques	RCOOH CMI (µM)	(RCCO ⁻ + H ⁺) CMI (µM)
<i>E. coli</i>	Ac. Lactique	8,32	-
<i>E. coli</i>	Ac. Sorbique	1	350
<i>E. coli</i>	Ac. Propionique	70	800

RCOOH : forme non dissociée; (RCCO⁻ + H⁺) : forme dissociée

Plusieurs mécanismes ont été décrits pour expliquer le mode d'action des acides organiques dans l'inhibition de la croissance des micro-organismes indésirables. Selon Lambert et Stratford (1999), en dépit de la variabilité de leur structure, les acides organiques partagent un mode d'action commun. Chaque acide organique a toutefois des propriétés différentes envers chacun des germes contaminants, en fonction de sa concentration, du pH du milieu, de son état de dissociation (forme ionique et non ionique), de la formulation, etc. Il est connu que ce sont les formes non dissociées des acides organiques qui sont toxiques pour les germes indésirables, même si quelques activités peuvent être retrouvées chez les formes dissociées de certains acides organiques (Presser *et al.*, 1997).

L'acide lactique agirait dans l'inhibition des germes indésirables suivant quatre mécanismes (Brul et Coote, 1999 ; Piva, 2000) :

- la perturbation de la membrane cellulaire

- l'inhibition des fonctions métaboliques fondamentales
- la modification du pH interne
- la modification de la pression osmotique interne

Tous ces mécanismes résultent de l'accumulation d'anions (RCOO^-) et de proton (H^+) dans le cytoplasme des bactéries, comme le montre la figure 1.3 (Gauthier, 2002). En effet, les formes non dissociées des acides organiques diffusent passivement à travers les parois des bactéries et s'y dissocient à la faveur d'un pH interne supérieur à leur pKa.

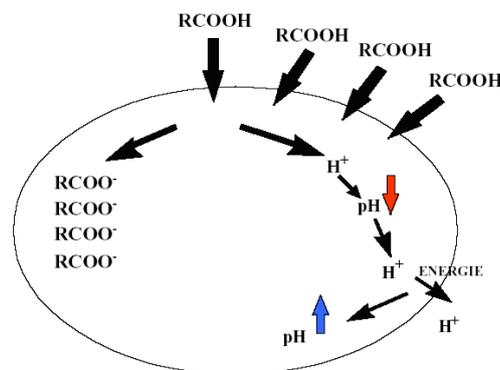


Figure 1.3. Mode d'action des acides organiques dans l'inhibition des germes indésirables (selon Piva, 2000)

L'accumulation des protons (H^+) dans le milieu intracellulaire provoque une importante baisse du pH cytoplasmique incompatible avec les fonctions métaboliques. Chez les bactéries sensibles à un gradient de pH transmembranaire, il en résulte un arrêt des fonctions métaboliques dont la glycolyse, les activités enzymatiques, la synthèse des acides nucléiques, et une perturbation des transports membranaires (Piva, 2000 ; Gauthier, 2002).

L'accumulation des anions toxiques (RCOO^-) dans le cytoplasme des bactéries entraîne une modification de la pression osmotique interne. Pour rétablir l'équilibre, la bactérie fera appel à une pompe à ATP consommatrice d'énergie qui l'affaiblira et finira par causer sa mort (Piva, 2000 ; Gauthier, 2002).

1.3.2.2. *Activité antibactérienne du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)*

La production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est une propriété recherchée chez les bactéries lactiques. C'est surtout dans l'industrie laitière que la production du peroxyde d'hydrogène est intéressante pour l'inhibition des germes psychotrophes et des bactéries pathogènes. Le peroxyde d'hydrogène a deux types d'action sur les germes contaminants :

- une action directe par l'oxydation des lipides et protéines membranaires ;
- et une action indirecte par l'activation du système lactoperoxydase-thiocyanate du lait (Desmazeaud, 1994).

1.3.2.2.1. Oxydation des lipides et protéines membranaires par l'H₂O₂

Les lipides et protéines membranaires des germes dépourvus de catalase ou de pseudocatalase sont particulièrement sensibles à l'action du peroxyde d'hydrogène ; surtout ceux constitués de grandes quantités d'acide gras polyinsaturés (Lindgren *et al.*, 1990). De nombreux produits sont libérés lors de la peroxydation des lipides (diènes conjugués, peroxydes, aldéhydes, alcanes). La plupart de ces composés sont cytotoxiques et mutagènes. La formation de dérivés d'oxydation dans les bicouches membranaires entraîne des perturbations dans l'architecture des membranes et altère le fonctionnement des enzymes et des transporteurs membranaires conduisant à l'inactivation des bactéries.

1.3.2.2.2. Activation du système lactoperoxydase-thiocyanate par l'H₂O₂

Le système lactoperoxydase-thiocyanate est un système antibactérien indigène participant à la conservation du lait et des produits laitiers (Desmazeaud, 1994). La lactoperoxydase est une enzyme d'origine bovine présente en des concentrations relativement élevées dans le lait (De Vusyt et Vandamme, 1994). Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du thiocyanate en présence du peroxyde d'hydrogène qui libère de l'acide hypothiocyanate (HOSCN). Au pH du lait, le HOSCN est dissocié et se présente principalement sous la forme d'ion hypothiocyanate (OSCN), particulièrement toxique pour les germes psychotrophes et les bactéries pathogènes. Les ions OSCN réagissent de manière spécifique avec les groupes sulphydryles libres rendant de la sorte inactive diverses enzymes métaboliques vitales pour les bactéries, ce qui a pour effet de bloquer leur métabolisme et la possibilité de se multiplier (Desmazeaud, 1994).

1.3.2.3. Activité antibactérienne des bactériocines

Certaines bactéries lactiques produisent des substances antibactériennes particulières, de nature protéique, appelées bactériocines. Les bactériocines des bactéries lactiques possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de nombreux germes indésirables (Diep et Nes, 2002). C'est Kleanhammer (1988), qui a donné la première définition complète des bactériocines. Selon cette définition, les bactériocines sont des protéines ou des complexes protéiques biologiquement actifs, ayant un spectre d'action étroit, limité aux espèces génétiquement proches. Cette définition reste encore insuffisante car, il a été montré que certaines bactériocines produites

par des bactéries lactiques pouvaient agir sur le développement de germes génétiquement différents. C'est notamment le cas de l'inhibition de la germination de spores de *Bacillus* et *Clostridium* par l'action de la nisine de *Lactococcus lactis* (Hugenholtz et de Veer, 1991 ; Mansour *et al.*, 1999). Il existe une variété de bactériocines produites par les bactéries lactiques. Ces molécules diffèrent essentiellement par leurs modes d'action, leurs spectres d'action et leurs propriétés physicochimiques (Diep et Nes, 2002). Sur la base de la diversité des structures et des spectres d'action, les bactériocines ont été regroupées en quatre classes.

- **La classe I** : regroupe les lantibiotiques. Ce sont des peptides de petites tailles (inférieures à 5 KDa), thermosensibles ayant la particularité d'avoir dans leur structure des acides aminés non habituels tel que la lanthionine, la β -methyl lanthionine, la dehydrobutyrine et la dehydroalanine. C'est dans cette classe que sont retrouvées les nisines A et Z de *Lactococcus lactis*, ainsi que la plantacine C de *L. plantarum*, la lactocine S de *L. sakei*, la variacine de *Micrococcus varians*, etc., (Diep et Nes, 2002). La nisine a été reconnue comme étant sans danger pour la santé et intégrée dans la liste des produits GRAS (generally recognised as safe), Van Reenen *et al.* (2003).
 - **La classe II** : regroupe des bactériocines dites non lantibiotiques qui sont des peptides thermostables et de tailles inférieures à 10 KDa. Cette classe est subdivisée en quatre sous-classes suivant la diversité de la séquence de la partie N-terminale des peptides. Plusieurs bactériocines sont retrouvées dans cette classe, dont la sakacine de *Lactobacillus sake*, la pediocine des *Pediococcus*, la curvacine de *L. curvatus*, l'ntéroicine des *Enterococcus*, etc., (Cleveland *et al.*, 2001).
 - **La classe III** : regroupe des peptides de hauts poids moléculaires (supérieurs à 30 KDa) et sensibles à la chaleur (détruit à 60°C). Ces bactériocines ont des spectres d'action très limités (n'agissent que sur des souches génétiquement proches). Dans cette classe sont retrouvées : l'entérolysine de *Enterococcus faecalis*, l'helveticine J de *Lactobacillus helveticus*, la millericine B de *Streptococcus milleri*, la zocine A de *Streptococcus zooepidemicus* , etc., (Diep et Nes, 2002).
 - **La classe IV** : regroupe toutes les bactériocines dont l'activité antibactérienne est affectée par l'action des lipases, protéases, ou amylases. Cela suppose la présence de lipides, protéines, ou d'hydrates de carbone dans leur structure (Diep et Nes, 2002).
-

Concernant le mécanisme d'action des bactériocines, plusieurs auteurs admettent qu'il peut se résumer à la formation de pores dans la membrane cytoplasmique des bactéries cibles (Bruno et Montville, 1993 ; Brotz *et al.*, 1998). La création de ces pores conduit à un flux de plusieurs composés intracellulaires vers le milieu extérieur et à la dissipation de la force motrice protonique (Le Marrec *et al.*, 2000 ; Diep et Nes 2002). Selon Song et Richard (1997), contrairement aux antibiotiques classiques, l'activité antibactérienne des bactériocines est limitée dans le temps.

1.3.3. Intérêt des ferments lactiques dans le maintien de la santé

Le zoologiste et microbiologiste Ukrainien Elia Ilitch Metchnikov (1845-1916) a été le premier à établir une corrélation entre la longévité de certains peuples Européens (balkaniques et orientaux) et la protection de leur organisme contre plusieurs maladies par la consommation régulière de produits fermentés à base de lait (Bottazzi *et al.*, 1994).

Le terme probiotique a été utilisé par Lilly et Stillwell (1965), pour désigner ce type d'activité bénéfique qu'un micro-organisme pouvait apporter à la croissance d'une espèce animale hôte. En 2001, le Panel d'experts FAO/OMS a donné une définition complète à ce terme : « *un probiotique est un organisme vivant qui, administré en quantité adéquate confère un effet bénéfique à la santé de l'hôte* » (FAO/WHO, 2001).

Aujourd'hui, plusieurs propriétés nutritionnelles, prophylactiques et thérapeutiques sont reconnues aux bactéries probiotiques. Des études cliniques, ont confirmé les observations de Metchnikov et montré que la consommation régulière d'aliments fermentés à base de bactéries lactiques, contribuait à :

- améliorer la défense naturelle du corps (Tannock, 1997 ; Salminen *et al.*, 1998 ; Marteau et Seksik, 2004) ;
- diminuer le taux de cholestérol du sang (Salminen et Saxelin, 1996 ; Pereira et Gibson, 2002) ;
- améliorer la digestion du lactose (Gournier-Chateau *et al.*, 1994 ; Yesowitch *et al.*, 2003) ;
- alléger et prévenir les désordres intestinaux (Marcon, 1997 ; Marteau et Seksik, 2004) ;
- réduire les risques de certains cancers dont ceux de l'intestin (Modler *et al.*, 1990 ; Rafter, 2003) ;
- etc.

L'incorporation des bactéries probiotiques dans l'alimentation humaine a conduit à l'apparition d'une classe d'aliments dite "aliments santé" (Scheinbach, 1998). Ces aliments sont commercialisés dans le monde entier (tableau 1.2) et certaines marques rencontrent d'énormes succès auprès des consommateurs.

Tableau 1.2. Quelques aliments probiotiques commercialisés (adapté de Scheinbach, 1998)

Pays d'origine	Produit	Bactéries utilisées
Suisse	ACO-yogurt	<i>S. thermophilus</i> ; <i>L. bulgaricus</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>Bf. Bifidus</i>
Danemark	Cultura-AB	<i>L. acidophilus</i> ; <i>Bf. bifidum</i>
Allemagne	Bifighurt	<i>Bf. longum</i> ; <i>S. thermophilus</i>
Japon	Yakult	<i>L. casei</i>
Allemagne	Actimel-Orange	<i>L. acidophilus</i>
Finlande	Gefilac	<i>L. casei</i> GG (<i>rhamnosus</i>)
France	Olifus	<i>Bf. bifidum</i> / <i>B. longum</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>S. lactis</i> ; <i>S. cremoris</i>
Slovénie	Biokys	<i>Bf. bifidum</i> ; <i>L. acidophilus</i> ; <i>P. acidilactici</i>

L: *Lactobacillus*; *Bf*: *Bifidobacterium*; *S*: *Streptococcus*; *P*: *Pediococcus*

Plusieurs caractéristiques physiologiques et biochimiques permettent à ces bactéries probiotiques d'adhérer et de coloniser le tractus digestif (facteurs d'adhérence, résistances aux pH acides, aux sucs gastriques, aux sels biliaires). *Lactobacillus casei* GG a ainsi exprimé *in vitro* des facteurs d'adhérence qui lui confère de multiples interactions avec les cellules épithéliales humaines, et une compétitivité avantageuse dans le but de résider à long terme dans le gros intestin (Lankaputhra et Shah, 1995 ; Tannock, 1997).

CHAPITRE 2. LES BACTÉRIES SPORULANTES PRODUCTRICES D'ACIDE LACTIQUE

2.1. Introduction

Le terme bactérie lactique est généralement utilisé pour désigner un groupe spécifique de bactéries auquel plusieurs ouvrages ont été consacrés (Dellaglio *et al.*, 1994). Dans ces ouvrages, les bactéries lactiques sont définies comme étant des bactéries Gram positive, catalase négative (à l'exception de la pseudocatalase chez certaines espèces), micro-aérophiles et incapables de former des endospores. Depuis plusieurs années pourtant, la capacité à accumuler d'importantes quantités d'acide lactique a été observée chez certaines bactéries ne répondant pas à cette définition. C'est le cas des bactéries sporulantes productrices d'acide lactique qui ne sont pas reconnues dans la terminologie "bactéries lactiques" et qui ne sont presque jamais citées dans les ouvrages consacrés aux bactéries lactiques.

Les bactéries sporulantes productrices d'acide lactique appartiennent aux genres *Bacillus* et *Sporolactobacillus*. La première bactérie sporulante et acidifiante connue est *Bacillus coagulans*, isolée par Hammer (1915). L'espèce type du genre *Sporolactobacillus* est *S. inulinus* isolée par Kitahara et Suzuki (1963). Ces bactéries se différencient du groupe des bactéries lactiques essentiellement par la formation d'endospores. La quasi-totalité des propriétés fonctionnelles recherchées chez les bactéries lactiques (production d'agents inhibiteurs, rôles thérapeutiques et prophylactiques) sont retrouvées chez ces bactéries sporulantes (Hyronimus *et al.*, 2000 ; Sanders *et al.*, 2003).

Certaines bactéries sporulantes et acidifiantes sont utilisées industriellement pour la production d'acide lactique (Jan *et al.*, 1990 ; Zukowski, 1992 ; Payot *et al.*, 1999) et pour des formulations probiotiques en nutrition humaine et animale (Bel Industrie, 1992 ; Cavazzoni *et al.*, 1998 ; Casula et Cutting, 2002).

2.2. Les bactéries acidifiantes appartenant au genre *Bacillus*

2.2.1. Quelques généralités sur le genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*. Les *Bacillus* se distinguent des autres *Bacillaceae* par leur morphologie (bâtonnet régulier), leur capacité à former des endospores (une seule spore par cellule), leur type de flagellation (péritriche), leur type respiratoire (aérobies ou aéro-anaérobie), et la production de catalase (Claus et Berkeley, 1986). Ce genre rassemble des bacilles Gram positive, ou Gram variable et même négative (exceptionnellement). Il existe environ une centaine d'espèces de *Bacillus* connues (Sanders

et al., 2003). Le genre *Bacillus* regroupe à la fois des bactéries pathogènes pour l'homme, les plantes et les animaux (toxine de *B. anthracis*, toxine de *B. thuringiensis*, enterotoxine de *B. cereus*), et des bactéries non pathogènes participant à plusieurs types de fermentations traditionnelles et industrielles (Green *et al.*, 1999 ; Hosoi et Kiuchi, 2003 ; Ouoba *et al.*, 2003). Les *Bacillus* participent à la production de diverses substances biologiques (enzymes, surfactants, antibiotiques, etc.) dans le domaine industriel et environnemental (Logan *et al.*, 1984 ; Diep et Nes, 2003). Les *Bacillus* sont retrouvés dans une variété d'environnement à travers le monde, notamment dans les sols, les eaux, l'air et sur les organismes vivants (Claus et Berkeley, 1986).

La classification des *Bacillus* a longtemps été une préoccupation pour les microbiologistes compte tenu de leurs importances économiques. Les espèces du genre *Bacillus* étaient traditionnellement classées en trois groupes selon la morphologie de leurs cellules et de leurs spores (Tableau 2.1).

Tableau 2.1: Classification morphologique des espèces du genre *Bacillus* (adapté de Claus *et al.*, 1986)

Groupe 1 :	<p>Bacilles Gram positive, spores non déformantes, centrales ou terminales, sphériques ou ovoïdes. Ce groupe est divisé en deux sous-groupes</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ groupe 1A : constitué des bacilles d'un diamètre supérieur à 1 µm et contenant des inclusions de poly-bêta-hydroxybutyrate (ex : <i>Bacillus anthracis</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Bacillus thuringiensis</i>, etc.). ▪ groupe 1B : bacilles de diamètre inférieur à 1 µm, dépourvus d'inclusion de poly-bêta-hydroxybutyrate (ex : <i>Bacillus coagulans</i>, <i>Bacillus licheniformis</i>, <i>Bacillus subtilis</i>, etc.)
Groupe 2 :	<p>Bacilles Gram variable, spores déformantes, ovoïdes, centrales ou terminales, (ex : <i>Bacillus circulans</i>, <i>Bacillus popilliae</i>, <i>Bacillus stearothermophilus</i>, etc.)</p>
Groupe 3 :	<p>Bacilles à Gram variable spores déformantes, sphériques, terminales ou sub-terminales (ex : <i>Bacillus globisporus</i>, <i>Bacillus insolitus</i>, <i>Bacillus sphaericus</i>, etc.)</p>

Cette classification a été confrontée à de nombreux problèmes, liés à des phénomènes de dissociation observés chez certaines espèces (Larpen, 2000). La taxonomie phylogénétique basée sur l'étude des gènes et de leurs produits, a apporté une contribution considérable à la classification des *Bacillus*. Suivant la diversité de séquence du gène codant pour l'ARNr 16S, Ash *et al.* (1991) ont classé les différentes espèces du genre *Bacillus* dans cinq groupes phylogénétiques (figure 2.1).



Figure 2.1: Arbre phylogénétique des membres du genre *Bacillus* selon l'alignement du gène codant pour l'ARNr 16S (Ash *et al.*, 1991).

Cette réorganisation a ensuite été poursuivie avec la création de plusieurs nouveaux genres correspondant à des groupes génétiquement homogènes. C'est ainsi qu'a été créé le genre *Alicyclobacillus* rassemblant trois espèces acidophiles et thermophiles, par Wisotzkey, *et al.* (1992). Dans les années qui ont suivi une plus grande réorganisation a été initiée avec la création de plusieurs nouveaux genres, dont le genre *Paenibacillus* (anaérobie facultative et mésophile) par Ash *et al.* (1994); les genres *Aneurinibacillus* (aérobies et mésophiles), *Brevibacillus* (aérobie et mésophile) et *Halobacillus* (halophile et mésophile) par Shida *et al.* (1996); le genre *Virgibacillus* (mésophile et modérément halotolérant) a été proposé par Heyndrickx *et al.* (1998); les genres *Gracilibacillus* (mésophile et extrêmement halotolérant) et *Salibacillus* (halophile modéré) ont été créés par Waino *et al.* (1999); le genre *Anoxybacillus* (anaérobie stricte ou facultative) par Pikuta *et al.* (2000); le genre *Thermobacillus* (anaérobie et thermophile) par Touzel *et al.* (2000); le genre *Filobacillus* (aérobie, résistant aux pH alcalins, halophile), par Schlesner *et al.* (2001); le genre *Ureibacillus* (aérobie strict et

thermophile), par Fortina *et al.* (2001) ; et le genre *Geobacillus* (aéro-anaérobie et thermophile), par Nazina *et al.* (2001).

La taxonomie des bactéries acidifiantes appartenant au genre *Bacillus* qui sont retrouvées avec *B. coagulans* dans le groupe I des ARNr 16S (Ash *et al.*, 1991), n'a pas encore été affectée par cette réorganisation.

2.2.2. Les bactéries acidifiantes du genre *Bacillus*

Les principales bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* connues sont *B. coagulans* (Hammer, 1915), *B. racemilacticus* et *B. laevolacticus* (Nakayama et Yanoshi, 1967a). Ces trois bactéries ont été suffisamment décrites dans la littérature et la plupart de leur propriétés ont été déterminées (Sanders *et al.*, 2003). Par contre, depuis les travaux de Nakayama et Yanoshi (1967a) aucun autre travail ne semble être disponible sur la sélection de nouvelles bactéries acidifiantes du genre *Bacillus*. Nous assistons plutôt à des travaux sur l'organisation des souches existantes ou à l'isolement de souches appartenant aux espèces connues. C'est le cas pour la création de l'espèce *Bacillus smithii* (Lawrence *et al.*, 1988) à partir de *Bacillus coagulans*. Cette situation peut s'expliquer soit par la rareté des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* dans la nature soit par un désintérêt que ces bactéries présenteraient pour les microbiologistes.

2.2.2.1. *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans a été la première bactérie acidifiante et sporulante connue (Hammer, 1915). Cette bactérie a été isolée suite à son implication dans les processus d'altération des produits laitiers pasteurisés. *Bacillus coagulans* a d'abord constitué une préoccupation pour les industries agroalimentaires, notamment celles produisant des jus de fruits et les industries sucrières (Kalogridouvassiliadou, 1992 ; Cosentino *et al.*, 1997). Avant d'être reconnue comme une source considérable d'enzymes thermostables pouvant ouvrir des opportunités de développement de nouveaux produits. *B. coagulans* est utilisée pour la production de beta-galactosidase (Batra *et al.*, 2000) ; de chitosanase (Yoon *et al.*, 2002) ; d'amylases thermostables (Babu et Satyanarayana, 1995) ; de lipases (el-Shafei et Rezkallah, 1997), etc. Les spores de *Bacillus coagulans* sont résistantes à l'acidité (Palop *et al.*, 1997) et aux traitements thermiques de 105°C à 110 °C pendant 30 min et même au-delà (Palop *et al.*, 1999). Malgré son implication dans les processus d'altérations alimentaires aucun pouvoir pathogène n'a jamais été mis en évidence expérimentalement chez *B. coagulans* (Euzeby, 2003).

Sur le plan taxonomique, *Bacillus coagulans* a été confrontée à de nombreux problèmes de classification dus à la diversité phénotypique et génotypique des souches isolées à travers le monde

et aux difficultés rencontrées dans la définition d'une espèce type (Logan *et al.*, 1984). Dans plusieurs cas, des souches appartenant à *Bacillus coagulans* ont été identifiées comme de nouvelles espèces des genres *Bacillus* et *Lactobacillus*. Il s'agit notamment de *Bacillus thermoacidurans* par Berry *et al.* (1933); *Bacillus dextralacticus* par Andersen *et al.* (1939) ; *Bacillus thermoacidificans* par Renco *et al.* (1942) ; *Lactobacillus sporogenes* par Horowitz-Wlassowa et Nowotelnow (1933) et *Lactobacillus cereales* par Olsen *et al.* (1944).

Une étude rigoureuse a permis à De Clerck *et al.* (2004), de proposer une définition complète et sans ambiguïté à l'espèce type de *Bacillus coagulans*. Selon ces auteurs, *Bacillus coagulans* est une bactérie aéro-anaérobie ; thermophile (45°C-55°C) ; ayant une morphologie en bâtonnet régulier avec une endospore ellipsoïdale, non déformante, en position subterminale mais occasionnellement terminale ou centrale ; la sporulation pouvant être rendue difficile pour certaines souches ; produisant de l'acide L(+) lactique par fermentation du glucose; les acides gras cellulaires majoritaires dans sa structure sont l'acide iso-C15 :0 (15%), l'acide Anteiso-C15 :0 (29%) et l'acide Anteiso-C17 :0 (39%). L'espèce type qui est la souche LMG 6326 (ATCC 7050, DSM 1, NCTC 10334) possède un (G+C)% de 47,7 (pourcentage de guanine et cytosine par rapport à l'ensemble des bases azotées de l'ADN génomique).

2.2.2.2. *Bacillus laevolacticus* et *Bacillus racemilacticus*

Les travaux de Nakayama et Yanoshi (1967a) ont apporté une contribution remarquable à l'étude de la diversité des bactéries acidifiantes appartenant aux genres *Bacillus* et *Sporolactobacillus*. Leurs travaux ont abouti à l'isolement de *Bacillus laevolacticus*, *Bacillus racemilacticus* et plusieurs nouvelles espèces du genre *Sporolactobacillus*. *Bacillus laevolacticus* et *Bacillus racemilacticus* ont été isolées dans le voisinage des plantes (racines) au Japon. *Bacillus laevolacticus* produit de l'acide D(-) lactique et *Bacillus racemilacticus* produit un mélange racémique d'acide (DL)-lactique. Ce sont des espèces mésophiles et micro-aérophiles partageant un nombre important de traits de caractère. Sur le plan biochimique, ces deux bactéries se distinguent essentiellement par l'isomérisation de l'acide lactique qu'elles produisent et par leur composition en acides gras cellulaires. Sur le plan génétique, Suzuki et Yamasato (1994), et Andersch *et al.*, (1994), ont montré que ces bactéries partageaient un important taux d'homologie de leur ADNr 16S entre elles et avec les espèces du genre *Sporolactobacillus*. Elles forment d'ailleurs avec ces bactéries un groupe taxonomique assez homogène (figure 2.2).

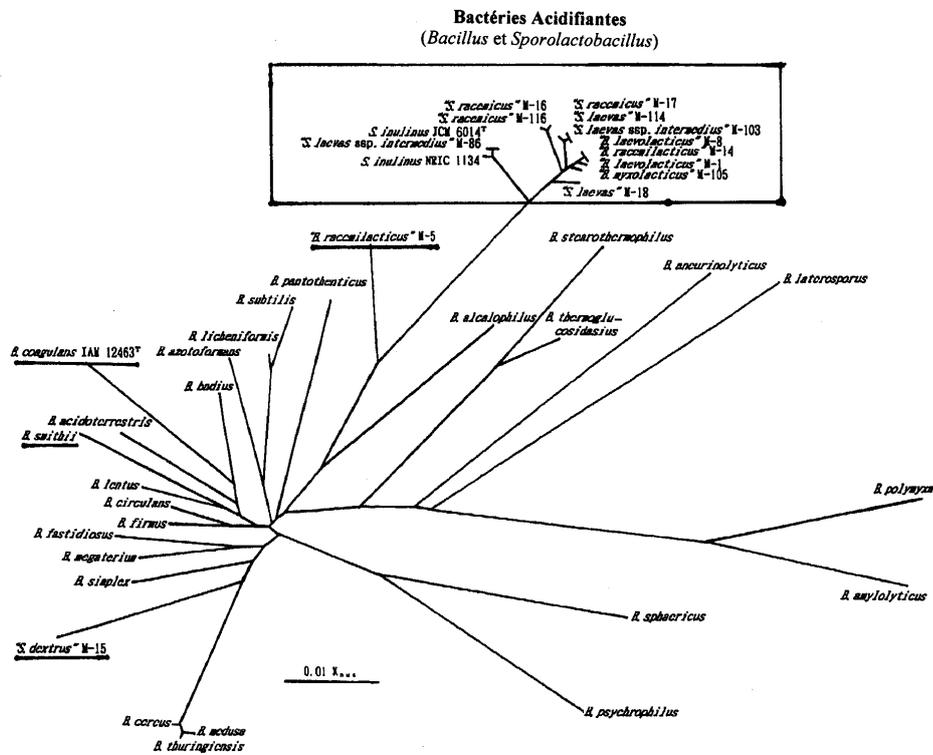


Figure 2.2 : Arbre phylogénétique des bactéries acidifiantes et sporulantes (*Bacillus* et *Sporolactobacillus*). Suzuki et Yamasato (1994). Alignés avec d'autres espèces du Groupe I des *Bacillus*. Les alignements ont été réalisés suivant une combinaison des séquences des gènes codant pour les ARNr 16S et les valeurs des G+C %.

2.3. Les bactéries acidifiantes appartenant au genre *Sporolactobacillus*

Le genre *Sporolactobacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*. Il est décrit comme étant à la frontière entre les genres *Bacillus* et *Lactobacillus* (Claus et Berkeley, 1986). La première description de ce genre a été proposée par Kitahara et Suzuki (1963), avec *Sporolactobacillus inulinus* comme espèce type. Les *Sporolactobacillus* sont des bactéries particulières pour leurs capacités à sporuler dans des conditions quasi aérobies sans production de catalase. Ce sont des bâtonnets réguliers (spore terminale), mobiles, microaérophiles, mésophiles, et acidifiantes (acide lactique par voie homo-fermentaire). Plusieurs travaux de sélection ont été réalisés dans ce genre contribuant à la description de nouvelles espèces dans les classifications (Tableau 2.2). Selon Claus *et al.* (1986) les habitats naturels des *Sporolactobacillus* sont les sols, les excréments de volailles et les produits laitiers. Mais les

travaux de Doores et Westhoff (1983), ont montré que ces bactéries étaient très rares même dans ces milieux. Sur un total de 700 échantillons prélevés dans ces environnements ils n'ont pu isoler que deux souches de *Sporolactobacillus*.

Tableau 2.2. Les espèces du genre *Sporolactobacillus* connues et les types d'acide lactique qu'elles produisent.

Espèces	Acide lactique produit	Référence
<i>S. inulinus</i>	D (-)	Kitahara et Suzuki (1963)
<i>S. racemicus</i>	D/L	Nakayama et Yanoshi (1967b)
<i>S. Laevas</i>	D (-)	Nakayama et Yanoshi (1967b)
<i>S. dextrus</i>	L (+)	Nakayama et Yanoshi (1967b)
<i>S. lactosus</i>	D (-)	Yanagida et al. (1997)
<i>S. kofuensis</i>	D (-)	Yanagida et al. (1997)
<i>S. terrae</i>	D (-)	Yanagida et al. (1997)
<i>S. nakayamae</i>	D (-)	Nakayama et Yanoshi (1967b)

Sur la base de l'analyse de la composition des acides gras cellulaires, Uchida et Mogi (1973) et Collins *et al.* (1979) ont montré que le genre *Sporolactobacillus* était plus proche des *Bacillus* que des *Lactobacillus*. Les espèces de ce genre possèdent dans leur structure des acides gras à chaînes ramifiées (iso et anteiso), pourtant caractéristique des *Bacillus* et apparentés. Les analyses phylogénétiques réalisées par Suzuki et Yamasato (1994) sur différentes bactéries acidifiantes appartenant au genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* ont confirmé ces observations et montré que ces deux genres étaient génétiquement très proches (Figure 2.2). Ces auteurs ont alors suggéré que le genre *Sporolactobacillus* soit classé comme un sous genre des *Bacillus*. Des observations similaires ont aussi été faites par Ash *et al.* (1991), qui ont montré suivant l'analyse des ADNr 16S que *Sporolactobacillus inulinus* (l'espèce type des *Sporolactobacillus*) était assez proche des espèces du groupe V des *Bacillus* (Figure 2.1).

Tableau 2.3: Quelques caractères morphologiques, physiologiques et génétiques des espèces du genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* productrices d'acide lactique.

	<i>Bacillus laevolacticus</i>	<i>Bacillus racemilacticus</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
Gram	+	+	+	+
CO ₂	-	-	-	-
G+C %	43 – 45	37	44 - 56	38 – 39,3
Spores	T	T	T/S/C	T
aérobie	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	-
anaérobie	+	+	+	+
pH bouillon	<4	<4	>4	>4
Acide lactique	D(-)	DL	L(+)	D(-)
Cellules (Um)	0,8-1,2	1,2-1,3	1,3-1,7	0,8-1,2
T°C optimale	30°C	30°C	45°C	30°C
T°C maximale	40°C	45°C	55°C	40°C

T : position terminale ; S : position subterminale ; C : position centrale

2.4. Les propriétés technologiques des bactéries acidifiantes

Selon Adami et Cavazzoni (1999), et Hyronimus *et al.* (2000), les bactéries acidifiantes appartenant aux genres *Bacillus* possèdent un nombre important des propriétés fonctionnelles recherchées chez les bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* etc.). En plus de ces propriétés fonctionnelles la formation d'endospores leur offre une meilleure résistance aux conditions environnementales entourant les processus de formulation (séchage, congélation, broyage, etc.). Certaines bactéries acidifiantes font l'objet d'exploitations dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et chimiques. C'est le cas de *B. coagulans* qui est utilisé pour la production d'acide lactique et comme probiotique et de *Sporolactobacillus inulinus* qui est utilisé comme probiotique et qui fait même l'objet d'un brevet dans ce sens (Bel Industrie, 1992).

2.4.1. Rôle dans la production industrielle d'acide lactique

Bacillus coagulans et *Bacillus laevolacticus* sont particulièrement intéressants pour la production industrielle d'acide lactique:

- ils produisent un seul isomère de l'acide lactique, L(+) pour *B. coagulans* et D(-) pour *B. laevolacticus*.
- ils ont des besoins nutritionnels moins complexes que ceux observés chez des *Lactobacillus*, notamment *L. delbrueckii* qui

est utilisé dans la production industrielle d'acide lactique (Vick *et al.*, 1983 ; Major et Bull, 1989).

2.4.1.1. Production d'acide lactique par *Bacillus laevolacticus*

La production d'acide lactique par *Bacillus laevolacticus* a été étudiée en culture continue par Jan *et al.* (1990). Ces auteurs ont montré que *B. laevolacticus* constituait un matériel idéal avec lequel la production industrielle d'acide lactique pouvait être envisagé de manière rentable. Cette bactérie convertit complètement le glucose en acide D(-) lactique, même dans un milieu minimum. Le niveau de production obtenu par Jan *et al.* (1990) en culture continue était de 13 g.l⁻¹.h⁻¹ avec un milieu composé de 50 g/l de glucose et 5 g/l d'extrait de levure (pH 6) et un taux de dilution de 0,5 h⁻¹. Ils ont pu montrer que dans ces conditions de culture, *Bacillus laevolacticus* n'était inhibé dans son activité métabolique ni par la concentration en glucose ni par celle de l'acide lactique produit.

2.4.1.2. Production d'acide lactique par *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans fait l'objet d'exploitation industrielle pour la production d'acide lactique (Zukowski, 1992). Les conditions optimales de production d'acide lactique par *B. coagulans* (culture Batch) ont été mises en évidence par Payot *et al.* (1999). Ces travaux ont contribué à déterminer les conditions physicochimiques nécessaires à la production d'acide lactique chez cette bactérie. L'aération serait favorable à la croissance, mais inhiberait la production d'acide lactique. La concentration en glucose dans les fermenteurs jouerait un rôle important dans la conduite de la fermentation. Des concentrations de l'ordre de 120 g/l de glucose dans le milieu seraient inhibiteur pour la production d'acide lactique. Le mécanisme de cette inhibition a été proposé par Heriban *et al.* (1993), qui ont effectué des observations similaires. Selon ces auteurs, l'excès de glucose dans le milieu de fermentation serait couplé avec l'accumulation du fructose-6 phosphate dans les cellules, qui par un mécanisme de régulation inhiberait les voies de bioconversion du fructose-6 phosphate. Par rapport aux cultures continues, les cultures batch seraient mieux adaptées à la production d'acide lactique chez *B. coagulans* (Payot *et al.*, 1999). Des rendements de production de l'ordre de 55 g/l d'acide lactique ont été obtenus à partir de 60 g/l de glucose, soit 92% de bioconversion. D'autres produits de fermentation sont accumulés en quantité négligeable dans ces conditions (environ 2 g/l), il s'agit de l'acétate, du fumarate, du formate, du citrate, de l'éthanol et du pyruvate.

2.4.2. Rôle dans la production de bactériocine

Dans le groupe des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* connues, seule *B. coagulans* a été étudié pour sa capacité à produire une bactériocine appelée Coaguline. La production de la Coaguline par la souche *B. coagulans* I4 (isolée dans les fèces de vache) a été mise en évidence par Hyronimus *et al.* (1998). La Coaguline possède un large spectre d'action, agissant sur la croissance de la souche productrice, c'est-à-dire *Bacillus coagulans*, mais aussi, sur d'autres bactéries éloignées telles que *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Listeria* et *Pediococcus*. La Coaguline est exprimée par un plasmide de 3,5 Kb environ, appelé plasmide pI4. Les structures complètes de la Coaguline et du plasmide pI4 ont été déterminées par Le Marrec *et al.* (2000). La Coaguline est un peptide de 44 acides aminés, dont la structure primaire possède 100% de similarité avec celle des Pediocines AcH et PA-1, produites par différentes souches de *Pediococcus acidilactici*. Un seul acide aminé situé à l'extrémité C-terminale différencie la Pediocine de la Coaguline. La Coaguline est une bactériocine non lantibiotique (classe II des bactériocines).

2.4.3. Rôle dans les formulations probiotiques

Un certain nombre de travaux ont mis en évidence les performances probiotiques de *Bacillus coagulans* dans l'alimentation humaine et animale (Adami *et al.*, 1997 ; Adami et Cavazzoni 1999). *Bacillus coagulans* est généralement retrouvé dans ces formulations probiotiques sous l'appellation *Lactobacillus sporogenes* (Posenaer, 2000 ; Sandres *et al.*, 2003). Ce nom *Lactobacillus sporogenes* (qui n'existe dans aucune classification) est utilisé dans un but purement commercial pour dire aux utilisateurs qu'il s'agit d'une bactérie lactique (Sandres *et al.*, 2003). Le tableau 2.4, montre quelques produits probiotiques à base de spores de *B. coagulans*, destinés à la nutrition humaine et animale. L'utilisation de cellules sous forme de spores peut être intéressante dans les applications nécessitant des aliments formulés sous forme de granulés, comme c'est le cas dans l'élevage. Cavazzoni *et al.* (1998), ont démontré expérimentalement l'importance de l'ingestion de *B. coagulans* dans le maintien de la santé et dans le gain de poids chez le poulet.

Tableau 2.4 : Quelques produits commerciaux formulés avec *Bacillus coagulans* comme probiotique (adapté de Sandres *et al.*, 2003)

Noms des produits	Fabricants	Utilisations
Lactospore®	Sabinsa Corp., Piscataway, NJ	Humaine
Lacbon®	Uni-Sankyo	Humaine
Lactopure®	Pharma Medicare	Humaine et animale

CHAPITRE 3. LES PRINCIPES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION DES BACTÉRIES ACIDIFIANTES

3.1. Introduction

La recherche de ferments lactiques peut être réalisée dans une variété d'environnement. Les méthodes et milieux de cultures utilisés pour l'isolement de ces bactéries ont beaucoup évolués, pour devenir plus sélectives vis-à-vis des principaux genres retrouvés dans les environnements (Klein *et al.*, 1998). L'identification et la classification des bactéries acidifiantes sont réalisées selon les mêmes principes que ceux utilisés pour tous les autres micro-organismes, et suivant les recommandation de l'ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes). Dans ce chapitre nous traiterons de l'importance de l'approche polyphasique combinant plusieurs critères pour l'identification des bactéries. Un accent sera mis sur les critères susceptibles d'apporter des informations pertinentes pour la caractérisation et la classification des micro-organismes.

3.2. Critères de sélection d'un ferment acidifiant

Dans le milieu industriel, plusieurs critères sont utilisés dans le choix des ferments destinés à la production d'acide lactique ou aux formulations alimentaires (fermentations, probiotiques). Les principaux critères de choix d'une souche lactique sont : sa disponibilité en grande quantité, sa résistance aux procédés industrielles, son pouvoir acidifiant et ses propriétés fonctionnelles (dépendant évidemment des applications industrielles pour lesquelles ces bactéries sont destinées).

3.2.1. La production de biomasse pour ensemercer

Le premier critère de choix d'un ferment acidifiant réside dans la possibilité pour l'industriel de l'obtenir en grande quantité et de manière rentable (Chamba *et al.*, 1994). Les bactéries lactiques et apparentées ont pourtant de grandes exigences nutritionnelles, nécessitant souvent l'utilisation de facteurs de croissance spécifique. Leurs taux de croissance sont par contre très bons dans ces milieux et de très fortes densités cellulaires peuvent être obtenues dans les cultures (Lejard *et al.*, 1994). Les bactéries acidifiantes appartenant au genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* ont l'avantage de ne pas nécessiter de milieux complexes pour leur croissance, mais leur sporulation pose de nombreux problèmes (Nakayama et Yanoshi, 1967b). Les travaux de Doores et Westhoff (1981), ont montré que les *Sporolactobacillus* produisaient environ 10^2 à 10^3 CFU/ml de spores, ce qui est de loin inférieur aux valeurs de 10^9 à 10^{10} CFU/ml qu'on

peut retrouver dans les cultures semi-industrielles de *Bacillus subtilis* (NDir, 2002). *B. coagulans*, *B. racemilaticus* et *B. laevolacticus* possèdent des rendements de sporulation plus importants que ceux des *Sporolactobacillus* (Nakayama et Yanoshi, 1967a et b).

3.2.2. La tolérance aux procédés industriels

Après la production des biomasses, le second critère de choix d'une souche acidifiante est lié à sa résistance aux conditions environnementales entourant les procédés de production, de conservation, et de formulation industriels (Chamba *et al.*, 1994). Les bactéries montrent des aptitudes variables à la conservation (Sow-Legrand 2004). Les coques et bacilles de petites tailles (*Lactococcus*, *Streptococcus*, et certains *Lactobacillus*) sont plus résistants à la lyophilisation par comparaison aux bacilles de grande taille (*L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* *etc.*). Certaines dispositions telles que l'utilisation de cryoprotecteurs (glycérol, magnésie, attapulгите, *etc.*) peuvent améliorer la survie des bactéries au cours des traitements de congélation et de lyophilisation (Aguilera et Karel, 1997). La plupart des paramètres fondamentaux impliqués dans l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales, notamment la chaleur, la congélation et les chocs osmotiques sont connus. Selon certains auteurs dont Russell *et al.* (1995), il s'agirait d'une résistance liée à des modifications dans le profil des constituants membranaires, notamment les lipides et protéines. Selon d'autres auteurs dont O'Byrne et Booth (2002) et Sow-Legrand (2004), l'accumulation de solutés compatibles (tréhalose, proline, bétaïne, carnitine, *etc.*), dans le cytoplasme des bactéries participerait à la résistance aux chocs osmotiques et à la conservation des bactéries.

3.2.3. Matériaux couramment utilisés pour la recherche de bactéries acidifiantes

Les matériaux le plus souvent utilisés pour l'isolement des ferments acidifiants sont les produits alimentaires fermentés (lait, viande, poisson, fruit, *etc.*), les aliquotes de suc digestif, les matériaux environnant les animaux et les plantes (Doores et westhoff, 1983 ; Claus et Berkeley, 1986 ; Kandler *et al.*, 1986 ; Klein *et al.*, 1998). Des matériaux spécifiques sont souvent prélevés dans des environnements pour sélectionner des bactéries ayant des comportements particuliers, notamment la capacité d'utiliser certains substrats tels que le xylane, l'amidon, la mélasse, les F.O.S (fructooligosaccharides), *etc.*, (Chamba *et al.*, 1994), ainsi que pour la résistance à certains types de stress (Sow-Legrand, 2004).

3.2.4. Milieux de culture favorables à l'isolement des bactéries acidifiantes

Selon Amann *et al.* (1995), le nombre de micro-organismes cultivables à partir d'un échantillon de l'environnement est de loin inférieur au nombre de cellules dénombrées dans ce même échantillon par microscopie. Les milieux de culture étant par définition sélectifs, ils représentent une importante source de biais quand ils sont utilisés pour étudier la diversité microbienne (Chamba *et al.*, 1994). La mise au point de milieu plus sélectif est souvent rendue difficile par la sensibilité des bactéries aux inhibiteurs les plus efficaces (Chamba *et al.*, 1994). Les milieux le plus souvent utilisés dans l'isolement des bactéries acidifiantes (acide lactique), sont les milieux M17, MRS, MSE, et GYP (Chamba *et al.*, 1994) dont les spécificités et les compositions sont données dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1: Milieux utilisés pour la sélection et la culture des bactéries lactiques

Milieux	Spécificités
MRS	pour l'isolement des <i>Lactobacillus</i> et <i>Pediococcus</i> . Pour l'isolement de souches halophiles, ce milieu est complété de 4 à 6% de NaCl. La spécificité de ce milieu peut être améliorée soit par l'ajout de 2 g/l d'acide sorbique pour l'inhibition des bactéries acétique, soit avec de 50 mg/l d'actidione et 2 g/l d'acide sorbique pour l'inhibition des levures.
M17	ou milieu de Terzaghi, pour les Streptocoques et <i>Lactocoques</i> . La spécificité de ce milieu peut être amélioré par l'ajout de 0,2 g/l d'azide de sodium ou 0,5 g/l d'acétate de thallium (Guiraud 1998).
MSE	(Mayeux-Sandine-Elliker) pour l'isolement des <i>Leuconostoc</i> . Le milieu MSE est rendu spécifique des <i>Leuconostoc</i> par sa concentration en saccharose (10%) et la présence de citrate et d'azide de sodium.
GYP	pour la sélection des bactéries lactiques appartenant aux genres <i>Sporolactobacillus</i> et <i>Bacillus</i> . La sélectivité de ce milieu peut être améliorée par un traitement thermique avant l'enrichissement (80°C pendant 10 min) et des conditions spécifiques d'incubation.
composition par litre	
MRS	10 g PC ; 10 g EV ; 5 g EL ; 20 g Glu ; 5 g AcN ; 2 g CT ; 2 g K ; 0,2 g Mg ; 50 mg Mn ; 1 g T
M17	2,5 g PC ; 2,5 g EL ; 5 g PS ; 2,5 g PV ; 5 g Lac ; 0,5 g AcA ; 19 g GpS ; 0,25 g Mg
GYP	10 g PC ; 10 g EL ; 10 g Glu ; 2 g K ; 0,4 g Mg ; 10 mg Mn ; 5 g Na
MSE	10 g Try ; 5 g EL ; 100 g Sac ; 1 g CNa ; 5 g Glu ; 2,5 g Ge ; 75 mg AzNa
<small>PC : peptone de caséine ; EL : extrait de levure ; Glu : glucose ; EV : extrait de viande ; PV : peptone de viande ; Try : tryptone ; Sac : Saccharose ; Lac : Lactose ; Mn : MNSO4 ; Mg : MGSO4 ; K : K2HPO4 ; T : Tween 80 ; AcN : Acétate de sodium ; CT : Citrate triammonique ; GpS : Glycerophosphate de sodium ; AcA : Acide ascorbique ; Na : NaCl ; CNa : Citrate de sodium ; Ge : Gélatine ; AzNa : Azide de sodium</small>	

3.3. La classification d'une nouvelle bactérie

3.3.1. Introduction

Il y a eu trois étapes importantes dans l'évolution des outils utilisés dans la caractérisation des micro-organismes isolés du milieu naturel (Sneath, 2001). La première fut l'analyse des besoins nutritionnels, qui a été pendant de longues années l'outil de

différentiation des micro-organismes. La seconde étape a concerné la différenciation des bactéries suivant les informations apportées par l'analyse de leurs constituants cellulaires, notamment les protéines et les acides gras. Depuis quelques années, la tendance est plutôt à l'analyse de la structure du génome. Mais, en fonction des impératifs propres à chaque situation, l'un ou l'autre de ces outils peut être utilisé (Curk *et al.*, 1994). Dans le souci d'aboutir à une classification homogène, il est toute fois recommandé de combiner plusieurs de ces outils tout en donnant une prédominance aux informations apportées par l'analyse des propriétés physiques et chimiques du génome. Une telle démarche est connue sous le nom de taxonomie polyphasique (Gillis *et al.*, 2001).

3.3.2. Pourquoi une approche polyphasique dans les travaux d'identification ?

La première approche moderne de taxonomie fut la taxonomie numérique (faisant appel à l'outil informatique), développée par Sneath en 1957, (Sneath, 2001). Cette approche consistait à étudier pour chaque bactérie, plusieurs caractères morphologiques, nutritionnels, structuraux etc., et à attribuer le même poids à chacun de ces caractères. Cette approche a eu beaucoup de succès, avant d'être confrontée à certaines divergences. Certains bactériologistes estimaient que tous les caractères analysés, ne pouvaient pas avoir le même poids. Ils donnaient ainsi leurs préférences à des caractères précis selon les micro-organismes étudiés. Plusieurs écoles de taxonomie se sont ainsi formées, avec chacune sa préférence pour tel ou tel système de classification. Le concept de la taxonomie polyphasique qu'on peut aussi appeler "taxonomie consensuelle" a été introduit en 1970 par Colwell (Gillis *et al.*, 2001), dans le but de mettre de l'ordre dans ces écoles, en trouvant un système susceptible d'avoir l'assentiment d'un maximum de bactériologistes (Euzéby, 2003). L'identification des bactéries par une approche polyphasique a l'avantage de regrouper des caractères phénotypiques et génétiques sans leur donner exactement le même poids, et de définir de manière précise le niveau taxonomique susceptible d'être atteint avec chacune des techniques (Grimont et Le Flèche, 2000), comme montré dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2 : Niveau de résolution de quelques techniques utilisées en taxonomie polyphasique (adapté de Gillis *et al.*, 2001).

TECHNIQUES	Famille	Genre	Espèce	Souche
Profil électrophorétique des protéines				
Profil des acides gras de paroi				
PCR-RFLP du génome				
Hybridation ADN-AND				
G+C % du DNA				
Séquençage de l'ARN 16S				
ARDRA				
AFLP, RAPD, AP-PCR, rep-PCR				
Structure de la paroi cellulaire				

3.3.3. Les outils de la taxonomie polyphasique

L'unité de base de la taxonomie moderne est l'espèce (Sneath, 2001). Dans la taxonomie phylogénétique, la définition de l'espèce bactérienne est basée sur les propriétés physiques et chimiques du matériel génétique. Les propriétés phénotypiques ne sont prises en compte dans ce système qu'après l'analyse du contenu génomique (Euzéby, 2003). Plusieurs outils génétiques sont utilisés en taxonomie polyphasique, dont : les ADN totaux (G+C%, ADN-ADN, PFGE, DGGE...), les fragments d'ADN (ARDRA, RAPD, ADNr 16S, AFLP, ...) et les ARN ribosomiaux. Tous ces outils sont nécessaires mais pas indispensables pour la définition d'une espèce. Par contre deux de ces outils génétiques ont été recommandés par l'ICSPP, pour la description de toutes les nouvelles bactéries (Stackebrandt et Goebels, 1994). Il s'agit de la composition en guanine et cytosine (G+C%) de l'ADN total et du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

3.3.3.1. G+C % de l'ADN génomique total

Le G+C % est la première particularité de l'ADN génomique exploitée en taxonomie moléculaire (Marmur et Doty, 1962). Le G+C % est constant pour tous les individus d'une souche donnée et varie significativement d'une espèce à l'autre. Dans le genre *Bacillus*, le G+C % des différentes espèces varie de 32% à 69%, et dans le genre *Sporolactobacillus* il varie de 38% à 40%.

Le G+C % est calculé par l'équation : $G + C = 2,44T_{m(1)} - 169,3$ (De Ley, 1970), ou $T_{m(1)}$ représente la valeur moyenne de la courbe de dénaturation de l'ADN total.

La valeur du G+C % a un caractère d'exclusion, car elle permet seulement de conclure que deux souches n'appartiennent pas à une même espèce. Deux souches ayant le même G+C% ne sont pas forcément semblables parce que cette valeur ne prend pas en compte l'alignement linéaire de leur molécule d'ADN.

Définition de l'espèce bactérienne selon le G+C % : des souches dont les valeurs de G+C % sont différentes de plus de 5% ne peuvent pas appartenir à la même espèce (Curk et al., 1994).

3.3.3.2. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

Les gènes codant pour les ARNr 23S, 16S et 5S représentent 0,3 à 0,4 % de l'ADN génomique bactérien (Dellaglio *et al.*, 1994). L'intérêt de ces fragments d'ADN en taxonomie polyphasique, réside dans la présence, dans leurs structures de régions hypervariables (séquences changeant de structure de manière aléatoire) et de régions très conservées (Fox *et al.*, 1997). L'ICSP recommande la publication de la séquence des ADNr 16S de toutes les nouvelles bactéries mises en collection (Stackebrandt *et al.*, 2002). Il existe à travers le monde des catalogues d'ADNr 16S, permettant de comparer la séquence de l'ADNr 16S de tout nouvel isolat avec celles des souches connues (EMBL en Europe, DDJB au Japon, GenBank au USA).

Sur la base des séquences des ADNr 16S, une définition opérationnelle a été donnée au genre bactérien par Wayne *et al.* (1987).

- *Définition du genre bactérien : Selon Wayne et al. (1987) toutes les espèces appartenant à un même genre doivent avoir entre elles un pourcentage d'homologie de leur ADNr 16S supérieur à 90 %.*

Stackebrandt et Goebels (1994), ont effectué l'alignement des séquences des gènes des ARNr 16S de plusieurs bactéries appartenant à une même espèce, et ont travaillé ainsi avec plusieurs espèces bactériennes différentes. Ce travail a permis de faire ressortir d'importantes observations sur la diversité des ADNr 16S des souches appartenant à une même espèce, et de donner une définition à l'espèce bactérienne.

- *Définition de l'espèce bactérienne: Selon Stackebrandt et Goebels (1994), des souches qui n'ont pas au moins 97% d'homologie de séquence au niveau du gène codant pour leurs ARNr 16S n'ont aucune probabilité d'appartenir à la même espèce.*
-

3.3.3.3. Les homologues ADN-ADN

L'idée d'utiliser le test d'hybridation ADN-ADN pour différencier et classer les bactéries a été apportée par Brenner *et al.* (1969). Cette technique a apporté une définition génomique à l'espèce bactérienne (Wayne *et al.*, 1987). La technique de l'hybridation ADN-ADN, consiste à déterminer le degré de réassociation entre ADN simples brins totaux de deux souches A et B. Le pourcentage de réassociations hétérogènes est calculé en se référant à la formation d'hétéroduplex (brin de la souche A + brin de la souche B). La quantité d'hétéroduplex formés et leurs stabilités thermiques étant fonction du degré de ressemblance des deux génomes. Le degré de réassociation est calculé par la différence de stabilité thermique (ΔT_m) entre les homoduplex et les hétéroduplex.

$$\Delta T_m = T_m \text{ (homoduplex)} - T_m \text{ (hétéroduplex)}$$

Deux définitions opérationnelles ont été données par Stackebrandt et Goebels (1994), au genre et à l'espèce bactérienne selon les taux de réassociation des ADN simples brins totaux.

- Définition du genre: Si le degré d'homologie d'ADN-ADN de deux souches est compris entre 30% et 65%, c'est que ces deux souches appartiennent à un même genre.
- Définition de l'espèce: Deux souches appartiennent à une même espèce, si elles ont entre elles un degré d'homologie ADN-ADN supérieur à 70%.

3.3.3.4. Quelques caractères structuraux dans la taxonomie polyphasique

3.3.3.4.1. Profils des protéines cellulaires totales.

Les protéines cellulaires constituent une source riche d'informations pour la caractérisation des souches isolées de la nature (Fulele, 1999). Les cellules bactériennes synthétisent plusieurs milliers de protéines différentes qu'on retrouve dans le revêtement cellulaire et dans le cytoplasme (Kämpfer, 1995). Ces protéines sont l'expression du matériel génétique, et leur composition est fonction de l'état physiologique dans lequel se trouve les cellules. Il existe des méthodes standardisées pour la caractérisation du protéome des bactéries, allant de la culture à la séparation du mélange en passant par l'extraction des protéines. Dans les gels (PAGE et SDS-PAGE) bidimensionnels, la séparation des mélanges protéiques donne un électrophoregramme ou profil protéique dans

lequel chaque bande est constituée de plusieurs protéines de structures différentes, mais de mobilités électrophorétiques identiques (Curk *et al.*, 1994). Des programmes informatiques (ex : Gelcompar) permettent d'analyser les profils protéiques obtenus sur les gels de polyacrylamide et de déterminer les positions taxonomiques des nouvelles bactéries.

3.3.3.4.1. Profils des acides gras cellulaires

La composition en acides gras des cellules bactériennes est très stable et fortement conservée au sein des groupes taxonomiques (Welch, 1991). Un nombre important de type d'acides gras peut être retrouvé dans la structure des bactéries, souvent en relation avec les conditions environnementales (Sow-Legrand, 2004). Certains acides gras sont considérés comme des marqueurs génétiques. C'est le cas de l'acide 11-12 méthylène octadécanoïque, appelé acide lactobacillique, caractéristique de la famille des *Lactobacillaceae* (Larpen, 2000). Les espèces du genre *Bacillus* sont caractérisées par la présence dans leur structure, d'acides gras à nombre impair d'atome de carbone et à chaîne ramifiée (Kaneda, 1963). Ces acides gras à chaînes ramifiées n'existent pas dans la structure des espèces du genre *Lactobacillus* (Curk *et al.*, 1994). La réalisation de l'analyse des acides gras totaux de la cellule, est intensivement utilisée pour la classification et l'identification des bactéries sporulantes (Arellano *et al.*, 2000). Des méthodes d'analyses rapides et automatisées (MIDI and inc, 2001), permettent des identifications rapides et bons marchés sur de grands nombres d'échantillons. Ces méthodes contribuent également à la création de banques de données (Vandamme *et al.*, 1996 ; Osterhout *et al.*, 1991).

3.3.3.5. Principe de calcul des distances d'homologie et de construction des dendrogrammes

La distance taxonomique correspond à la quantité de similitude existant entre deux ou plusieurs taxons. Les distances taxonomiques entre tous les individus d'une population pris deux à deux sont calculées grâce à l'indice de Jaccard-Sneath (1908). Dans le cas de deux souches A et B, l'indice de similitude (Sj) s'écrit :

$$Sj = \frac{a}{a + b + c}$$

a = caractères positifs chez A et B.
b = caractères positifs chez A et négatifs chez B
c = caractères négatifs chez A et positifs chez B.

Il existe de nombreux logiciels permettant d'effectuer ces calculs en combinant à la fois plusieurs caractères, et plusieurs souches. Ces logiciels permettent de construire des dendrogrammes

ressemblant à des arbres, suivant la méthode de Neighbor Joining (Saitou et Nei, 1987). Pour la construction de ces dendrogrammes, les indices (Sj) calculés sont d'abord rassemblés dans une matrice initiale de similarité en regroupant deux à deux les espèces les plus proches. Puis une matrice finale est construite en prenant en compte la divergence moyenne de chacune des espèces avec les autres. Les arbres phylogénétiques sont construits à partir de la matrice de données initiales dans laquelle des tirages aléatoires avec remise sont réalisés. Les différentes topologies des arbres obtenus sont ensuite comparées et compilées en un arbre consensus. Dans les dendrogrammes, chaque souche étudiée est appelée unité taxonomique opérationnelle (OTU : operational taxonomic unit), et les plus petits embranchements sont appelés Clusters ou groupes d'homologies (Curk *et al.*, 1994).

CHAPITRE 4. LA SPORULATION CHEZ LES BACTÉRIES DU GENRE *BACILLUS*

4.1. Introduction

Dans certaines conditions de vie, notamment lorsque survient l'épuisement des sources de carbone et d'azote, certaines bactéries forment des spores leur permettant de survivre dans le milieu extérieur défavorable. La sporulation est le plus ancien des mécanismes de résistance observés chez les micro-organismes (Claus et Berkeley, 1986). La formation de spores n'est observée que chez quelques genres bactériens, dont les *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosacina*, *Oscillospira*, *Sporolactobacillus*, *Desulfotomaculum* etc. (Claus et Berkeley, 1986). Depuis 1950, la formation des spores dans le genre *Bacillus* sert de référence pour l'étude de la différenciation des organismes procaryotes (Losick *et al.*, 1986). Le séquençage du génome complet de *Bacillus subtilis* (espèce type des *Bacillus*), par Kunst *et al.* (1997), a apporté une contribution considérable à la compréhension des événements morphologiques, physiologiques, biochimiques et génétiques de la sporulation. Les spores sont des structures dormantes, morphologiquement et biochimiquement différentes des cellules végétatives. Le tableau 4.1, montre les principales propriétés biochimiques et morphologiques qui différencient les spores des cellules végétatives chez les *Bacillus*.

Tableau 4.1: Comparaison des principales propriétés différenciant les cellules végétatives et les spores de *Bacillus*, (adapté de Bontink, 1987)

Propriétés	Cellule végétative	Spore
Structure	Gram + (typique)	cortex, tunique, exosporium
Aspect microscopique	Non réfringent	Réfringent
Calcium	Faible teneur	Forte teneur
Acide dipicolinique	Absent	Présent
Poly β -hydroxybutyrate	Présence (facultative)	Absent
Polysaccharides	Beaucoup	Peu
Protéines	Peu	Beaucoup
Corps parasporal	Absence	présence facultative
Acides aminés soufrés	Peu	teneur élevée
Activité enzymatique	Elevée	Faible
Consommation en O ₂	Elevée (si aérobie)	Faible ou nulle
Synthèse de macromolécules	Présente	Absente
ARN messenger	Présent	Faible teneur ou nulle
Résistance à la chaleur	Faible	Élevée
Résistance aux radiations	Faible	Élevée
Résistance aux antiseptiques	Faible	Élevée
Colorabilité	Oui	Non (sauf coloration spéciale)
Action du lysozyme	Sensible	Résistance

Durant la sporulation, les cellules acquièrent une importante résistance aux conditions environnementales extrêmes, par la formation d'un cortex rigide protégeant le matériel nucléaire (figure 4.1). L'endospore d'un *Bacillus* est remarquable à la régularité de sa taille, à sa situation à l'intérieur de la cellule et à sa réfringence en microscopie en contraste de phase (figure 4.2).

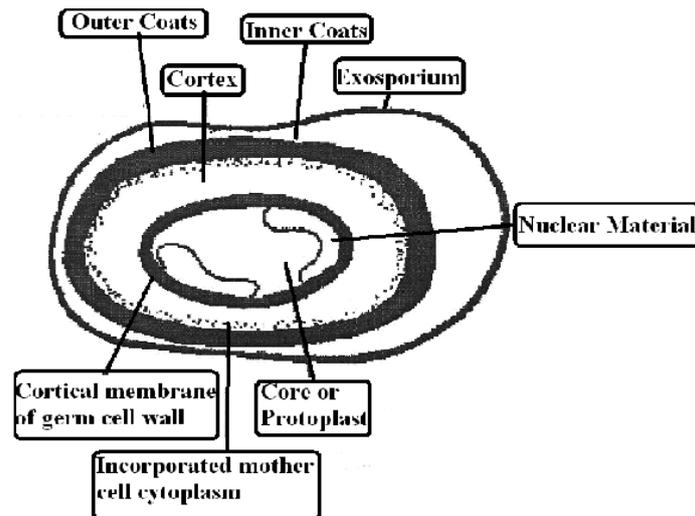


Figure 4.1: Structure d'une spore de *Bacillus* (adaptée de Prescott *et al.*, 2003). On peut observer la formation de nombreuses couches autour du matériel nucléaire, qui contribuent à le protéger des stress environnementaux.

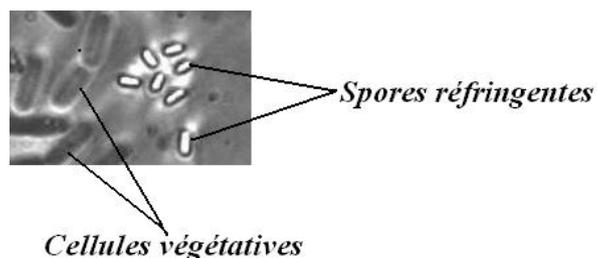


Figure 4.2: Réfringence des spores de *B. subtilis* observé au microscope en contraste de phase (Bayane, 2001)

La sporulation nécessite des conditions de cultures particulières et souvent spécifiques aux espèces étudiées (Claus et Berkeley, 1986). Dans certains cas, elle nécessite des milieux de cultures très spéciaux, de fabrication souvent difficile et des conditions environnementales contrôlées (température, oxygénation,

pH, présence de composés organiques particuliers, minéraux, etc.). La formation des endospores débute en fin de phase exponentielle de croissance, mais le temps nécessaire à la maturation des spores est peu connu et variable selon les souches et les conditions de cultures (Ryter A, 1965). Pour certaines souches de l'espèce *Bacillus subtilis* le temps nécessaire à la maturation des spores est estimé à 17 heures environ, mais pour d'autres espèces, il est beaucoup plus long (Claus et Berkeley, 1986).

4.2. Les événements majeurs de la sporulation des *Bacillus*

L'ensemble des événements intervenant dans la formation des spores a été étudié chez *Bacillus subtilis*. La sporulation commence par une phase d'initiation qui prépare la cellule à amorcer une longue série de changements génétiques, biochimiques et morphologiques. L'initiation et le développement de la sporulation requièrent plusieurs gènes de sporulation appelés gènes "Spo". Ce nom de gène est toujours associé à un chiffre romain représentant la phase du développement dans laquelle le gène intervient. C'est par exemple le cas de *Spo0* pour la phase 0 (initiation), *SpoII* pour la phase II, *SpoIII* pour la phase III, etc. Tous les gènes "Spo" de *Bacillus subtilis* ont été cartographiés et publiés dans le projet de séquençage du génome de *Bacillus subtilis* (kunst *et al.*, 1997). Bien que certains de ces gènes "Spo" affectent les propriétés des cellules végétatives, aucun d'entre eux n'est indispensable à la croissance des cellules végétatives (Alper, 1994). La sporulation des *Bacillus* peut être inhibée par certains composés chimiques, sans affecter la croissance des cellules végétatives. Il s'agit notamment de la nétropine et de la tylorone qui en se liant à l'ADN génomique bloquent la transcription des gènes de sporulation (Keilman *et al.*, 1976 ; Rhaese *et al.*, 1977). Le bromure d'éthidium, l'acridine et la phénothiazine agissent eux dans l'inhibition de l'initiation à la sporulation en s'intercalant entre les brins d'ADN (Burke et Spizizen, 1977).

4.2.1. L'initiation de la sporulation

Le déclenchement de la sporulation requiert au moins sept gènes *spo0*. Selon Alper (1994), une mutation dans un seul de ces gènes entraîne le blocage des événements associés à l'initiation de la sporulation. Chez *Bacillus subtilis* le processus de formation de l'endospore débute par la phosphorylation du facteur transcriptionnel Spo0A (figure 4.3). Cette phosphorylation est en fait la dernière étape d'une série de réaction de phosphorylation et de déphosphorylation utilisant principalement des kinases (Kin A, B, C, D et E). Ces kinases sont à l'origine de l'activation du premier maillon de cette chaîne qui est la protéine Spo0F. Une

phosphotransférase appelée Spo0B intervient ensuite pour transférer le phosphate de Spo0F vers Spo0A qui devient ainsi actif pour l'initiation génétique de toutes les étapes devant conduire à la formation de l'endospore. Cette étape d'initiation est très importante, car dans plusieurs cas d'inhibition de la sporulation, c'est là que les cellules sont bloquées (Hoch, 1993). Grossman et Losick (1988), ont montré que chez *Bacillus subtilis*, cette étape de phosphorylation se déroulait suivant un mécanisme plus complexe que ce qu'on imaginait, puisque des signaux moléculaires extracellulaires appelés "sporogen" intervenaient dans le contrôle de cette série de phosphorylation (figure 4.4). La nature de ces signaux moléculaires est maintenant connue: il s'agit de peptides extracellulaires appelés phéromones de "quorum sensing".

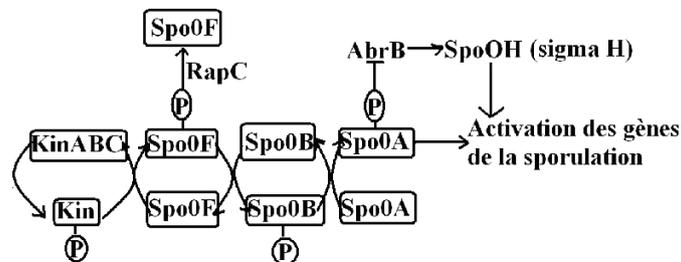


Figure 4.3: Mécanisme schématisé des différentes étapes intervenant dans l'activation du facteur transcriptionnel Sigma H via la phosphorylation de la protéine Spo0A (d'après Stephens, 1998).

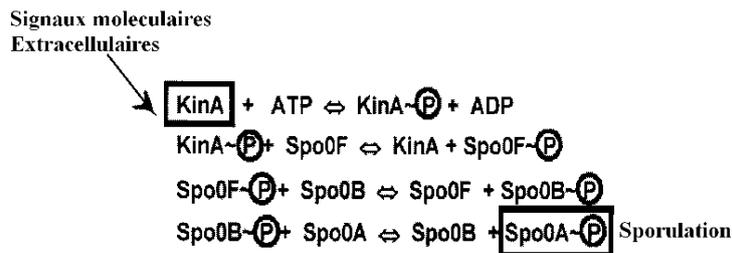


Figure 4.4: Les réactions biochimiques conduisant à la phosphorylation de Spo0A sous l'action des signaux extracellulaires de quorum sensing (autre fois appelée facteur «sporogen»).

4.2.2. Les événements morphologiques, biochimiques et génétiques de la sporulation

Une fois la protéine Spo0A phosphorylée, la transformation de la cellule végétative en spore peut commencer (Losick *et al.*, 1986). Il se succède alors une multitude d'événements morphologiques, biochimiques et génétiques dont les points saillants seront décrits.

4.2.2.1. Principaux événements morphologiques et biochimiques

Chez les espèces du genre *Bacillus*, le développement morphologique de la spore commence par la duplication de l'ADN génomique, conduisant à la formation d'une cellule à deux chromosomes identiques. Ces deux chromosomes sont ensuite répartis de manière asymétrique entre deux compartiments inégaux. Un mécanisme d'endocytose permettra au plus petit de ces compartiments de devenir une organelle appelée **présore**, le plus grand compartiment engendrera lui la **cellule mère** (Losick *et al.*, 1986). La cellule évoluera dans cet état morphologique jusqu'à ce que la présore devienne mature en acquérant les capacités de résistance aux conditions extrêmes avant d'être relâchée dans le milieu extérieur sous forme libre : **spore**. Sur la base de ces changements morphologiques, la sporulation chez les *Bacillus* a été divisée en sept phases (Figure 4.5).

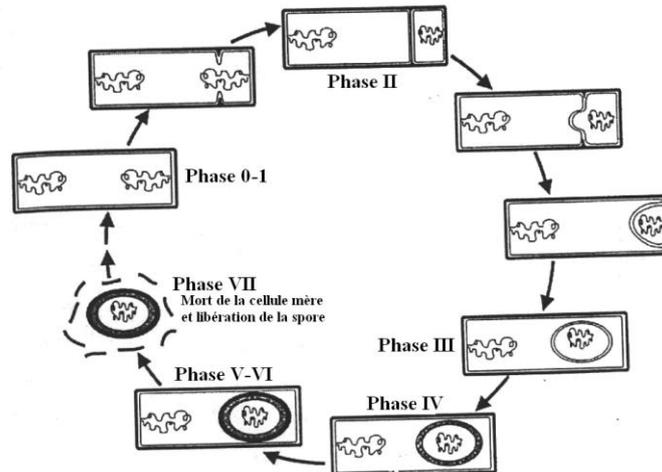


Figure 4.5: Principaux événements morphologiques intervenant dans la sporulation des *Bacillus* (adaptée de Stragier et Losick, 1996).

La phase 0 : Ce stade représente une cellule végétative qui n'est pas encore entrée dans la voie de sporulation, mais comporte deux copies de chromosome dans son cytoplasme.

La phase I : L'entrée en sporulation est caractérisée par la formation du filament axial dans lequel deux chromosomes, suite à la réplication de l'ADN, sont alignés le long de l'axe longitudinal de la cellule. Pendant cette phase, la cellule développe une importante activité métabolique avec la synthèse de nombreux composés extracellulaires (amylases, protéases, RNases, antibiotiques, etc.). En ce moment, les protéines FtsZ, responsables de la position médiane du septum lors de la croissance végétative, changent de position et viennent se localiser à des sites près des extrémités de la cellule (Levin et Losick, 1996). Ce processus est sous le contrôle du gène *SpoOA*.

La phase II : Ce stade du développement morphologique correspond à la formation du septum qui se fixe à l'une des deux extrémités de la cellule, à l'emplacement des protéines FtsZ. La formation et la localisation du septum sont contrôlées par un facteur transcriptionnel appelé sigma H (σ^H). Le septum divise la cellule en un large compartiment qui représente la cellule mère et un petit compartiment qui représente la future spore. Chacun de ces compartiments contient un chromosome. Les deux cellules collaborent par l'activation de facteurs transcriptionnels spécifiques (facteurs sigma).

La phase III : A ce stade, la membrane de la spore est complètement formée et détachée de celle de la cellule mère. La spore est complètement enveloppée par la cellule mère d'où le nom d'endospore.

Les phases IV à VI : Ces étapes correspondent à la maturation de l'endospore à travers la biosynthèse de structures membranaires autour de la spore. On assiste à la formation du cortex de la spore. C'est à cette étape que les spores acquièrent leur propriété de réfringence. Au microscope électronique, on observe une couche laminaire interne et une couche externe dense aux électrons autour de l'endospore. Autour de la membrane cytoplasmique de la spore se forme une fine couche de peptidoglycane qui constituera la paroi de la spore germinante. L'acide dipicolinique, spécifique aux spores est synthétisé à ce stade. C'est également au cours de ces étapes que la spore développe sa résistance aux solvants organiques comme l'octane et le chloroforme qui détruisent rapidement les cellules végétatives. La spore acquiert également une résistance à la chaleur.

La phase VII : C'est le stade terminal du processus de formation de la spore. À ce stade la spore est libérée par lyse de la cellule mère. Cette étape du développement de la sporulation est contrôlée par un facteur transcriptionnel appelé sigma k (σ^K).

4.2.2.2. Principaux évènements génétiques

L'initiation et le développement de la sporulation chez les espèces du genre *Bacillus* sont le résultat de l'expression séquentielle d'une centaine de gènes. Selon Grossman (1995), environ 125 gènes

participent à la régulation de la sporulation chez *Bacillus subtilis*. L'accumulation de la protéine Spo0A~P (phosphorylée) active au moins sept gènes qui contrôlent l'entrée en sporulation et la transition entre la cellule mère et la préspore, dans lesquelles les transcriptions de gènes sont régulées différemment (Hoch, 1995). Durant ce processus, plusieurs signaux intracellulaires permettront à la préspore et à la cellule mère de communiquer. Chacune de ces deux entités enverra à l'autre des messages chimiques lui permettant de passer à l'étape suivante de son développement (figure 4.6). L'enchaînement de ces étapes est contrôlée par une cascade de facteurs transcriptionnels appelés "facteurs sigma : σ " (Hughes et Mathee, 1998). Les facteurs sigma confèrent à l'ARN polymérase la capacité de reconnaître chaque fois de nouvelles classes de promoteurs. Chaque facteur sigma est associé à son facteur antagoniste appelé facteur anti-sigma (**anti- σ**). L'activité du facteur **anti- σ** est régulée par l'action d'un facteur **anti-anti- σ** . Chacun de ces facteurs apparaît d'abord sous une forme inactive, son activation étant ensuite assurée par des mécanismes complexes, à un moment précis du développement de la cellule, dans la préspore ou dans la cellule mère. Cinq facteurs transcriptionnels interviennent dans l'initiation et le développement de la sporulation chez *Bacillus subtilis*, σ^H , σ^E , σ^F , σ^G et σ^K (tableau 4.2). Les quatre premiers de ces facteurs σ sont nécessaires à la formation et à la maturation de la spore (σ^H , σ^E , σ^F et σ^G), le cinquième facteur (σ^K) intervient lui dans la mort de la cellule mère et la libération de la spore (Kroos *et al.* 1999).

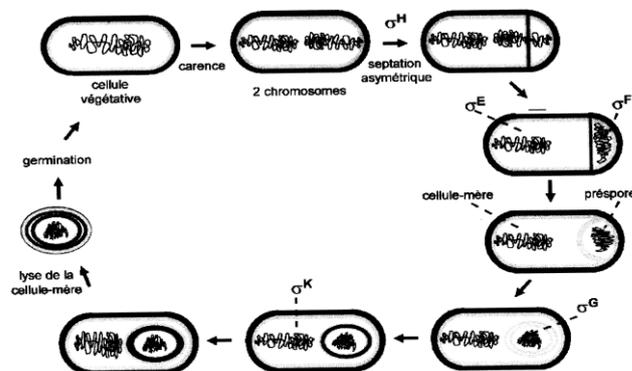


Figure 4.6: Régulation de la transcription des gènes de sporulation par les facteurs transcriptionnels (σ). Le compartiment de la cellule où chacun des cinq facteurs sigma intervient dans la sporulation est montré sur la figure.

Les événements génétiques de la sporulation commencent par la transcription du gène *Spo0H* sous le contrôle de la protéine Spo0A phosphorylée. *Spo0H* code pour le premier facteur transcriptionnel

de la sporulation c'est à dire σ^H . Le facteur σ^H conduira à l'expression de l'opéron *SpoIIA* qui joue un rôle déterminant dans la transcription et l'activité des autres facteurs transcriptionnels de la sporulation. Cet opéron est composé de trois gènes *SpoIIAA*, *SpoIIAB* et *SpoIIAC*. Le gène *SpoIIAC* code pour la synthèse de σ^F qui s'exprime à la fois dans la spore et la cellule-mère. Le gène *SpoIIAB* code pour un **anti- σ^F** et le gène *SpoIIAA* code pour un facteur anti-*SpoIIAB* (**anti-anti- σ^F**). Une fois exprimé à partir du promoteur σ^H , σ^F transcrit l'opéron *SpoIIAA-SpoIIAB-SpoIIAC* et l'opéron *SpoIIIG* (codant pour le facteur σ^G). Dans la cellule mère *SpoIIAB* se liera à σ^F et σ^G pour empêcher l'expression des gènes dépendant de ces facteurs transcriptionnels (Ducan *et al.*, 1995 ; Hoch, 1993). Dans la spore, l'activité de σ^F est sous le contrôle d'une sérine phosphorylase appelé SpoIIE, qui est nécessaire pour la formation du septum séparant la cellule-mère de la préspore. La serine phosphorylase SpoIIE est antagoniste de l'activité de phosphorylation de *SpoIIAB* sur *SpoIIAA*. *SpoIIAA* non phosphorylée pourra se lier à *SpoIIAB* pour empêcher son interaction avec σ^F . Ce qui permettra la transcription des gènes nécessaires à la sporulation (Hofmeister *et al.*, 1995 ; Hoch, 1995).

Tableau 4.2: Principaux facteurs transcriptionnels (σ) de la sporulation de *Bacillus subtilis* (adapté de Pottathil et Lazazzera, 2003)

Facteurs sigma	gènes	Fonctions
σ^{43} , σ^A	<i>rpoD</i> , <i>sigA</i>	Principal facteur sigma
σ^B	<i>sigB</i>	rôle inconnu
σ^D	<i>sigD</i>	Transcription des gènes de flagellation
σ^E	<i>sigE</i> (<i>spoIIGB</i>)	Contrôle de la transcription dans la cellule mère
σ^F	<i>sigF</i> (<i>spoIIAC</i>)	Contrôle de la transcription dans la préspore
σ^G	<i>sigG</i> (<i>spoIIIG</i>)	Contrôle de la transcription dans la préspore
σ^H	<i>sigH</i> (<i>Spo0H</i>)	Transcription du premier gène de sporulation
σ^K	<i>sigK</i> (<i>spoIVCB-spoIIIC</i>)	Impliqué dans la mort de la cellule mère

Le nom entre parenthèse correspond à l'ancien nom par lequel le gène était désigné.

4.3. Les signaux extracellulaires de la sporulation

4.3.1. Introduction

La cellule bactérienne est un organisme indépendant, capable d'assurer seul, toutes les fonctions nécessaires à sa survie (nutrition, reproduction etc.). Cependant, on observe que dans certaines conditions, des cellules microbiennes appartenant à une même population coordonnent leur comportement pour exécuter ensemble une seule et même fonction (Lazazzera et Grossman, 1998 ; Bonnie, 1999 ; Lazazzera, 2000). Ce type de régulation des fonctions métaboliques chez les êtres unicellulaires est connue sous le nom

« *quorum sensing* » ou sensation de seuil de biomasse. Selon ce concept, les cellules sont capables de percevoir l'évolution de la densité de leur population grâce à des signaux moléculaires de communication intercellulaire et d'adapter leurs comportements aux besoins de la population (limitation de croissance en cas de carence nutritionnelle ou production de substance inhibitrice en cas de danger).

4.3.2. Bref historique de la découverte du *quorum sensing*

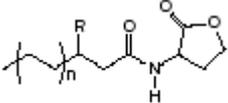
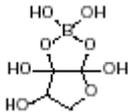
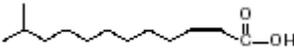
Selon Ruimy *et al.* (2004), l'hypothèse du phénomène de *quorum sensing* a été proposée la première fois dans les années 70, par J.W. Hastings et ses collaborateurs, en étudiant la bioluminescence d'une bactérie marine : *Photobacterium fischeri* (autrefois *Vibrio fischeri*). Dans la mer, *Photobacterium fischeri* vit en symbiose dans les organes de certains poissons tel que le calamar. Hastings avait observé que les cultures de cette bactérie n'émettaient la luminescence sur le calamar que lorsque les populations cellulaires avaient atteint une forte densité. Dans les organes du calamar, la luminescence n'apparaît en effet que lorsque la concentration cellulaire de *P. fischeri* atteint des seuils de l'ordre de 10^{10} à 10^{11} CFU/g de matière. Cette luminescence est profitable au calamar puisqu'elle lui permet d'échapper à ses prédateurs. Les hypothèses d'une auto-induction et d'une communication cellulaire avaient alors été proposées par Hastings pour expliquer ce phénomène. Cette hypothèse a malheureusement été acceptée avec beaucoup de scepticisme et un grand désintérêt par la communauté scientifique. Ce n'est que dans les années 80 que les molécules responsables de l'induction de la luminescence chez *Photobacterium fischeri* ont été isolées et caractérisées (Engebrecht *et al.*, 1983). La molécule de communication intercellulaire intervenant dans la luminescence de cette bactérie est une homosérine lactone (AHL), appelée *3-oxo-N-(tetrahydro-2-oxo-3-furanyl) hexanamide* ou *3-N-(OxoHexanoyl) homoserine lactone*. Le mécanisme d'action de cette molécule sur la luminescence a été détaillé dans plusieurs travaux qui ont confirmé l'hypothèse du *quorum sensing* proposée par Hastings (Kaplan *et al.*, 1985 ; Fuqua *et al.*, 1994). Les gènes impliqués dans le *quorum sensing* de *Photobacterium fischeri*, c'est-à-dire *LuxR* et *LuxI*, ont été isolés et analysés par Engebrecht *et al.* (1983). Ainsi, on sait que la synthèse des AHL est sous le contrôle du gène *LuxI*. Lorsque la concentration des AHL dans le milieu extérieur devient importante, les AHL pénètrent dans les cellules par la voie de transporteurs membranaires et se combinent à la protéine *LuxR* (dont la synthèse est contrôlée par le gène *LuxR*). Le complexe AHL/*LuxR* formé devient activateur d'une part de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des protéines de la

luminescence et d'autre part de la transcription du gène *LuxI* qui synthétisera alors plus d'autoinducteur.

Devant la description détaillée de ce mécanisme, la communauté scientifique a été obligée d'admettre l'existence du *quorum sensing*, mais elle a souligné que le système était limité à quelques bactéries marines (Ruimy *et al.*, 2004).

C'est seulement dans les années 90 que l'opinion des scientifiques concernant le *quorum sensing* a changé, lorsque plusieurs travaux ont permis de découvrir des systèmes d'induction similaires chez plusieurs bactéries Gram positives et Gram négatives (Whitehead *et al.*, 2001) ainsi que chez certaines cellules eucaryotes (Palkova et Forstova, 2000 ; Hornby *et al.*, 2001 ; Ramage *et al.*, 2002). Les molécules identifiées dans le *quorum sensing* sont des homosérines lactones (AHL) pour les bactéries Gram négatives (Bonnie, 1999; Jan *et al.*, 2001) et des oligopeptides pour les bactéries Gram positives (Lazazzera et Solomon, 1997 ; Lazazzera et Grossman, 1998 ; Kuipres *et al.*, 1998). Chez les cellules eucaryotes, les molécules utilisées dans le *quorum sensing* sont diversifiées, chez *Candida albicans* par exemple il s'agit de l'acide farnesoïque qui contrôle l'expression du dimorphisme cellulaire et de la virulence (Shchepin *et al.*, 2003).

Tableau 4.4: Structures moléculaires et fonctions des phéromones de *quorum sensing* identifiées dans le développement de quelques organismes eucaryotes et procaryotes (adapté de Zhang et Dong, 2004).

Organismes	Structure de la molécule signale	Activité biologique
<i>Photobacterium fischeri</i>		Bioluminescence
	N-acyl-homoserine lactone (AHL)	
<i>Bacillus subtilis</i>	Glu-Arg-Gly-Met-Thr ERGMT(CSF)	Sporulation et compétence génétique
<i>Candida albicans</i>		Dimorphisme et virulence
	Acide farnesoïque	
<i>Vibrio harveyi</i>		Virulence
	Furanosylborate (AI-2)	
<i>Xanthomonas campestris</i>		Virulence
	Acide methyl-dodecanoïque (DSF)	

Le *quorum sensing* intervient dans l'induction d'activités aussi importantes que la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* (résistance à l'érythromycine), le développement de la compétence (habilité à incorporer du matériel génétique exogène) chez *Bacillus subtilis* et *Enterococcus faecalis*, la sporulation chez certains *Bacillus* et *Clostridies*, la régulation de la virulence (*Staphylococcus aureus*) ; la production de bactériocine chez *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, et *Lactobacillus sake* (tableau 4.3 et 4.4) .

Tableau 4.5: *Quorum sensing* chez les bactéries Gram négatives

Micro-organismes	Molécules signales	fonctions
<i>Vibrio fischeri</i> ¹	N-(3-oxohexanoyl)-HSL	Bioluminescence
<i>Aeromonas salmonicida</i> ²	N-butanoyl-HSL	Production de protéase
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ³	N-(3-oxooctanoyl)-HSL	Conjugaison, transfert de plasmide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁴	N-(3-oxododecanoyl)-HSL	Formation de biofilm, virulence
<i>Escherichia coli</i> ⁵	inconnue	Réplication de chromosome
<i>Salmonella typhimurium</i> ⁶	inconnue	Expression de plasmide de virulence
<i>Serratia liquefaciens</i> ⁷	N-butanoyl-HSL	Différenciation cellulaire, exoprotéase
<i>Yersinia enterocolitica</i> ⁸	N-hexanoyl-HSL	Inconnue
<i>Vibrio anguillarum</i> ⁹	N-(3-oxodecanoyl)-HSL	Inconnue

¹ Eberhard *et al.* (1981) ; ² Swift *et al.* (1997) ; ³ Zhang *et al.* (2004) ; ⁴ Davies *et al.* (1998) ; Pearson *et al.* (1994) ; ⁵ Garcia-Lara *et al.* (1996) ; ⁶ Ahmer *et al.* (1998) ; ⁷ Givskov *et al.* (1997) ; ⁸ Throup *et al.* (1995) ; ⁹ Milton *et al.* (1997)

Tableau 4.6: *Quorum sensing* chez les bactéries Gram positives

Micro-organismes	Molécules signales	Fonctions
<i>Bacillus subtilis</i> ²	Pentapeptides (ERGMT)	Sporulation et compétence
<i>Myxococcus</i> ¹	Mélange d'acide aminé	Sporulation et biofilm
<i>Dictyostelium discoideum</i> ¹	Glycoprotéine de 80kD	Sporulation et biofilm
<i>Clostridium perfringens</i> ³	Peptide inconnu de 1-5 kD	Sporulation
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ⁵	Octapeptide (DSVCASYF)	Virulence
<i>Lactococcus lactis</i> ⁴	Peptide (nisRK)	Production de la Nisine
<i>Lactobacillus sake</i> ⁴	Peptide (sapKR)	Production de la Sakacine
<i>Lactobacillus plantarum</i> ⁴	Peptide (plnBCD)	Production de la Plantaricine
<i>Carnobacterium piscicola</i> ⁴	Peptide (cnbKR)	Production de la Carnobacteriocine
<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	Peptides (LVTLVFV)	Transfert de plasmide
<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	Peptides (LFSLVLAG)	Transfert de plasmide
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ¹	inconnue	Compétence génétique
<i>Streptomyces coelicolor</i> ¹	inconnue	Sporulation

¹ Lazazzera et Grossman (1998) ; ²Pottathil et Lazazzera (2003) ; ³ Tseng et Labbé (2000) ; ⁴ Kuipers *et al.* (1998) ; ⁵ Otto *et al.* (1998)

4.3.3. Le *quorum sensing* dans la sporulation

Selon Lazazzera (2001), au moins sept phéromones de nature peptidique jouent des rôles déterminants dans le contrôle de l'entrée en phase stationnaire de *B. subtilis* (tableau 4.7). Ces phéromones sont des peptides d'approximativement 40 acides aminés, typiques des protéines exportées c'est-à-dire hydrophobes (Perego et Brannigan, 2001). Les cinq derniers acides aminés situés à l'extrémité C-terminale de ces phéromones sont suffisants pour obtenir l'activité des peptides entiers *in vivo* et *in vitro* (Lazazzera et Solomon, 1997 ; Perego et Brannigan, 2001 ; Leighton *et al.*, 2001).

Shih et Labbe (1996), ont mis en évidence une régulation du type *quorum sensing* dans la sporulation de *Clostridium perfringens*. Mais les molécules intervenant dans la sporulation de cette bactérie n'ont pas été mises en évidence, même si plusieurs de leurs propriétés physiques et chimiques ont été déterminées. Selon Shih et Labbe (1996), il s'agirait chez *C. perfringens* d'une molécule stable à la chaleur et à l'acidité, qui aurait une taille comprise entre 1000 et 5000 Da. Tseng et Labbe (2001), ont démontré que la taille de cette phéromone de *quorum sensing* était plutôt inférieure à 500 Da et qu'elle était résistante à l'action des protéases.

Tableau 4.7: Quelques phéromones de *quorum sensing* dans le développement de *Bacillus subtilis* (Lazazzera et Grosman, 2003).

Phéromone	Taille du peptide	Partie active C-terminale	Fonction
PhrA	44 aa	ARNQT	Régulation de l'activité de phosphatase transférase (RapA)
PhrC	40 aa	ERGMT (CSF)	Régulation de la RapC et du gène de compétence <i>ComA</i>
PhrE	44 aa	SRNVT	Régulation RapE
PhrF	39 aa	QRGMI	Régulation RapF
PhrG	38 aa	EKMIG	Régulation RapG
PhrI	39 aa	DRVGA	Régulation RapI
PhrK	40 aa	ERPVG	Régulation RapK

Les principales phéromones de *quorum sensing* intervenant dans la sporulation de *B. subtilis* sont les PhrA, PhrC et PhrE. On peut constater que l'activité de ces phéromones est toujours associée à celle d'une phosphatase transférase spécifique. Le facteur de sporulation ou CSF (Competence and Sporulation Factor) est issu de la maturation du PhrC.

4.3.3.1. Propriétés physicochimiques du facteur de sporulation (CSF) de *Bacillus subtilis*

Parmi les phéromones de *quorum sensing* de *Bacillus subtilis*, le CSF est celui qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux (Stephenson *et al.*, 2003). Les propriétés physico-chimiques fondamentales du CSF ont été mises en évidence la première fois par Waldburger *et al.* (1993). Ces auteurs ont montré que le CSF est produit par les cellules de *B. subtilis* durant la phase exponentielle de croissance. Ils ont aussi montré que le CSF était extractible dans l'eau et le méthanol, et insoluble dans l'éthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle. Le CSF de *B. subtilis* résiste aux traitements thermiques même de l'ordre de 120°C pendant 20 min et son activité n'est pas inhibée par l'action des protéases (protéinase K, chymotrypsine, pronase, etc.). L'une des informations les plus importantes apportées par les travaux de Waldburger *et al.* (1993), concerne la variabilité dans l'activité des facteurs de sporulation de différent *Bacillus* (appartenant à une même espèce ou à des espèces différentes). Ainsi, les CSF de la souche *B. subtilis* 168 sont actifs sur la sporulation de la souche *B. subtilis* BR151 mais le CSF de cette dernière n'est pas active sur la sporulation de la souche *B. subtilis* 168. Toujours selon Waldburger *et al.* (1993), le CSF de *B. cereus* est actif sur la sporulation de *B. subtilis*, mais pas l'inverse. Des observations similaires sur la variabilité du *quorum sensing* chez les espèces du genre *Bacillus* ont aussi été rapportées par Mandic-Mulec *et al.* (2003).

Les travaux de Waldburger *et al.* (1993), sont parvenus à une autre conclusion qu'il convient de signaler car ils se distinguent des autres travaux existant sur le *quorum sensing* de *B. subtilis*. En effet, suivant les conditions dans lesquelles ces chercheurs ont travaillé, le CSF isolé n'est actif sur la sporulation *in vitro* qu'en présence de concentrations de l'ordre de 40 µg/ml de proline ou d'arginine. Pourtant dans tous les autres travaux rencontrés le CSF est utilisé directement pour la sporulation sans qu'aucune complémentation ne soit nécessaire pour son activité.

La structure moléculaire du CSF de *Bacillus subtilis* a été déterminée par Solomon *et al.* (1996). Ces chercheurs ont produit le CSF à partir de la souche ROM186 de *B. subtilis*. Une souche ayant subi d'importantes mutations sur ses gènes *SpoIVC* et *SpoOK*. Ces mutations font de la souche ROM186 une bactérie incapable de sporuler, mais possédant une importante production de phéromones. En effet, une insertion ou une délétion dans la structure du gène *SpoOK* entraîne une importante production de CSF dans le milieu extracellulaire et une mutation dans la structure du gène *SpoIVC* entraîne un blocage complet de la sporulation (LeDeaux et Grossman, 1995 ; Solomon *et al.*, 1995). Pour l'extraction du CSF, *B. subtilis* ROM186 a été mise en culture dans un milieu minimum

composé de 1% (p/v) de glucose et 0,1% (p/v) de glutamate. Deux heures après le début de la phase stationnaire de croissance dans ce milieu, la culture a été séparée par centrifugation et le surnageant de culture a été récupéré puis séparé par chromatographie sur colonne à phase inverse de type C18. Le CSF extrait a été purifié par une série de chromatographie HPLC sur colonne C18 avant que la taille du peptide ne soit déterminée par spectrophotométrie de masse. Les travaux de Solomon *et al.* (1996), ont mis en évidence la présence d'un oligopeptide de 609 Da dans les surnageants analysés. Cet oligopeptide est constitué de cinq acides aminés dont la séquence a été déterminée par la dégradation d'Edman. Le CSF de *B. subtilis* a la structure suivante : N-glu-arg-gly-met-thr-C (ERGMT). La masse effective de ce pentapeptide est de 593 Da, soit 16 Da de moins que la valeur donnée par la spectrophotométrie de masse. Selon Solomon *et al.* (1996), cet écart de 16 Da s'expliquerait par l'oxydation de la méthionine en sulfoxyde durant les étapes de purification du CFS. Cette oxydation de la méthionine ne serait pas détectable durant les tests biologiques parce qu'elle n'aurait pas d'effet sur l'activité *in vitro* du CSF sur la sporulation.

4.3.3.1.1. Importance de la position des acides aminés dans la structure du CSF pour la sporulation de *B. subtilis*

Le CSF agit dans le développement de *B. subtilis* par la stimulation de la compétence génétique et la sporulation. Lazazzera et Solomon (1997), ont montré que la position de chacun des acides aminés dans la structure du pentapeptide jouerait un rôle déterminant dans l'activité biologique du CSF. Ces chercheurs ont substitué successivement chacun des acides aminés contenus dans la structure du CSF par une molécule d'alanine. Ils ont ainsi synthétisé cinq nouveaux oligopeptides à partir de la structure du CSF : ARGMT, EAGMT, ERAMT, ERGAT et ERGMA. Les tests biologiques réalisés avec ces nouveaux pentapeptides sur la sporulation de *B. subtilis* ont donné les résultats montrés dans la figure 4.7. Cette figure montre que la substitution des acides aminés situés en position 1, 2, 4 et 5 du CSF par une molécule d'alanine rend le CSF inactif pour la sporulation. Par contre, la substitution de la glycine située en position 3 par l'alanine entraîne une importante augmentation de l'activité du CSF sur la sporulation.

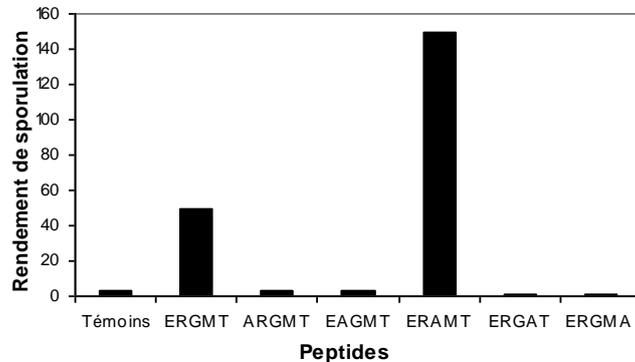


Figure 4.7 : Importance de la position des acides aminés constitutifs du CSF sur la sporulation (selon Lazazzera et Solomon, 1997).

4.3.3.2. Mécanisme de production des phéromones de sporulation

Toutes les phéromones peptidiques intervenant dans la sporulation de *B. subtilis* sont synthétisées dans la cellule, suivant des mécanismes quasi similaires, (Lazazzera et Solomon, 1998). La cartographie des gènes codant pour ces peptides a montré qu'ils étaient associés aux gènes codant pour les aspartates phosphatases transférases, dont ils contrôlent l'activité. Le mécanisme de production du CSF (figure 4.8) est assez représentatif du schéma général de synthèse des phéromones de sporulation. Ce mécanisme de synthèse a été décrit par Solomon *et al.* (1996). Le gène *PhrC*, code pour la synthèse d'un peptide de 40 acides aminés qui subit trois clivages par des peptidases cellulaires pour donner naissance au pentapeptide correspondant au CSF.

Le peptide *PhrC* est produit de manière continue dans la cellule durant la phase exponentielle de croissance (Figure 4.9). Pour être actif, le *PhrC* intracellulaire subit un premier clivage par une peptidase intracellulaire dont l'action aboutit à la formation d'un pre-pro-CSF. Le pre-pro-CSF subit un clivage par une peptidase membranaire pour donner un pro-CSF de 11 acides aminés, qui sera excrété de la cellule. Enfin, le pro-CSF subit un clivage dans le milieu extracellulaire pour donner le CSF constitué des cinq acides aminés de l'extrémité C-terminale du pro-CSF. Le mécanisme enzymatique par lequel la protéine pro-CSF donne naissance au CSF n'est pas parfaitement connu, mais on pense que cela serait effectué sous le contrôle d'une peptidase membranaire ou extracellulaire active uniquement à cette étape du développement de la cellule (Lazazzera, 2001). Selon Lazazzera *et al.* (1999), le gène codant pour cette peptidase pourrait être sous le contrôle du facteur transcriptionnel σ^H , mais cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée. La transcription

du gène *PhrC* dans la cellule est contrôlée d'une part, par une ARN polymérase associée au facteur transcriptionnel sigma H (σ^H), et d'autre part, par la concentration du CSF dans la cellule. Le facteur σ^H se trouve en faible concentration dans les cellules durant la phase exponentielle de croissance et sa concentration augmente pour atteindre un seuil maximal avec l'entrée en phase stationnaire (Healy *et al.*, 1991). Lazizzera *et al.* (1999), ont montré que c'est aussi durant cette période où la concentration de σ^H est élevée que la transcription de *PhrC* est la plus importante. C'est ainsi que ces chercheurs pensent qu'en plus de la stimulation de transcription du gène *PhrC*, le facteur σ^H jouerait aussi un rôle direct dans la maturation du CSF, notamment par le contrôle des peptidases intervenant dans le clivage du Pro-CSF de 11 acides aminés.

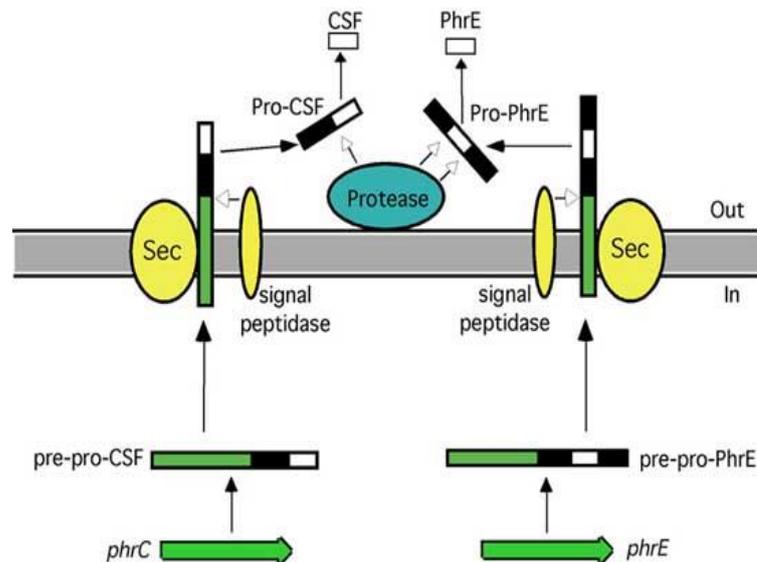


Figure 4.8: Mécanisme de synthèse du CSF et du PhrE dans la cellule (Pottathil et Lazizzera, 2003). Le Pro-CSF subit un seul clivage extracellulaire, alors que le Pro-PhrE subit deux clivages dans le milieu extracellulaire.

La synthèse du PhrE est différente de celle des autres phéromones parce que le pro-PhrE excrété subit deux clivages extracellulaires (Figure 4.7). Les PhrA, PhrF, PhrG, PhrI, et PhrK ont un mécanisme de synthèse similaire à celui du CSF car les pro-PhrA, pro-PhrF, pro-PhrG, pro-PhrI et pro-PhrK, ne subissent qu'un seul clivage dans le milieu extracellulaire (Lazizzera et Grossman, 1998).

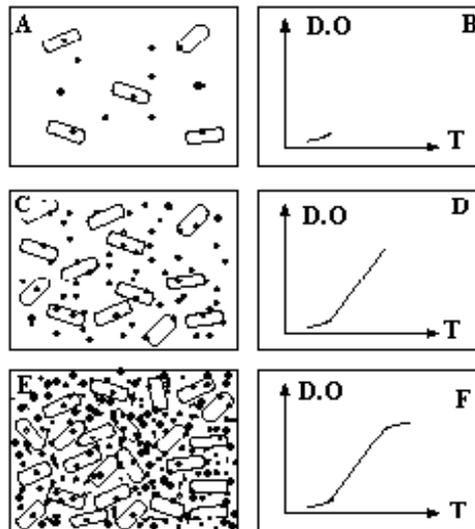


Figure 4.9: Accumulation des phéromones de *quorum sensing* dans le milieu de culture durant la croissance (adaptée de Ruimy et Andremont, 2004).

Les figures B, D et F montrent l'évolution de la densité optique des cultures bactériennes au cours du temps. Les figures A, C et E montrent l'évolution de la quantité de cellules et l'accumulation des phéromones de *quorum sensing* dans les cultures au cours du temps.

4.4.3.3. Mécanisme de transport des phéromones à travers la membrane

Les formes matures des phéromones de sporulation CSF, PhrA et PhrE pénètrent dans la cellule via le produit du gène *Spo0K*, un oligopeptide perméase membranaire (Opp) comprenant 5 sous unités protéiques (figure 4.10) (Rudner *et al.*, 1991 ; Cosby *et al.*, 1998). La protéine Spo0K appartient à une grande famille d'ATPase intervenant dans le transport membranaire des peptides (Lazazzera et Grossman, 1998). La principale fonction de ces Opp est de favoriser l'entrée dans la cellule de peptide devant servir de nutriments aux bactéries. Des Opp transportant des peptides de taille variable ont été identifiés chez *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, et *Lactococcus lactis*. La taille des peptides transportés par les Opp varie en fonction des organismes. Selon Grossman (1995), une suppression du gène *Spo0K* ou d'importantes mutations dans sa structure, chez *Bacillus subtilis*, empêchaient le transport des peptides extracellulaires vers le milieu intérieur et occasionnaient l'inhibition de la sporulation.

4.4.3.4. Mécanisme d'action des phéromones de sporulation

Parmi les phéromones impliquées dans la régulation des événements de phase stationnaire, ce sont les PhrA, PhrE et PhrC (CSF) qui sont les mieux connues (Lazazzera, 2001). Ces phéromones

ont été complètement caractérisées, et leur mode d'action dans la stimulation de la sporulation ou de la compétence génétique sont connus (Solomon *et al.*, 1996 ; Zuber, 2001 ; Stephenson *et al.*, 2003). Les phéromones sont d'abord accumulées dans le milieu extracellulaire puis pénètrent dans la cellule par le biais des transporteurs membranaires (Opp), pour influencer le fonctionnement génétique de la bactérie. En fonction de la quantité des CSF, PhrA et PhrE qui se trouve dans la cellule deux situations se présentent:

- A faible concentration dans la cellule (0,2 - 5 nM) : les CSF favorisent le développement de la compétence génétique (habilité à incorporer du matériel génétique exogène) en stimulant l'expression du premier gène de compétence *comS* et des gènes activés par la protéine ComA~P (Lazazzera et Grossman 1998). L'activité de ComA est régulée à travers la phosphorylation par la protéine kinase ComP (Nakano *et al.*, 1991). ComA et ComP forment un complexe directement lié au promoteur de l'opéron *srfA*. ComP est une histidine-kinase associée à la membrane cellulaire. La phosphorylation de ComA est stimulée par ComX, par l'intermédiaire de ComP. Et la production de ComX nécessite la présence de ComQ. L'activation de ComA va jouer un rôle déterminant dans le *quorum sensing*, en stimulant les gènes *RapA*, *RapC* et *RapE* qui codent pour la synthèse de phosphatases responsables de la régulation négative de la sporulation ; et de *srfA* (dont l'activité est induite à la fin de la phase exponentielle de croissance et dépend du gène *comA* autrefois appelé *srfB*). L'activation de tous ces gènes aura comme conséquence la stimulation de la compétence génétique et le blocage de la sporulation, notamment par l'action de RapA et RapE qui entraîne la déphosphorylation de Spo0F (Figure 4.10).

Résumé : à faible concentration dans la cellule le CSF inhibe la sporulation par la déphosphorylation de Spo0F et stimule la compétence génétique par l'activation du gène *comS*.

- A forte concentration (supérieure à 20 nM) : l'activité des CSF est associée à celle de l'aspartate phosphatase transférase RapB. La protéine RapB intervient dans la sporulation en inhibant la phosphorylation de la protéine Spo0F (Lazazzera et Grossman, 1998 ; Lazazzera *et al.*, 1999). Les PhrA et PhrE participent à cette régulation en inhibant respectivement l'activité des aspartates transférases RapA et RapE associées également à la phosphorylation de Spo0F. L'inhibition de l'activité de ces aspartates transférases (RapA, RapB et RapE) par l'action du CSF et des phéromones PhrA et PhrE est à l'origine de la phosphorylation de Spo0F par les kinases (KinA,B,C,D,E). Ce qui conduira à la phosphorylation

de la protéine Spo0A. La protéine Spo0A~P (phosphorylée) stimule la transcription de facteur σ^H (premier facteur transcriptionnel de la sporulation), à partir de *Spo0H* (Lazazzera, 2000). Tous ces mécanismes sont détaillés sur la figure 4.10.

Résumé : à forte concentration les phéromones CSF, PhrA et PhrE stimulent la sporulation en favorisant la phosphorylation des protéines Spo0F puis Spo0A.

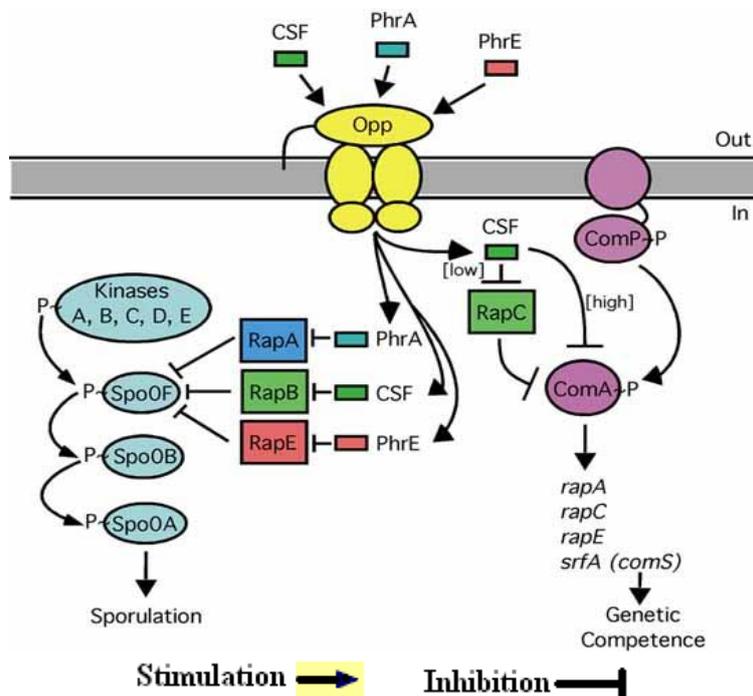


Figure 4.10: Mécanisme d'action des phéromones de *quorum sensing* dans le développement génétique de *Bacillus subtilis* (Lazazzera et Grossman, 1998). A faible concentration les CSF activent *comS* et à forte concentration ils stimulent la phosphorylation de Spo0A.

CHAPITRE 5. LA TECHNOLOGIE DES CELLULES IMMOBILISÉES DANS LES PRODUCTIONS MICROBIENNES

5.1. Introduction

La technologie des cellules immobilisées a été développée pour imiter ce qui se passe dans la nature, où les micro-organismes se développent presque toujours dans un biofilm, associés entre eux et avec des surfaces (Dunne, 2002). L'immobilisation a d'abord été utilisée pour les enzymes avant d'être adaptée aux micro-organismes (Divies *et al.*, 1994). Cette technique de culture consiste à confiner des micro-organismes dans un espace précis du système de production afin d'obtenir de hautes densités de biomasse (Karel *et al.*, 1985). Cette densité cellulaire et la création d'un microenvironnement sont souvent responsables de changements morphologiques et biochimiques dans les cultures (Herrero *et al.*, 2001). Ces changements présentent souvent des avantages en augmentant par exemple la tolérance des bactéries aux substances inhibitrices ou en découplant la croissance bactérienne de la production de métabolites (Madhavan et Ashok, 1998 ; Norton *et al.*, 1994).

5.2. Les techniques d'immobilisation des cellules bactériennes

Plusieurs objectifs sont visés dans l'immobilisation cellulaire (production d'enzyme, production de biomasse, fermentation alimentaire etc.). En fonction des objectifs visés, un grand nombre de méthodes d'immobilisation développées pour les enzymes peuvent être adaptées aux micro-organismes (Divies *et al.*, 1994). Les principales techniques visant à la formation d'un confinement cellulaire peuvent être regroupées en cinq types illustrés dans la Figure 5.1.

- Adsorption sur des surfaces : (verre, bois, PVC, etc.), cette technique est favorable à l'immobilisation des bactéries formant des biofilms (cas des *Bacillus*), ce qui n'est pas le cas pour les bactéries lactiques.
 - inclusion dans des matrices poreuses : (alginate, carraghénane, agar, cellulose, gélatine...) emprisonnement des cellules dans un réseau rigide permettant des échanges de substrats et de produits à travers le polymère.
 - rétention sur des barrières : (microfiltration ou l'ultrafiltration) cette technique consiste à immobiliser les micro-organismes sur des membranes ou dans des capsules de nylon. Elle a l'avantage de favoriser le recyclage intégral des cellules
-

- autofloculation : (basée sur le principe de la décantation), cette technique est utilisée dans la production du kefir, (co-immobilisation de bactéries lactiques et de levures).
- polymérisation : (basée sur la formation de liaison covalente entre les cellules et le support), cette technique est très peu utilisée pour l'immobilisation des organismes vivants parce qu'elle fait appel à des produits très réactifs (glutaraldéhyde, carbodiimide...).

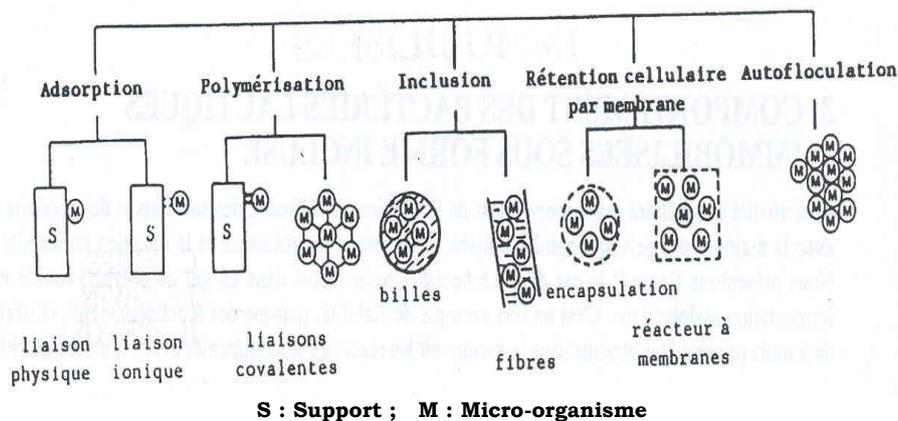


Figure 5.1. Techniques d'immobilisation des micro-organismes (Divies *et al.*, 1994)

La technologie d'immobilisation consistant à retenir les cellules sur des supports fait appel à des interactions entre les micro-organismes et les matériaux utilisés. Il s'agit des liaisons ioniques, de la force de Van der Waals, des ponts hydrogène et des interactions covalentes. Il convient d'avoir une bonne connaissance des propriétés de surface des micro-organismes pour comprendre ces interactions. La distribution des charges dues aux groupes carboxyliques et aminés dans les parois cellulaires détermine la charge globale de la cellule (Ahimou, 2000). La plupart des micro-organismes ayant une charge globale négative, il est préférable d'utiliser des supports chargés positivement pour l'immobilisation (Gonçalves *et al.*, 1992).

L'immobilisation des cellules par inclusion dans une matrice poreuse peut être effectuée dans un gel ou dans un support préformé. Dans le premier cas, la matrice poreuse est formée *in situ* autour de la cellule. Avec cette technique, les cellules sont incluses dans un réseau formé par le polymère. Dans le second cas, la matrice d'immobilisation est préparée au début de la fermentation, puis les cellules sont laissées en diffusion dans les espaces libres du

support où elles peuvent proliférer. La croissance des colonies étant rapidement limitée par le support et les colonies voisines, elles sont alors retenues dans les limites de la matrice (Karel *et al.*, 1985). Les forces d'adhésion précédemment décrites participent à la colonisation des supports par les cellules incluses dans gels de polymères. Il existe une grandeur idéale de pores qu'il convient d'avoir pour la culture des cellules dans les réseaux formés par les gels. D'une part, il convient d'utiliser des polymères formant des réseaux assez perméables aux solutés si on veut obtenir des densités cellulaires élevées. D'autre part, les pores formés dans les supports doivent être assez grands pour permettre la pénétration et la croissance des cellules à l'intérieur de la matrice, mais aussi être assez petits pour empêcher la perte des cellules durant la croissance (Prenosil *et al.*, 1995). Selon Messing *et al.* (1979), le rapport optimal pour les bactéries est de 4 à 5 entre la taille des pores et celle des cellules. L'immobilisation des cellules par inclusion contribue à protéger les cellules tout en permettant une bonne diffusion des nutriments et des produits du métabolisme (De Backer, 1996 ; Klein et Vorlop, 1985).

La technologie des cellules immobilisées est utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour plusieurs types d'application. Plusieurs critères déterminent le choix des polymères utilisés dans ces applications. Les polymères ne doivent pas être toxiques, ni pour l'homme ni pour les bactéries et leur utilisation dans le domaine alimentaire doit être autorisée. En outre, ils doivent montrer des propriétés physiques et chimiques favorables à l'immobilisation. Dans certaines technologies, l'immobilisation cellulaire est assez simplifiée, c'est le cas pour la culture des moisissures sur des résidus agricoles. C'est le cas notamment du son de riz, utilisé comme support dans la production d'enzyme ou de biomasse chez les moisissures. L'inclusion des cellules dans les matrices poreuses est une technologie mieux élaborée, souvent utilisée pour la culture des bactéries lactiques (Bergmaier, 2002). Cette technologie d'immobilisation est réalisée dans des gels de carraghénane, d'agarose, de gélatine, d'alginate, de chitosane, etc. Le choix du polymère utilisé est généralement fonction de sa disponibilité, de son coût, et de son innocuité. Nous traiterons ici du cas de l'inclusion dans les gels d'alginate qui intéressent ce travail.

5.3. L'immobilisation cellulaire par inclusion dans les billes d'alginate

5.3.1. Origine et structure des alginates

Les alginates sont utilisés depuis les années 1900 dans de nombreuses préparations alimentaires, comme agents épaississants, stabilisants et émulsifiants. Selon Velings et Mestdagh (1995), les alginates sont des colloïdes hydrophiles, retrouvés sous forme de sels dans les membranes des algues brunes (*Phaeophyceae*). Du point de vue chimique, ce sont des polyuronides constitués de l'enchaînement de deux acides hexuroniques, l'acide α -L-guluronique et l'acide β -D-mannuronique (figure 5.2). Ces deux acides sont organisés en portion, de manière alternée en certains endroits et homogène en d'autres endroits (Velings et Mestdagh, 1995). Les alginates sont définis commercialement par leur rapport M/G (mannuronique/guluronique). La valeur de ce rapport est importante dans le choix des alginates destinés à la fabrication de gels, car ce sont les acides guluroniques seulement qui participent à la formation des ponts avec les cations bivalents (Velings et Mestdagh, 1995). Ainsi, en fonction des caractéristiques des billes qu'on désire utiliser pour l'immobilisation, il convient de choisir un alginate avec un rapport M/G défini.

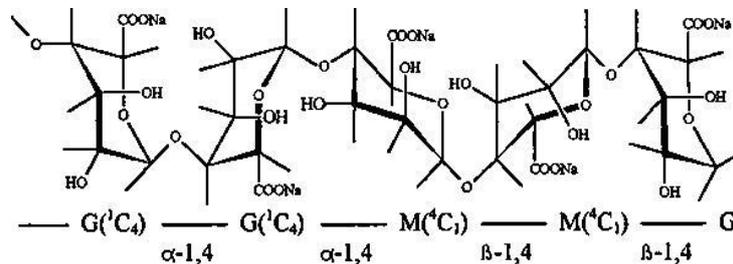


Figure 5.2 : Structure moléculaire de l'alginate de sodium.

Polyuronides constitués de l'enchaînement de l'acide α -L-guluronique et l'acide β -D-mannuronique. Les acides α -L-guluronique sont liés entre eux par des liaisons $\alpha(1\rightarrow4)$ alors que les acides β -D-mannuronique sont liés par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$.

5.3.2. Le principe de la gélification des alginates

La gélification est l'une des principales propriétés des alginates (Poncelet *et al.*, 1999). Les alginates réagissent avec les cations divalents (sauf avec le magnésium) et précipitent lorsque ces cations sont en excès, (Ouwere *et al.*, 1998). Le modèle de la boîte à œuf est souvent utilisé pour expliquer le mécanisme de formation

des billes d'alginate. En effet, la disposition des séquences polyguluroniques de deux chaînes de la macromolécule présente une succession de poches chargées négativement, dont la taille et la géométrie permettent la fixation de cation bivalent (Figure 5.2).

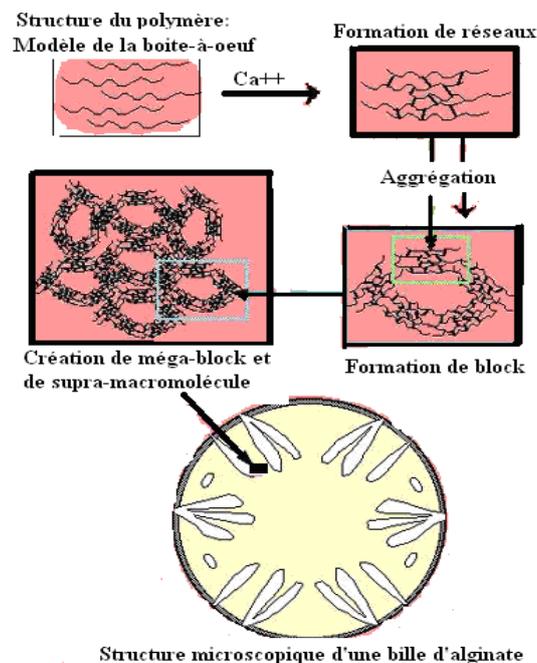


Figure 5.2: Principe de la formation des billes d'alginate dans une solution aqueuse calcium.

Selon Grandfils (2002), les billes d'alginate correspondent à un état physique de la matière intermédiaire entre les états liquides et solides. Cet état leur confère des propriétés particulières et intéressantes pour les biotechnologies. Selon Groboillot *et al.* (1994), la géométrie sphérique des billes d'alginate augmente leur surface et en fait un outil de choix pour l'immobilisation des micro-organismes. Les billes d'alginate sont caractérisées par leurs densités, leurs tailles, leurs formes, leurs résistances à la friction, leurs résistances à la stérilisation et leurs capacités de rétention des cellules (diamètre des pores et porosité).

5.3.2. Fabrication de billes d'alginate pour l'immobilisation de bactéries

Il existe deux techniques de formulation des billes d'alginate. Il s'agit des techniques d'extrusion et d'émulsification, qui sont toutes deux suivies d'une étape de solidification dans une solution de calcium, figure 5.3 (Poncellet *et al.*, 1999). La formation des billes

d'alginate par extrusion est réalisée avec une solution aqueuse de calcium. Le mélange alginate-micro-organisme est extrudé par une seringue et tombe goutte à goutte dans la solution aqueuse de calcium, engendrant des gouttes sphériques (Groboillot *et al.*, 1994). La formation de billes d'alginate par émulsion consiste en la dispersion d'une phase aqueuse constituée du mélange alginate-micro-organisme, dans une phase organique, constituée d'une émulsion d'eau et d'huile contenant le calcium. Selon Groboillot *et al.* (1994), cette technique de formation des billes permet d'obtenir des billes de diamètre plus petit et serait plus adaptée aux productions à grande échelle.

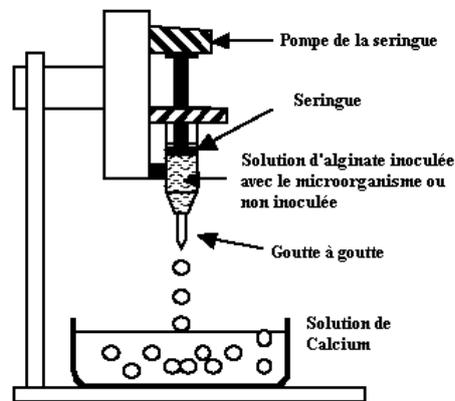


Figure 5.3 : Préparation de billes à partir d'une solution concentrée d'alginate et d'une solution aqueuse de chlorure de calcium.

5.3.3. Avantages des billes d'alginate pour l'immobilisation des cellules

Les billes d'alginate sont utilisées pour fixer ou pour enrober plusieurs types d'organismes vivants (cellules de mammifère, cellules végétales, moisissures, bactéries, protoplastes, etc.). L'avantage de l'alginate pour de telles applications s'explique par plusieurs facteurs. D'abord l'absence de toxicité pour ce polymère qui assure une protection physique, chimique et biologique aux organismes vivants (Ki-Yong et Tae-Ryeon, 2000). Ensuite la perméabilité des réseaux formés pour les molécules de poids moléculaires de l'ordre de 5000 kD, cette caractéristique est utilisée dans la production d'enzyme et de métabolite à partir de cellules enrobées, comme c'est le cas pour la production de glucoamylase par *Kluyveromyces lactis* (de Alteriis *et al.*, 2004) et de l'inulinase par *Kluyveromyces maxianus* (Thonart *et al.*, 1983). Puis nous avons le fait que les billes d'alginate sont biodégradables et possèdent la capacité de libérer tout leur contenu dans le milieu, cette caractéristique est utilisée pour

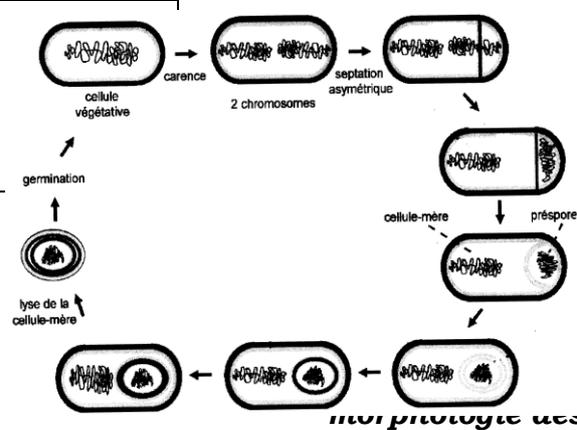
l'incorporation de pesticides (McGowen *et al.*, 1998 ; Kulkarni *et al.*, 2000) et d'inoculum (Bashan, 1986 ; Shah *et al.*, 1998) dans le sol. Enfin, les billes d'alginate se conservent bien au cours des expérimentations et sont compatibles avec un grand nombre de substances (Bergmaier, 2002).

5.4. Technique de suivi des cultures immobilisées

Plusieurs types de mesures sont effectués pour analyser l'effet de l'immobilisation sur les propriétés de croissances des micro-organismes (Bergmaier, 2002). Les mesures généralement réalisées sont :

- la concentration des cellules immobilisées,
- les cinétiques de croissance,
- la consommation de substrat,
- et la production de métabolites.

Une caractérisation morphologique et physiologique des cellules immobilisées, ainsi que leur environnement direct, est aussi d'un grand intérêt dans la compréhension de l'immobilisation cellulaire. Les méthodes comme la microscopie optique et électronique, le marquage avec des radioisotopes et l'autoradiographie, la fluorimétrie, la spectroscopie infrarouge et la résonance magnétique nucléaire (RMN) peuvent être utilisées pour étudier les propriétés des cellules immobilisées (Clark, 1989 ; Bergmaier, 2002). L'application de ces méthodes sophistiquées est très limitée à cause de leurs coûts élevés. Un moyen simple de suivi consiste à quantifier la biomasse immobilisée par la mesure de la différence de poids du support avant et après la colonisation. Cette technique est très souvent utilisée pour les cultures immobilisées sur supports solides (Gonçalves *et al.*, 1992 ; Senthuran *et al.*, 1997). Elle a malheureusement le désavantage de doser simultanément les substances accumulées dans la matrice et la biomasse produite. Un autre moyen simple de quantification des cellules immobilisées est le dosage de l'un de leurs composants. Pour être ainsi dosé ce composant doit être spécifique aux micro-organismes et ne pas être retrouvé dans la structure du support. C'est le cas des protéines (Robinson et Wang, 1987), des adénosines triphosphates ATP (Gikas et Livingston, 1998) et des acides désoxyribonucléiques ADN (Wang et Wang, 1989). Si la quantité d'un composant par unité de biomasse ou par unité de cellule est connue, ce composé peut être mesuré dans le support pour être corrélé avec l'évolution de la biomasse.



- 59 -

immobilisation sur la physiologie et la morphologie des cellules

L'immobilisation cellulaire engendre des conditions environnementales différentes de celles observées dans les cellules libres (Herrero *et al.*, 2001). Les principales caractéristiques de l'immobilisation sont : la limitation des transferts de masse et la création d'un microenvironnement autour des cellules.

Champagne *et al.* (1994), ont montré que chez les bactéries lactiques, l'immobilisation jouait un rôle important dans l'élimination de l'acide lactique produit et dans la diffusion des nutriments. Plusieurs travaux (Champagne *et al.*, 1994 ; Cachon *et al.*, 1998 ; Krishnan *et al.*, 2001), ont montré que les gradients de concentration créés par l'accumulation des métabolites dans le voisinage des cellules contribuaient à diminuer le taux de croissance des bactéries et à changer leurs caractéristiques physiologiques et morphologiques. Karel *et al.* (1985) ont observé que les voies métaboliques empruntées par des cellules immobilisées pouvaient être différentes de celles des cellules libres. Selon, Prigent-Combaret *et al.* (1999), il existerait des mécanismes de reconnaissance de surface pour les bactéries, engendrant des changements physiologiques spécifiques. Des changements physiologiques dus à la présence de surfaces ont également été signalés par O'Toole *et al.* (2000), dans la formation de biofilm. Selon Parsek et Greenberg (2000) et Rashid *et al.* (2000), l'immobilisation contribue à amplifier le phénomène de *quorum sensing* pour la formation de biofilm chez certains micro-organismes dont *Pseudomonas aeruginosa*.

OBJECTIFS ET STRATEGIE DE LA RECHERCHE

1. Objectifs de la recherche

Ce travail s'intéresse à la problématique des bactéries acidifiantes, capables de résister aux conditions extrêmes, notamment par la formation de spores. Selon les données de la littérature, ce type de bactéries serait assez rare dans la nature et aucune étude ne s'était encore intéressée à leur recherche dans les environnements du Burkina Faso.

Cette étude s'intéresse plus particulièrement à l'analyse de la diversité et des propriétés technologiques de ces bactéries acidifiantes à travers :

- La recherche de nouvelles bactéries acidifiantes dans les environnements du Burkina Faso. Pour cela un échantillonnage a été réalisé dans le voisinage des fermes dans ce pays.
- La détermination des particularités phénotypiques, et génétiques ainsi que des propriétés technologiques des bactéries acidifiantes isolées dans les environnements. Il s'agit précisément de déterminer la position taxonomique des nouvelles bactéries et de mettre en évidence les intérêts qu'elles présenteraient pour les bio-industries.
- La détermination d'un schéma de culture favorable à la production de biomasse chez ces bactéries acidifiantes avec un accent sur les conditions nécessaires à la formation des spores.

2. Stratégie de la recherche

La recherche de nouvelles bactéries acidifiantes est réalisée dans des échantillons de sols prélevés dans le voisinage des animaux de ferme (poule, bœuf, mouton), dans le nord et le centre du Burkina Faso. Deux raisons motivent le choix de ces environnements pour la recherche des bactéries acidifiantes :

- Plusieurs bactéries acidifiantes ont déjà été isolées dans le voisinage des animaux et dans plusieurs cas ces bactéries se sont montrées de bons ingrédients pour les formulations probiotiques.
 - Les micro-organismes capables de survivre dans les milieux extrêmes, comme c'est le cas des sols au Burkina Faso (pays sahélien), possèdent très souvent d'importants mécanismes de résistance et c'est
-

justement le cas pour les bactéries sporulantes du genre *Bacillus* dont le principal milieu naturel reste le sol.

Les bactéries acidifiantes sont isolées et sélectionnées du sol suivant leurs principales propriétés, notamment la résistance thermique par le biais de la sporulation et la capacité à métaboliser le glucose en acide lactique dans les milieux artificiels.

Les particularités physiologiques, biochimiques, génétiques et technologiques des nouvelles bactéries acidifiantes sont déterminées suivant les méthodes conventionnelles de microbiologie. A cet effet, les principales bactéries acidifiantes connues dans le genre *Bacillus* sont utilisées comme référence. Il s'agit notamment des souches types de *B. coagulans* (LMG 6326), *B. laevolacticus* (LMG 16675) et *B. racemilacticus* (LMG 6938).

La stratégie adoptée pour déterminer le système de culture favorable à la sporulation des bactéries acidifiantes a consisté à l'observation de leur comportement vis-à-vis des principales conditions environnementales impliquées dans la sporulation des *Bacillus*. Pour ces expérimentations la souche *B. coagulans* LMG 6326 est utilisée comme modèle, suivant trois considérations:

- *B. coagulans* est la première et la principale bactérie acidifiante du genre *Bacillus* connue, elle possède par ailleurs la plupart des particularités physiologiques et biochimiques observées chez les autres bactéries de ce type;
 - *B. coagulans* est une bactérie acidifiante dont la sporulation constitue un problème pour les industriels et pour laquelle il existe quelques travaux de base sur la sporulation ;
 - *B. coagulans* est parmi les bactéries acidifiantes et sporulantes connues celle qui fait l'objet de la plupart des transactions financières dans les bio-industries, aussi bien pour les formulations probiotiques que pour la production industrielle d'acide lactique.
-

CHAPITRE 6. ISOLEMENT ET SELECTION DE BACTERIES ACIDIFIANTES ET SPORULANTES

6.1. Echantillonnage

Les prélèvements sont effectués en milieu extrême, dans trois fermes du Burkina Faso : l'une située à Ouagadougou (région centrale) et les deux autres à Dori (région nord). Les échantillons prélevés dans ces fermes sont constitués essentiellement de terre, des restes de nourriture et des excréments des animaux. Un seul prélèvement de 500 g environ est effectué dans chacune de ces fermes. Pour chaque échantillon, un tri a permis de séparer les excréments (fèces) du reste des constituants.

6.2. Conditions d'enrichissement et d'isolement

6.2.1. Milieu de culture pour l'enrichissement et l'isolement

Le milieu d'isolement utilisé dans ce travail est le GYP-NY (glucose/Extrait de levure/peptone) mis au point par Nakayama et Yanoshi (1967a). Ce milieu est composé de 10 g/l de glucose ; 10 g/l de peptone ; 10 g/l d'extrait de levure ; 10% (v/v) d'extrait de terre (50 g de terre mélangé à 100 ml d'eau et stérilisé à 121°C pendant 60 min) ; 1% (v/v) d'une solution minérale A (5% K_2HPO_4 et 5% KH_2PO_4) ; 1% (v/v) d'une solution minérale B (0,1% NaCl, 0,1% $MnSO_4$, 0,01% $CuSO_4$, 0,01% $CoCl_2.6H_2O$) ; et 0,1% d'une solution minérale C (0,1% $FeSO_4.7H_2O$ et 2,7 % Na_3 -Citrate) ; pH 7±0,2.

Pour les géloses 1,8 % d'agar et 0,005 % de pourpre de bromocrésol sont ajoutés à ce milieu. Tous les milieux sont stérilisés à 121°C pendant 20mn.

6.2.2. Technique d'isolement

Les isolements sont effectués à la suite d'un enrichissement selon la méthode décrite par Nakayama et Yanoshi (1967a). L'enrichissement est réalisé selon le mode opératoire suivant : 5 g d'échantillon sont mis dans 100 ml de bouillon GYP-NY stérile ; deux fioles sont ensemencées par échantillon. L'inoculum est homogénéisé pendant 5 minutes puis placé dans un bain marie pour un choc thermique à 80°C pendant 10 mn. A la fin du choc thermique, l'inoculum est refroidi puis placé dans une jarre d'anaérobiose où la culture est incubée dans les conditions d'anaérobiose à 30°C pendant 48 heures. A la fin de la période d'incubation, 100 µl de culture sont prélevés puis étalés à la surface d'une gélose GYP-NY contenant 0,005 % (p/v) de pourpre de bromocrésol. Les géloses ensemencées, sont incubées en atmosphère normale à 30°C, pendant 24 heures. Toutes les colonies autour desquelles apparaît une coloration jaune (production d'acide), sont isolées et repiquées sur de

nouvelles boîtes gélosées. Les isolats sont ensuite purifiés par repiquage successif sur plusieurs boîtes gélosées. La pureté des cultures est déterminée par l'observation microscopique des cellules et par l'homogénéité des colonies produites sur gélose. Les cultures pures sont analysées suivant des critères de sélection (voir 6.3) et mises en collection.

6.3. Conditions de sélection

Les critères pris en compte pour la sélection des isolats sont:

- la production d'acide lactique
- la résistance thermique à 80°C pendant 10 mn
- la production de catalase
- la morphologie des cellules (bâtonnet régulier).
- la coloration Gram

Parmi les souches purifiées, seules celles répondant à ces 5 critères sont mises en collection au laboratoire de microbiologie du Centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI) à Gembloux.

6.4. Technique de conservation des isolats

Les bactéries sont conservées sur deux types de supports.

- Sur gélose inclinée dans un milieu GYP-NY modifié pour une conservation à 4°C. Les cultures conservées dans ces conditions sont régulièrement utilisées pour les travaux de laboratoire. Le milieu utilisé, est composé de 5 g/l d'extrait de levure, 3 g/l de peptone de caséine, 2 g/l de glucose, 2 g/l d'acétate de sodium, 2 g/l de K₂HPO₄, 0.1% (v/v) de la solution A, 0.1% (v/v) de solution B, 0.02% (v/v) de solution C et 18 g d'agar ; pH 7±0,2.
 - Sur microbilles dans une solution aqueuse de glycérol 30% (v/v) pour une conservation à -80C. Deux ou trois colonies sont prélevées sur une gélose de 24 heures et mélangées à des microbilles de 2 à 3 mm de diamètre submergés dans 1 ml d'une solution de glycérol 30%. Après homogénéisation, les tubes sont placés à -80°C. Cette technique est favorable la conservation des cellules pour plusieurs années dans les collections.
-

CHAPITRE 7. CONDITIONS DE CROISSANCE ET PROPRIETES TECHNOLOGIQUES DES ISOLATS

7.1. Milieux et techniques de suivi des cultures

7.1.1. Milieux de culture

Tous les tests de croissance sont réalisés dans le milieu GYP (Glucose/Yeast/Peptone) composé de 10 g/l de glucose ; 10 g/l d'extrait de levure, 10g/l de peptone de caséine ; 2,5 g/l d'acétate de sodium ; 5 g/l de CaCO₃ ; 2 g/l de K₂HPO₄ ; 0,45 g/l de MgSO₄ et 0,01 g/l de MnSO₄. Pour les géloses 18 g d'agar sont ajoutés au milieu. Le pH du milieu est ramené à 7, avant la stérilisation à 121°C pendant 20 min.

7.1.2. Solution physiologique utilisée pour les dilutions

La solution physiologique (eau peptonée), utilisée pour diluer les suspensions bactériennes de 10 en 10, pour le dénombrement, est composée de 5 g/l de chlorure de sodium, 1 g/l de peptone de caséine et 0,1% (v/v) de tween 80. La solution physiologique est distribuée dans des tubes à essai à raison de 9 ml par tube et stérilisée à 121°C pendant 20 min.

7.1.3. Evaluation de la biomasse par dénombrement

Pour l'évaluation de la biomasse par dénombrement, des dilutions successives de 10 en 10 sont effectuées dans la solution physiologique stérile. Trois dilutions consécutives sont choisies suivant la densité cellulaire, pour être étalées en surface dans des boîtes gélosées à raison de 100 µl par boîte. Trois boîtes sont utilisées pour chaque dilution. Les boîtes de Pétri sont incubées à 45°C pour *B. coagulans* et à 37°C pour les autres bactéries étudiées dans ce travail. Les dénombrements sont effectués après 24h, 48 ou 72 heures d'incubation selon les buts recherchés. Les quantités de spores produites sont déterminées par cette même technique de dénombrement, après un traitement thermique de 80°C pendant 10 min réalisé sur la première dilution.

7.1.4. Evaluation de la biomasse par la densité optique des cultures

La densité optique des suspensions cellulaires (bouillons) est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm (Beckman), car l'absorbance des cultures bactériennes est proportionnelle à la concentration cellulaire. Ce facteur de proportionnalité étant lui-même fonction de la taille et de la forme des cellules. Un aliquote du milieu de culture stérile sert de référence. Les échantillons sont

éventuellement dilués pour respecter les zones de linéarité de l'appareil.

7.2. Détermination de la température optimale de croissance

Les températures optimales de croissance des isolats sont déterminées simultanément en bouillon et en gélose GYP. Les fioles et les boîtes de Pétri sont incubées à 20°C, 30°C, 37°C, 45°C et 55°C pendant 48 heures. Les effets de la température sur la croissance sont évalués par mesure de la densité optique des suspensions cellulaires à 550 nm.

7.3. Détermination du pH optimal de croissance

Pour la détermination du pH optimal de croissance des isolats, les cultures sont réalisées dans des bouillons GYP dont les pH sont ajustés avec du KOH 5N et du HCl 10% à des valeurs variant de 2 à 9. L'effet du pH sur la croissance est évalué par la mesure de la densité optique des cultures à 550 nm après 48 heures de croissance.

7.4. Détermination de l'effet du chlorure de sodium sur la croissance

L'effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des isolats est déterminé dans un bouillon GYP. Les concentrations de NaCl utilisées, varient de 0,5 % à 10 % (p/v). Ces tests sont évalués par mesure de la densité optique des cultures après 48 heures d'incubation.

7.5. Détermination des paramètres cinétiques de croissance

Cette étude concerne la détermination du taux de croissance et du temps de génération des différentes souches sur le milieu liquide GYP en fiole et sans agitation. Les cultures ont été suivies par la mesure de leur densité optique à 550 nm pendant 48 heures.

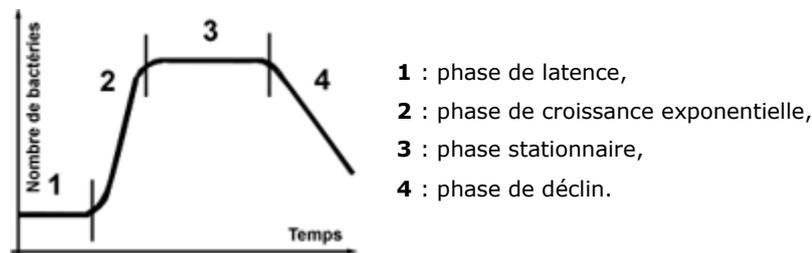


Figure 7.1 : Allure générale des courbes de croissance des micro-organismes

La croissance bactérienne est caractérisée par le taux de croissance (μ) et le temps de génération (g). Le taux de croissance (μ) est la vitesse spécifique de croissance de la population microbienne. Le temps de génération est le temps qui s'écoule entre deux divisions cellulaires (c'est le temps nécessaire pour que la population passe de X à $2X$).

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0} \quad (h^{-1}) \quad g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu} \quad (h)$$

Où (x) est la population à l'instant (t) et (x_0) la population à l'instant (t_0)

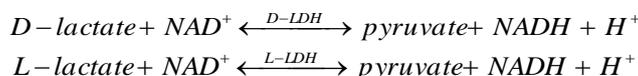
7.6. Détermination des types fermentaires

Les types fermentaires des isolats (production de CO_2), sont déterminés dans un bouillon GYP contenant 0,002 % de pourpre de bromocrésol, selon la méthode décrite par Guiraud (1998). Ce milieu est reparti dans une série de tubes à essai (10 ml par tube), une cloche de Durham est disposée dans chaque tube avant la stérilisation à $121^\circ C$ pendant 20 min. Après 48 heures de culture dans ces tubes, la production d'acide lactique est mise en évidence par le virage du pourpre de bromocrésol à la couleur jaune et la production de CO_2 est mise en évidence par la présence de gaz dans les cloches de Durham.

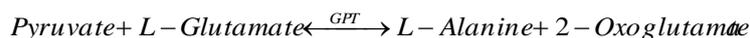
7.7. Profil de production d'acide lactique

L'isomérisation et la quantité d'acide lactique produit par les isolats sont déterminées par l'action du lactate déshydrogénase (LDH, Boehringer Mannheim) sur des surnageants de culture de 48 heures dans un bouillon GYP.

Le lactate déshydrogénase catalyse la réaction d'oxydation de l'acide lactique par la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en pyruvate.



Le pyruvate formé au cours de ces deux réactions est éliminé par une troisième réaction catalysée par le glutamate pyruvate transaminase (GPT) en présence du L-glutamate.



La quantité de NADH formée au cours des deux premières réactions est stœchiométriquement égale à la quantité de lactate

oxydé. Cette quantité de NADH est déterminée par mesure de l'absorbance des solutions à 340 nm.

5 ml d'une culture de 48 heures sont séparés par centrifugation à 10.000 g pendant 10 min. Le surnageant est récupéré dans un tube Falcon et placé dans un bain-marie à 100°C pendant 10 min afin d'inactiver toutes les réactions enzymatiques susceptibles d'avoir lieu. L'échantillon est ensuite refroidi dans un bain de glace puis séparé des impuretés par centrifugation à 10.000 g pendant 10 min. Le pH du surnageant est ajusté à $9 \pm 0,2$ avec du NaOH 2N. Le dosage de l'acide lactique est ensuite réalisé sur le matériel obtenu selon le protocole décrit dans le tableau suivant :

Dans une cuvette de spectrophotométrie en quartz		
	<i>Blanc</i>	<i>Echantillon</i>
S ₁	1000 µl	1000 µl
S ₂	200 µl	200 µl
S ₃	20 µl	20 µl
Echantillon	-	10 ou 100 µl
Eau milli-Q	1000 µl	990 ou 900 µl
Homogénéiser le contenu de la cuve par inversions. Laisser reposer 5 min et lire la densité optique à 365 nm. DO = A1		
S ₄	20 µl	20 µl
Homogénéiser le contenu de la cuve par inversions. Laisser reposer 30 min et lire la densité optique à 365 nm. DO = A2		
S ₅	20 µl	20 µl
Homogénéiser le contenu de la cuve par inversions. Laisser reposer 30 min et lire la densité optique à 365 nm. DO = A3		

S₁ : solution d'acide L-glutamique (14,66 mg/ml) pH=10, (S₂) : solution de NAD à 35 mg/ml ; (S₃) : solution enzymatique du GPT ; (S₄) : solution enzymatique du D-LDH ; (S₅) : solution enzymatique du L-LDH.

La concentration en D ou L-lactate dans l'échantillon est calculée avec la formule suivante :

$$C = \frac{V * MG}{\epsilon * d * v * 1000} \Delta E \quad (g/l)$$

C : concentration en acide lactique (g/l)
V = volume réactionnel (ml)
MG = poids moléculaire de l'acide lactique (g/mol)
v = volume de la prise d'essai (ml)
d = diamètre de la cuve (cm)
ε = coefficient d'extinction du NADH (à 365 nm = 3,4 l.mmol⁻¹.cm⁻¹)
ΔE : différence d'absorbance entre le blanc et l'échantillon

7.8. Détermination de la tolérance des bactéries aux sels biliaires

La concentration minimale inhibitrice (CMI) pour un mélange de sels biliaires conjugués et non conjugués de qualité analytique (Oxgall Powder B-3883 Sigma), est déterminée selon la méthode de Hyronimus *et al.*, 2000. Des milieux gélosés sont préparés avec des concentrations en sels biliaires de 0,05 % à 1 % (p/v). Les souches sont ensemencées à la surface de ces géloses à partir de 20 µl d'une préculture de 24h. Les boîtes de Pétri sont incubées à la température optimale de croissance de chaque souche pendant 48 heures. La CMI déterminée par cette méthode correspond à la plus faible concentration en sels biliaires pour laquelle aucune croissance n'est observée sur les géloses.

7.9. Détermination de la tolérance aux pH acides

La tolérance aux pH acides est évaluée pour les pH 2,5 et pH 3,0 selon la méthode décrite par Hyronimus *et al.* (2000). Un culot cellulaire est récolté à partir de 10 ml d'une culture de 24 heures et maintenu dans un tampon phosphate 0,5 M pH 3,0 pendant 3 heures. Une opération similaire est effectuée pour le test à pH 2,5. Un témoin est constitué avec une suspension cellulaire réalisée dans un tampon phosphate à pH 7,0. Les taux de survie dans ces milieux sont estimés par des dénombrements effectués à la fin de chaque traitement.

$$\% \text{ survie} = \frac{\text{Biomasse viable après traitement (CFU / ml)}}{\text{Biomasse initiale (CFU / ml)}} \times 100$$

7.10. Production d'enzymes d'intérêts

7.10.1. Production de lipases

La capacité des isolats à produire des lipases est déterminée par le test d'hydrolyse de la tributyrine en milieu gélosé. Ce test est réalisé selon une méthode décrite par Larpent et Larpent (1985). Le milieu utilisé est composé de 9 g/l de peptone de caséine, 9 g/l d'extrait de levure, 9 g/l de tributyrine et 14 g/l d'agar. Une jeune colonie est repiquée en deux points bien séparés à la surface du milieu solidifié. Après une semaine d'incubation à 30°C, l'activité lipolytique est vérifiée par la formation d'un halo transparent autour des colonies.

7.10.2. Production d'amylases

La production d'amylases est mise en évidence par le test d'hydrolyse de l'amidon de blé en milieu gélosé. Ce test est réalisé selon une méthode décrite par Larpent et Larpent (1985). Le milieu

de culture utilisé, est composé de 9 g/l de peptone caséine, 9 g/l d'extrait de levure, 9 g/l d'amidon de blé et 14 g/l d'agar. Pour la préparation du milieu, l'amidon de blé est mis en solution aqueuse et stérilisé séparément, il est ajouté au reste du milieu avant d'être coulé dans les boîtes de Pétri. Une jeune colonie est repiquée en deux points bien séparés à la surface du milieu solidifié. Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant une semaine. A la fin de la période d'incubation la surface des géloses est pulvérisée avec de l'éthanol absolu. L'apparition d'un halo transparent autour des colonies à la suite de cette action caractérise la production d'amylases dans le milieu.

7.10.3. Production de protéases

La production de protéases est mise en évidence par le test d'utilisation de la caséine du lait écrémé comme source de carbone par les micro-organismes (Larpen et Larpen, 1985). Le milieu de culture utilisé, est constitué de 9 g/l de peptone caséine, 9 g/l d'extrait de levure, 9 g/l de lait écrémé et 14 g/l d'agar. Dans la préparation de ce milieu, le lait écrémé est stérilisé séparément puis ajouté aux autres constituants avant d'être coulé dans les boîtes. Une jeune colonie de 24 heures, est repiquée en deux points bien distincts à la surface des géloses. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 30°C pendant une semaine. La production de protéases est mise en évidence par l'apparition d'un halo transparent autour des colonies formées.

CHAPITRE 8. TAXONOMIE POLYPHASIQUE POUR LA CARACTERISATION ET L'IDENTIFICATION DES ISOLATS

8.1. Détermination des propriétés microbiologiques

8.1.1. Analyses de la morphologie des cellules et des spores

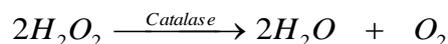
Les propriétés morphologiques des cellules sont déterminées par microscopie à contraste de phase sur des aliquotes (bouillons) de culture et sur des colonies prélevées sur gélose. Ces observations sont effectuées avec un microscope de marque Zeiss de type *Axioskop 2 mot*, muni d'une camera Zeiss de type *AxioCam HRc color*. Les images sont analysées dans le logiciel *AxioVision* pour la détermination de la position et de la forme des spores.

8.1.2. Détermination du caractère Gram

Le test Gram est réalisé par la méthode du KOH (Gregersen, 1978). Une jeune colonie est disposée sur une lame porte-objet, et mélangée avec 50 µl de KOH 3% (p/v) à l'aide d'une pipette Pasteur. La coloration Gram est mise en évidence par la formation d'une émulsion visqueuse lorsque la pipette est soulevée. La présence de cette émulsion signifie qu'il s'agit d'une bactérie Gram négative et son absence caractérise les bactéries Gram positives.

8.1.3. Détermination de la catalase

La production de catalase est mise en évidence par la réaction de décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par cette enzyme. Une colonie issue d'une culture en gélose GYP de 24 heures est placée sur une lame porte-objet et additionnée de 100 µl d'une solution aqueuse de H₂O₂ 30%. L'observation d'un dégagement gazeux dans la colonie traduit la présence d'une catalase.



8.1.4. Détermination de la pseudocatalase

La production de pseudocatalase est mise en évidence par le test de la benzidine (Guiraud, 1998). Une colonie issue d'une culture de 24 heures en gélose GYP est placée sur une lame porte-objet et additionnée successivement de 50 µl du réactif de la benzidine (voir composition dans le paragraphe suivant) et 50 µl d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 30%. L'apparition d'une coloration bleue noire dans la colonie caractérise la production d'une

pseudocatalase. Ce test est toujours positif pour les espèces du genre *Bacillus*.

Le réactif de la benzidine : est préparé par dissolution de 1 g de chlorhydrate de benzidine dans 20 ml d'acide acétique glacial. Le mélange est ensuite complété à 50 ml avec de l'eau distillée puis chauffé légèrement pendant une minute, avant d'être porté à 100 ml avec de l'éthanol absolu. Le réactif doit être conservé 4°C.

8.2. Analyse des profils fermentaires (test API 50 CH)

Les tests d'assimilation des substrats carbonés sont réalisés avec des galeries *API 50 CHB* pour les bactéries sporulantes et *API 50 CHL* pour les bactéries non sporulantes (Biomérieux S.A., La Balme les Grottes, Montalieu Vercieu, France).

8.2.1. Inoculation et lecture des galeries

Les bactéries en préculture de 24 heures sur gélose GYP sont récupérées stérilement dans un tube de 10 ml de milieu API pour obtenir une suspension cellulaire de turbidité comprise entre 5 et 6 sur l'échelle de Mc FARLAND. Les galeries sont inoculées avec ce mélange par remplissage des cupules à l'aide d'une pipette pasteur et sont incubées conformément aux instructions du fabricant à 30°C. Les galeries sont lues deux fois par jour pendant 48 heures.

Milieu pour API 50 CHB

Sulfate d'ammonium 2 g
Extrait de levure 0,5 g
Tryptone 1 g
Solution minérale (Cohen-bazine) 10 ml
Rouge de phenol 0,18 g
Tampon phosphate pH 7,8 1000 ml

Milieu pour API 50 CHL

Polypeptone 10g
Extrait de levure 5g
Tween 80 1ml
Phosphate dipotassique 2g
Acétate de sodium 3H₂O 5g
Citrate diammonique 2g
Sulfate de magnésium 7H₂O, 0.20g
Sulfate de manganèse 4H₂O, 0.05g
Pourpre de bromocrésol 0.17g
Eau déminéralisée 1000 ml

8.2.2. Analyse numérique des résultats

Les profils d'acidification obtenus sont comparés avec ceux contenus dans les bases de données par le logiciel *API lab Plus version 3.0* (Biomérieux). Les niveaux de similarité entre les nouvelles bactéries et les espèces connues sont calculés en utilisant le coefficient de similarité de Jaccart (S_j).

$$S(x_1, x_2) = \frac{a}{a+b+c}$$

x_1 et x_2 = individus

a= caractères positifs chez x_1 et x_2 .

b= caractères positifs chez x_1 et négatifs pour x_2

c= caractères négatifs x_1 et positifs pour x_2

Les identifications obtenues par ces analyses sont jugées acceptables lorsque les taux d'homologies calculés sont supérieurs à 90%.

8.3. Analyse des acides gras cellulaires (EMAG)

L'extraction et l'analyse des esters méthyliques des acides gras cellulaires (EMAG) sont réalisées avec la collaboration du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Gent (LMG), selon la technique décrite par Ostherhout *et al.* (1991), et conformément aux recommandations du système d'identification MIDI (Microbial Identification System, Inc., DE, USA).

8.3.1. Production de la biomasse

Les souches sont mises en culture sur un milieu gélosé TSA (Tryptone Soy Agar) pendant 24 heures à 28°C. Ce milieu est constitué de 15 g/l de tryptone ; 5 g/l de peptone de soja ; 5 g/l de chlorure de sodium ; 15 g/l d'agar ; pH 7,3±0,2

8.3.2. Méthylation et extraction des acides gras cellulaires

Environ 40 mg de culture sont prélevés de la surface des géloses et saponifiés dans 1 ml d'une solution aqueuse contenant 15 % (p/v) de soude et 50 % (v/v) de méthanol. Le produit est incubé à 100°C pendant 30 mn. L'hydrolysate obtenu est refroidi à la température ambiante. Les acides gras sont ensuite méthylés avec 2 ml d'une solution de méthanol acidifié (HCl) à 80°C pendant 10 mn. Les esters méthyliques des acides gras (EMAG) formés sont extraits dans une solution d'hexane/méthyl-ter-butyl ether (1 :1, v :v).

8.3.3. Chromatographie en phase gazeuse des EMAG

Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont analysés par chromatographie en phase gazeuse, avec un chromatographe de type Agilent série 6890A (Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA), équipé d'un système d'injection automatique, d'une colonne capillaire Ultra 2, 19091B-102 (fused silica capillary column 25m x 0.2mm ; cross-linked 5% phenyl methyl silicone, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Calif. USA), d'un détecteur à ionisation de flamme (FID), d'un intégrateur et d'un ordinateur. Le gaz vecteur utilisé est l'hydrogène (H₂). La programmation de température est de 170°C à 270°C à raison de 5°C.min⁻¹. Le volume injecté est de 1 µl et le temps complet d'analyse est de 25 minutes. Tous les acides gras de taille comprise entre 9 et 20 atomes de carbone sont identifiés par comparaison avec les temps de rétention d'un standard d'acide gras bactérien (bacterial acid methyl ester mix CP, 4-7080 ; Supelco, Inc., Bellefonte, Pa.).

8.3.4. Analyse des données et identification des isolats

Les temps de retention et les aires des pics obtenus pour chaque type d'acide gras sont analysés dans un ordinateur permettant d'identifier automatiquement les isolats par rapport à une base de données (MIDI). Cette base de données comprend plus de 300 types d'acide gras retrouvés chez les micro-organismes et plus de 100.000 souches analysées. Les indices de similitude (SI) sont calculés à partir des chromatogrammes en tenant compte à la fois de la présence des pics et de leurs aires par rapport aux acides gras totaux.

$$C_{pw} = \sum_{k=1}^n 0.5(x_{1k} + x_{2k})f(x_{1k}/x_{2k})/100$$

$$0 \leq C_{pw} \leq 1$$

C_{pw} : indice de similarité (SI)

x_1 et x_2 : Souches

k : numéro du pic

x_{1k} et x_{2k} : aire relative de $k^{\text{èmes}}$ pic

x_{1k}/x_{2k} : ratio des pics ≥ 1 (si non doit être inversé)

$f(x_{1k}/x_{2k})$: est la fonction qui détermine la similarité entre deux pics, $f(x_{1k}/x_{2k})=100$ si les pics x_{1k} et x_{2k} sont retrouvés dans les deux échantillons et $f(x_{1k}/x_{2k})=0$ dans le cas contraire.

Selon ce système, les identifications obtenues sont acceptables lorsque les degrés d'homologie calculés (SI) sont supérieurs à 0,49, c'est-à-dire : $0,5 \leq SI \leq 1$.

8.4. Analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S

8.4.1. Extraction et purification de l'ADN génomique

Les micro-organismes sont cultivés dans un bouillon GYP pendant 24 heures. Le culot cellulaire contenu dans 2 ml de cette culture est récolté et lavé deux fois par centrifugation dans un tampon EDTA 50 mM pH 7,8 avant d'être mis en suspension dans 1 ml de ce tampon. La lyse des cellules est réalisée avec du lysozyme (hydrolysant les liaisons β (1 \rightarrow 4) entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acetylglucosamine des peptidoglycans, donnant lieu à la rupture des parois cellulaires) et de la mutanolysine (hydrolysant les polysaccharides des parois cellulaires). Sur la suspension cellulaire précédente, 50 μ l d'une solution de lysozyme à 15 mg/ml et 20 μ l d'une solution de mutanolysine à 1 U/ml sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé au vortex puis incubé à 37°C pendant 2 heures (les tubes sont portés au vortex tous les quarts d'heure). A la fin de cette période d'incubation, 30 μ l d'une solution de protéinase K à 10 mg/ml sont ajoutés au mélange qui est homogénéisé puis incubé à 37°C pendant une heure.

L'extraction des acides nucléiques est réalisée dans un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1). 1 ml du matériel lysé est transféré dans un tube Eppendorf de 2 ml et complété avec 1 ml du mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Le tube est agité vigoureusement pendant 2 min puis centrifugé à 10.000 g pendant 10 min. Il se forme alors deux phases, séparées par une interface constituée des débris cellulaires. La phase supérieure (phase aqueuse) contenant les acides nucléiques est transférée dans un Eppendorf. L'extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique est répétée au moins deux fois selon la quantité de matériel retrouvée à l'interface.

Les acides nucléiques obtenus sont précipités en ajoutant au matériel recueilli 1/10 de volume d'une solution d'acétate de sodium 3 M pH 4,6 et 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C. Les tubes sont agités pendant 2 minutes puis laissés au repos pendant 2 heures à -20°C. Une centrifugation de 20 minutes à 10.000 g permet de récolter les acides nucléiques précipités. Le culot est purifié par lavage avec 1 ml d'éthanol 70% préalablement refroidi à -20°C. On procède à une centrifugation de 5 minutes pour éliminer l'éthanol. Le culot d'acide nucléique est séché à l'air (température ambiante) pendant 15 min avant d'être dissout dans 100 µl d'eau distillée stérile. La qualité et la quantité de l'ADN sont déterminées par spectrophotométrie. La densité optique d'une dilution 1% (v/v) est déterminée à 260 nm et 280 nm. Le degré de pureté est évalué par le rapport des valeurs 260/280 qui doit être compris entre 1,8 et 2. La concentration d'ADN est estimée à partir de la valeur d'absorbance à 260 nm, en tenant compte du fait qu'une unité de DO 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN bicartenaire.

8.4.2. PCR du gène de l'ARNr 16S

L'ADNr 16S est amplifié avec un couple d'amorces universelles, 16F27 : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et 16R1522 : 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' localisé respectivement aux positions 8-27 et 1541-1522 selon le système de nomenclature en vigueur chez *Escherichia coli* (Brosus et al., 1978). Ce couple d'amorces est utilisé pour amplifier l'ADNr 16S de plusieurs genres bactériens, dont les *Bacillus*, et les *Lactobacillus*.

Les amplifications (PCR) sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µl contenant :

- 20 µM de chaque dNTP (Eppendorf, Belgique)
 - 0,1 µM de chacune des amorces (Pharmacia, France)
 - 1 unité de *Taq* polymérase (Master Mix Eppendorf)
 - 5 µl du tampon de réaction 10x concentré (Master Mix Eppendorf)
 - 1 µl d'ADN matrice (environ 50 ng)
 - de l'eau filtrée pour compléter le volume à 50 µl.
-

Les étapes successives de la réaction d'amplification sont réalisées en condition d'automatisation, dans un amplificateur de type Master Cycle Personal system Eppendorf.

Etapes successives de la réaction d'amplification :

- 1 → 95°C (5 min)
- 2 → 95°C (1 min)
- 3 → 58°C (30 sec)
- 4 → 72°C (2 min)
- 5 → Les étapes 2 à 4 sont répétées 32 fois
- 6 → 72°C (10 min)

8.4.3. Contrôle de la réaction de PCR par électrophorèse

La qualité de l'amplification est vérifiée par migration du produit de réaction sur un gel horizontal d'agarose. 12 µl de la réaction d'amplification sont prélevés et additionnés de 3 µl de bleu de charge (bleu de bromophénol 0,025 % (p/v), glycérol 3 % (p/v), EDTA 1mM). L'amplifiat est visualisé par électrophorèse sur un gel d'agarose 1,5 % (p/v) coloré avec une solution de bromure d'éthidium (BEt). La migration des amplicons est réalisée dans un tampon TAE (Tris de base 40 mM, acide acétique 40 mM, EDTA 2 mM pH 6,8), dans un champ électrique de 4 V.cm⁻¹, pendant 45 minutes. Le gel est photographié avec un film Polaroid positif, sous une source UV de longueur d'onde 260 nm. La présence d'une seule d'ADN à 1500 pb sur l'image obtenu est le témoignage d'une bonne amplification.

8.4.4. Séquençage du gène de l'ARNr 16S

Les nucléotides et amorces non incorporés lors de la PCR sont éliminés des produits d'amplification par filtration sur des Microcons de type YM-100 (Millipore, Belgique). L'ADN ainsi purifié est d'abord quantifié par électrophorèse dans un gel d'agarose 0,8% (p/v), à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire dont la concentration est connue. Les réactions de séquençage sont effectuées selon la méthode de Sanger, à l'aide du Kit de séquençage automatique ABI Prism® BigDye® terminator version 3.1 (Applied Biosystems, USA). Le programme d'amplification PCR utilisé pour les réactions de séquençage est proposé par le fabricant du Kit. Les quatre couples d'amorces utilisés pour séquencer à différentes positions dans le gène de l'ARNr 16S sont montrés dans le tableau 8.1.

Tableau 8.1 : Amorces universelles utilisées pour le séquençage des deux brins d'ADN du gène de l'ARNr 16S (Y = C, T ; R = A, G ; M = C, G ; W = A, T)

Couples	Séquences
(F1/R1)	(5'-CTGGCTCAGGAYGAACG-3' / 5'-CTGCTGGCAGTAGTTAG-3')
(F2/R2)	(5'-GAGGCAGCAGTRGGGAAT-3' / 5'-AATCCTGTTYGCTMCCCA-3')
(F3/R3)	(5'-ACACCARTGGCGAAGGC-3' / 5'-CCAACATCTCACGACACG-3')
(F4/R4)	(5'-GCACAAGCGGYGGAGCAT-3' / 5'-TGTGTAGCCWGGTCRTAAG-3')

La séparation des fragments marqués sur colonne capillaire et la détermination des séquences nucléotidiques sont réalisées par la Spin-off Progenus (Gembloux, Belgique). Les culots séchés sont remis en solution dans 10 µl de formamide et soumis à l'électrophorèse capillaire sur le séquenceur ABI Prism® 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Les profils électrophorétiques sont analysés grâce au logiciel *Genescan Analysis* (Applied Biosystems). Les séquences obtenues pour chacun des brins d'ADN sont complémentées et inversées dans le logiciel *Vector NTI* (Informax, Invitrogen, Maryland, USA) afin d'obtenir la séquence consensus finale.

8.4.5. Analyse phylogénétique des séquences obtenues

Les analyses phylogénétiques des séquences obtenues sont effectuées à l'aide des logiciels *Genecompar* (Applied, Maths, Belgium) et *Vector NTI* (Informax, Invitrogen, Maryland, USA). Les séquences d'ADNr 16S obtenues (1500 pb environ) sont alignées et comparées par rapport à celles contenues dans les catalogues internationaux (NCBI/Genbank). Les résultats de ces analyses sont traduits en dendrogramme pour mettre en évidence les homologies entre les nouvelles souches et les souches types des espèces connues dans ces catalogues.

CHAPITRE 9. ETUDE DE LA SPORULATION DES BACTERIES ACIDIFIANTES

9.1. Conduite générale de l'étude

9.1.1. Milieux de culture utilisés pour la sporulation

Les essais de sporulation en fiole sont réalisés dans le GYP, et dans trois autres milieux décrits par Cavazzoni et Adami (1993), pour leur efficacité dans la sporulation de *Bacillus coagulans*.

- Milieu UM20 : Corn steep 40 g/l ; Extrait de levure 2 g/l ; Hydrolysats de caséine 2 g/l ; pH 7,2
- Milieu SM2 : Corn steep 20 g/l ; Extrait de levure 5 g/l ; Hydrolysats de caséine 2 g/l ; Lactosérum 3 g/l ; Amidon de blé 2 g/l ; K₂HPO₄ 1 g/l ; pH 7,2
- Milieu TJ : 500 g de tomate sont broyés grossièrement, macérés dans un litre d'eau de robinet pendant deux heures, puis filtrés et stérilisés à 120°C pendant 20 min

9.1.2. Méthode de calcul des rendements de sporulation

La quantité de spores produites est déterminée par dénombrement sur milieu gélosé (GYP) après un choc thermique à 80°C pendant 10 minutes. Les rendements de sporulation sont calculés par l'équation suivante :

$$\% \text{ Spores} = \frac{\text{Biomasse viable après choc thermique (cfu / ml)}}{\text{Biomasse totale viable (cfu / ml)}} \times 100$$

9.2. Production de spores en fiole (milieu liquide)

Les expériences de sporulation en milieu liquide sont réalisées en fioles de 500 ml avec des volumes de 100 à 150 ml de bouillon. Les cultures sont inoculées à partir de précultures de 24 heures réalisées dans un bouillon GYP. Les fioles sont incubées à la température optimale de croissance des bactéries, sous agitation orbitale (130 rpm) pendant 3 jours.

9.3. Production de spores en fermenteur (milieu liquide)

Dans le but de déterminer l'impact de l'aération sur la sporulation de *B. coagulans*, les cultures sont réalisées en milieu contrôlé, dans un fermenteur de deux litres, de type BIOSTAT. Ce fermenteur possède une cuve en verre surplombée de nombreuses interfaces (entrée et sortie) situées sur son couvercle. Certaines interfaces sont spécialisées, comme c'est le cas pour l'entrée et la sortie de l'air. Les cultures sont effectuées dans ce fermenteur avec 1,5 litres de bouillon GYP. La température est maintenue à 45°C et le pH est fixé à 7,0±0,1 (KOH 5N et HCl 10%) et une agitation limitée à 120 rpm. L'aération est le seul paramètre physique qui varie d'un essai à l'autre. Les essais sont effectués avec des débits d'aération de 1 l/min (soit 0,6 vvm), 2 l/min (soit 1,3 vvm) et 3 l/min (soit 2 vvm) ; vvm : volume d'air injecté par minute, par rapport au volume de milieu dans le réacteur. Les cultures durent 72 heures.

9.4. Production de spores sur milieu gélosé (milieu solide)

Des boîtes de gélose GYP sontensemencées en surface, chacune avec 100 µl d'une préculture de 24 heures. Après 72 heures d'incubation à la température désirée l'ensemble de la biomasse produite à la surface d'une boîte de Pétri est récupérée dans 20 ml d'eau physiologique stérile.

9.5. Production de spores dans les gels de *k*-carraghénane (milieu solide)

La production de spores dans un milieu GYP gélifié avec du *k*-carraghénane est réalisée dans des fioles de 500 ml. Pour la préparation du gel 1,5 g de *k*-carraghénane sont ajoutés à 100 ml de bouillon GYP. Le milieu est homogénéisé pendant 5 minutes puis stérilisé à 120°C pendant 20 min. Après stérilisation, le milieu est refroidi dans un bain-marie et maintenue à 55°C. Il est ensuiteensemencé avec 1 ml d'une préculture de 24 heures et homogénéisé rapidement avant d'être laissé à la température ambiante pendant 30 minutes pour la formation du gel. Les cultures sont incubées à 45°C pendant 72 heures. A la fin de la période d'incubation, les fioles sont placées dans un bain marie à 60°C pendant 15 minutes pour la liquéfaction du gel, un prélèvement de 1 ml est alors effectué pour les dénombrements cellulaires.

9.6. Production de spores dans les billes d'alginate (milieu solide)

L'alginate de sodium utilisé pour ce travail est de type PROTANAL LF 5/60 (Roland, Belgique). La formation des billes utilise une propriété particulière de l'alginate de sodium qui se gélifie lorsqu'il se trouve en présence d'une solution de chlorure de calcium (CaCl₂). Pour la production de spores avec les billes d'alginate deux

modes d'immobilisation sont envisagés : d'une part l'inclusion des cellules dans les billes et d'autre part l'immobilisation des cellules à la surface de billes préformées.

9.6.1. Immobilisation des cellules par inclusion dans les billes d'alginate

100 ml de milieu GYP (avec 5 g/l de CaCO_3) concentré deux fois et 100 ml d'une solution d'alginate à 3% sont préparés. La solution d'alginate est ensuite complétée avec le milieu GYP concentré. Le mélange est homogénéisé puis transvasé dans une fiole de 500 ml. La fiole est fermée avec de l'ouate traversée par un tuyau, dont l'un des bouts se trouve dans le milieu et l'autre associé à une pipette pasteur dont le rôle est de régler la vitesse de sortie du milieu. Des pinces de Mohr sont disposées sur le tuyau pour empêcher tout écoulement du milieu. L'ensemble du dispositif (tuyau, pipette pasteur et fiole) est enveloppé dans du papier aluminium, et stérilisé à 120°C pendant 20 min. 500 ml d'une solution de CaCl_2 1 M, sont stérilisées séparément dans une fiole de 1 litre. Après stérilisation le bouillon et la solution de CaCl_2 sont emmenés sous une hotte à flux laminaire et refroidis à la température ambiante. Le milieu contenant 1,5 % (p/v) d'alginate estensemencé avec 2 ml d'une préculture de 24 heures et mélangé sur un agitateur. Une pompe péristaltique est utilisée pour laisser tomber goutte à goutte le milieu dans la solution de chlorure de CaCl_2 stérile. Les billes formées sont ensuite laissées au repos pendant 1 heure dans la solution de calcium, avant d'être débarrassées de cette solution et incubées à 45°C pendant 72 heures (voir schéma [9.1](#)).

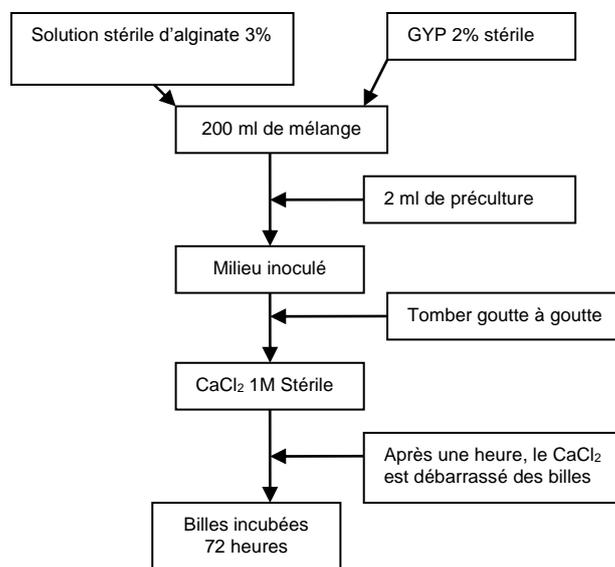


Figure 9.1 : Procédure d'inclusion des cellules dans un gel d'alginate pour la production de spores

9.6.2. Immobilisation sur des billes d'alginate préformées

Les billes d'alginate sont fabriquées à partir de 200 ml de bouillon GYP fabriqué avec 1,5 % (p/v) d'alginate de sodium. Les billes formées sont complétées avec 50 ml de bouillon GYP puis stérilisées à 120°C pendant 20 min. A la fin de la stérilisation les billes sont refroidies à la température ambiante avant d'être séparées du milieu liquide à l'aide d'un filtre entonnoir stérile. Les billes sont inoculées en surface avec 2 ml d'une préculture de 24 heures puis mélangées avant d'être incubées à 45°C pendant 72 heures (schéma 9.2).

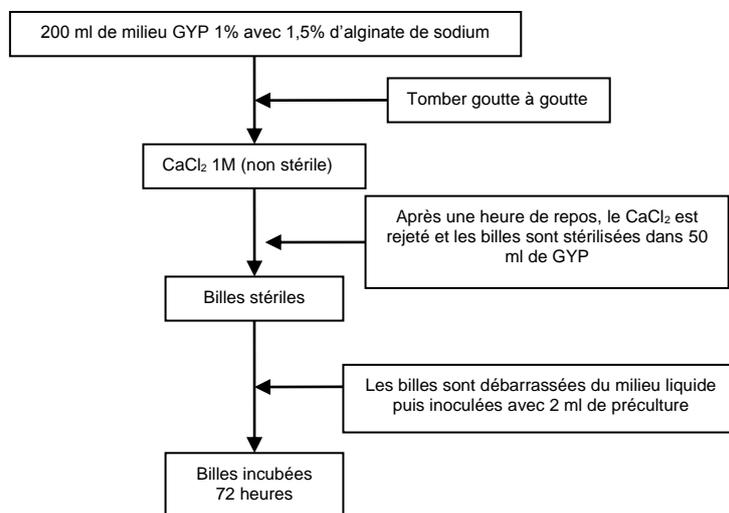


Figure 9.2 : Procédure de culture des cellules sur des billes d'alginate préformées.

9.6.3. Technique de récolte des cellules immobilisées sur bille d'alginate

A la fin de la période d'incubation, la biomasse formée sur les billes d'alginate est recueillie soit par rinçage avec de l'eau distillée stérile, soit par dissolution dans un tampon phosphate 0,5 M pH 7. Cette dissolution est possible grâce au déplacement des ions calcium entrant dans la formation des billes. Environ 50 ml de tampon phosphate 0,5 M, sont nécessaires pour faire dissoudre 200 ml de billes d'alginate. Pour obtenir une meilleure dispersion des cellules, les solutions obtenues sont homogénéisées à l'ultraturax pendant 2 mn.

9.6.4. Lyophilisation des produits récoltés

Les solutions obtenues de la dissolution des billes d'alginate sont concentrées par centrifugation puis séchées par lyophilisation. A la fin de la lyophilisation, le poids de la poudre obtenue est déterminé, puis un dénombrement de la biomasse est réalisé par dissolution de 1 g de poudre dans 99 ml d'eau physiologique. La solution est homogénéisée pendant 2 heures avant d'être utilisée pour les dilutions de 10 en 10.

9.7. Evaluation du quorum sensing dans la sporulation de *Bacillus coagulans*

9.7.1. Extraction des substances actives sur la sporulation

L'existence de facteurs extracellulaires de sporulation dans les cultures de *B. coagulans* est mise en évidence selon la méthode de Tseng et Labbe (2000). Cette expérience consiste essentiellement en la concentration (de 25 à 50 fois) de l'ensemble du milieu extracellulaire de culture. Des surnageants ont ainsi été concentrés à partir de cultures effectuées en bouillons, sur géloses et dans des billes d'alginate, avant d'être testés sur la sporulation de *B. coagulans*.

9.7.1.1. Concentration du milieu extracellulaire à partir d'un bouillon GYP

Une culture de *B. coagulans* est réalisée dans un bouillon GYP pendant 24 heures, puis séparée par centrifugation à 10.000 g pendant 30 minutes. Le surnageant de centrifugation est complété par du PMSF pour atteindre la concentration de 1 mM, avant d'être séché par lyophilisation. La poudre obtenue est mise en solution aqueuse de sorte que sa concentration soit 25 fois supérieure à celle du surnageant lyophilisé. Les solutions obtenues, sont stérilisées par filtration sur des Acrodisc de 0,45 μm puis conservées à -20°C (Schéma 9.3).

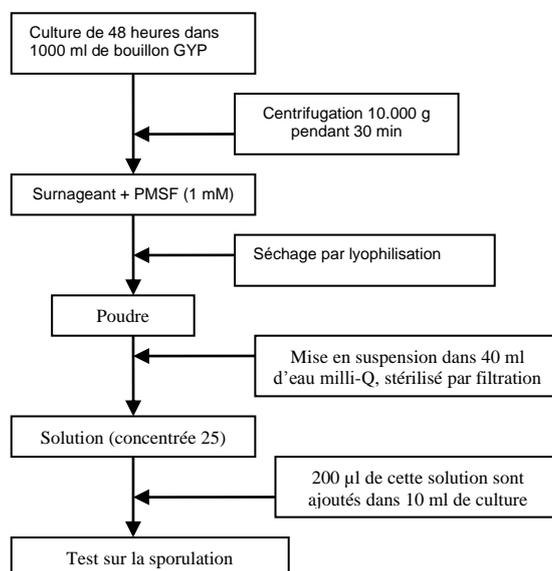


Figure 9.3 : Préparation des solutions concentrées à partir de culture en bouillon GYP.

9.7.1.2. Concentration du milieu extracellulaire à partir des géloses GYP

50 boîtes de gélose GYP sont ensemencées sur toute leur surface et incubées à 45°C pendant 24 heures. A la fin de l'incubation, la biomasse formée à la surface des géloses est récoltée avec une solution aqueuse stérile de PMSF 1 mM (2 x 5 ml par boîte). Le matériel récolté est séparé par centrifugation à 10.000 g pendant 30 min. Le surnageant est récupéré dans une fiole puis séché par lyophilisation. La poudre obtenue est mise en solution aqueuse de sorte que sa concentration finale soit 50 fois supérieure à celle du surnageant lyophilisé. Les solutions concentrées sont stérilisées par filtration sur des Acrodisc de 0,45 µm puis conservées à -20°C (schéma 9.4).

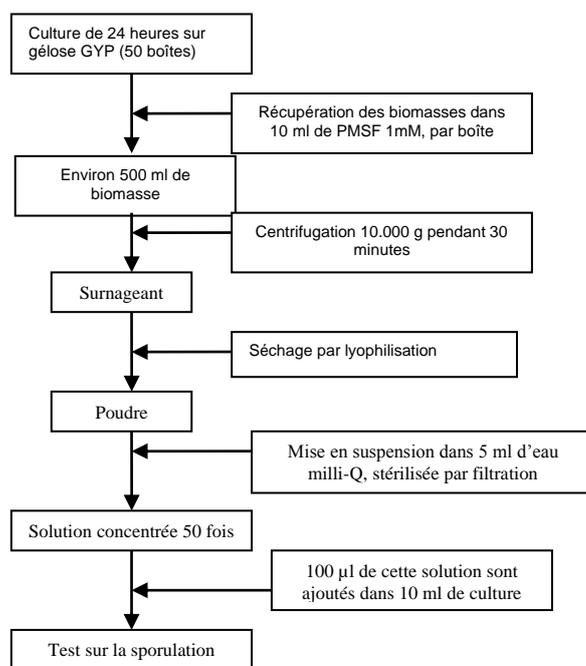


Figure 9.4 : Préparation des facteurs de sporulation concentrés à partir de culture sur géloses GYP.

9.7.1.3. Concentration du milieu extracellulaire à partir des billes d'alginate

Une culture de *Bacillus coagulans* est réalisée avec des billes d'alginate pendant 24 heures. A la fin de la période d'incubation, les

billes sont dissoutes par congélation-décongélation. Cette technique de dissolution des billes d'alginate a l'avantage de ne pas faire appel à un liquide complémentaire, évitant ainsi la dilution des produits. Elle consiste à placer les billes d'alginate à -20°C pendant une nuit, puis à les décongeler à la température ambiante (pendant 4 à 6 heures). Le produit dégelé est séparé par centrifugation à 10.000 g pendant 30 min. Le surnageant est recueilli dans une fiole puis complété avec du PMSF (1mM) avant d'être séché par lyophilisation. La poudre obtenue est mise en solution aqueuse de sorte que sa concentration finale soit 50 fois supérieure à celle du surnageant qui a été lyophilisé. Les solutions obtenues, sont stérilisées par filtration sur des Acrodisc de $0,45\ \mu\text{m}$ puis conservées à -20°C (schéma 9.5).

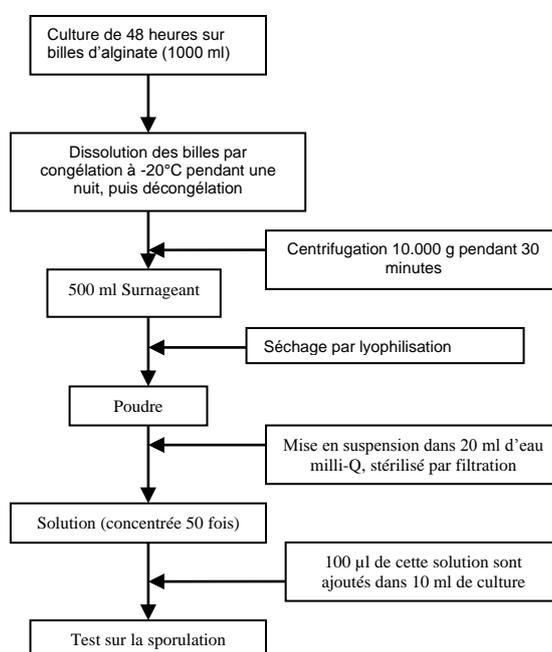


Figure 9.5 : Préparation des facteurs de sporulation concentrés à partir de culture sur billes d'alginate.

9.7.1.4. Préparation des échantillons témoins

Suivant les modes opératoires précédemment décrits, des solutions concentrées sont préparées à partir de milieux (bouillon, géloses et billes d'alginate) non ensemencés contenant du PMSF (1mM). Ces solutions sont utilisées comme témoins pour montrer que les activités observées ne sont pas dues à des composants du milieu de culture.

9.7.1.5. Tests sur la sporulation de *B. coagulans*

Pour l'évaluation de l'activité des substances concentrées sur la sporulation, des cultures de 10 ml sont utilisées. 100 µl des solutions concentrées, issus des géloses et des billes d'alginate sont utilisés et 200 µl des solutions concentrées issus des bouillons. Un blanc (sans ajout de facteurs de sporulation) et un témoin sont réalisés pour confirmer l'action des facteurs de sporulation. Toutes les fioles sont inoculées avec 1% de préculture et incubées à 45°C sous agitation orbitale (130 rpm) pendant 24 heures. A la fin de la période d'incubation, la biomasse totale et la quantité de spores formées dans chaque échantillon sont déterminées.

9.8. Caractérisation des facteurs de sporulation

9.8.1. Test de stabilité aux températures extrêmes

La résistance des facteurs de sporulation à la chaleur est déterminée selon la méthode décrite par Tseng et Labbé (2000). 200 µl de solutions concentrées, sont exposés à 45°C pendant 2 heures et à 80°C et 100°C pendant 20 mn. Ces solutions sont ensuite refroidies et testées sur des jeunes cultures.

9.8.2. Test de résistance aux pH extrêmes

La stabilité des facteurs de sporulation aux pH acides et alcalins est évaluée à pH 2 et pH 11 selon la méthode de Shih et Labbé (1996). 1 ml de solution concentrée, est complété avec 9 ml d'eau stérile. 4,5 ml du mélange sont acidifiés avec du HCl 1N pour être ajusté à pH 2, et les 4,5 ml restant sont alcalinisés avec du NaOH pour être ajusté à pH 11. Ces solutions traitées, sont incubées à 37°C pendant 2 heures puis neutralisées (pH 7,0). Pour les tests biologiques, 1000 µl de ces solutions sont ajoutées à 10 ml de bouillon.

9.8.3. Test de résistance aux protéases

L'activité des facteurs de sporulation vis-à-vis de l'action de la protéinase K, de la papaïne, de la trypsine, de la chymotrypsine et de la pepsine, est étudiée selon la méthode de Waldburger *et al.* (1993). 100 µl des facteurs de sporulation concentrés 50 fois sont mélangés dans 1000 µl d'une solution enzymatique (1 mg/ml), pH 7,2 et incubés à 37°C pendant 2 heures. La solution est ensuite stérilisée par filtration sur Acrodisc 0,45 µm puis testée sur 10 ml de bouillon.

9.8.4. Séparation des facteurs de sporulation sur colonne SPE-C18

La séparation des composés actifs sur la sporulation est réalisée sur une colonne IST Isolute C18 EC contenant 1 g de silice greffée. La colonne octadecyl-C18 contient une phase stationnaire de type Si-C₁₈H₃₇, qui permet l'extraction de plusieurs types de

composés organiques. Cette colonne se présente sous la forme d'une seringue sans piston, dans le fond de laquelle se trouve la phase stationnaire permettant la rétention de toutes les molécules hydrophobes. La séparation est effectuée selon le schéma 9.6.

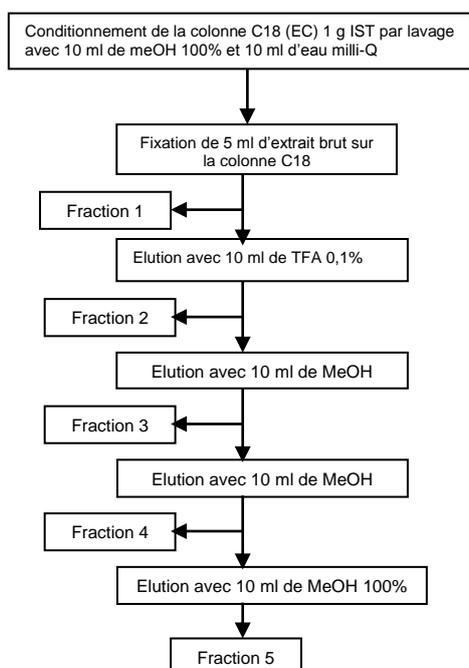


Figure 9.6 : Procédure de fractionnement des facteurs de sporulation sur colonne C18.

Les cinq fractions éluées sont séchées au Speed-vac. Les poudres obtenues sont mises en suspension dans 1 ml d'eau stérile. Le mélange est homogénéisé et centrifugé à 10.000 g pendant 10 min pour être débarrasser des substances insolubles avant d'être filtré sur un Acrodisc de 0,45 μm . Pour les tests de sporulation 20 μl de cette solution sont ajoutés à 10 ml de bouillon GYP.

9.9. Activité des facteurs de sporulation de *B. coagulans* sur la croissance de *B. subtilis* S499

L'activité des facteurs de sporulation de *Bacillus subtilis* est testée sur la croissance de la souche *B. subtilis* S499 (collection du CWBI), dans un milieu optimisé pour la croissance de cette bactérie (Jacques *et al.*, 1999).

Les cultures de *B. subtilis* S499 sont réalisées dans 100 ml de bouillon avec des quantités de facteurs de sporulation de 100 μl et

1000 µl. Une fiole témoin est également constituée. Les cultures sont incubées à 30°C pendant 72 heures. Des dénombrements sont réalisés sur les cultures à 10 h, 24h, 48h et 72 heures pour déterminer les quantités de spores formées. Des aliquotes de 20 ml de cultures sont utilisés pour l'extraction et le dosage des lipopeptides.

Milieu de croissance pour *B. subtilis*
(Jacques *et al.*, 1999)

Saccharose	20 g/l
Peptone de caséine	30g/l
Extrait de levure	7 g/l
KH ₂ PO ₄	1,9 g/l
Acide citrique	10 mg/l
MgSO ₄	0,45 g/l
MnSO ₄	3,6 mg/l
H ₃ BO ₃	0,01 mg/l
CuSO ₄	0,001 mg/l
FeCl ₃ (6H ₂ O)	0,005 mg/l
Na ₂ MoO ₄	0,004 mg/l
KI	0,002 mg/l
ZnSO ₄ (7H ₂ O)	0,014 mg/l

9.9.1. Extraction des lipopeptides produits

L'extraction des lipopeptides produits par *B. subtilis* S499 est effectuée sur colonne IST Isolute C18 EC contenant 5 g de silice greffée. Les colonnes sont équilibrées par lavage avec 40 ml de méthanol 100%, ensuite 40 ml d'eau Milli-Q. 20 ml d'échantillon sont fixés sur la colonne, lavés avec 40 ml d'eau milli-Q et 40 ml de solution aqueuse de MeOH 50%. Les lipopeptides sont élués avec deux fois 20 ml de méthanol 100%. Les 40 ml d'éluat sont concentrés au Rotavapor puis repris dans 3 ml de méthanol 100%. Le produit concentré est séché au Speed-Vac, puis repris dans 300 µl d'eau milliQ.

9.9.2. Dosage des lipopeptides par HPLC-C18

Un aliquote de 10 µl de la solution de lipopeptide est analysé par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) sur une colonne de phase inverse C18 ; Pep Rpc (15 µm ; 50/5 mm); avec un débit de 1 ml/min.

Les lipopeptides sont élués avec différents solvants selon leur polarité :

- les iturines sont éluées avec une solution d'acétonitrile à 35 % : H₂O/acétonitrile/ acide trifluoroacétique (TFA) (65/35/0,1 ; v/v/v) ;

- les fengycines sont éluées avec une solution d'acétonitrile à 45 % : H₂O/acétonitrile/TFA (55/45/0,1 ; v/v/v) ;
- les surfactines sont éluées avec une solution d'acétonitrile 80% : H₂O/acétonitrile/TFA (20/80/0,1 ; v/v/v).

Le dosage d'échantillons standards permet de tracer des droites étalons et de calculer ainsi la quantité de lipopeptides injectée en fonction de l'aire des pics.

Les lipopeptides sont détectés à la sortie de la colonne par une mesure de l'absorbance à 214 (absorbance de la liaison peptidique) et à 280 nm (absorbance de la chaîne latérale des acides aminés aromatiques).

CHAPITRE 10. CONSTITUTION D'UNE COLLECTION DE BACTERIES ACIDIFIANTES

10.1. Introduction

Ce travail a été entrepris dans le but de constituer une collection de nouvelles bactéries acidifiantes apparentées au genre *Bacillus*, susceptibles d'intéresser les bio-industries. Les environnements de fermes du Burkina Faso ont été choisis comme lieux de sélection pour la recherche de ces bactéries, car les micro-organismes capables de se maintenir et de se développer dans ce type d'environnement chaud et sec possèdent le plus souvent une excellente adaptation aux conditions extrêmes.

10.2. Echantillonnages et conditions de sélections

Trois prélèvements de sols ont été effectués dans le voisinage d'animaux de ferme au Burkina Faso. Chaque prélèvement était constitué de 500 g de matériaux, constitué essentiellement de terre, de matériel fécal et de reste de nourriture. Deux prélèvements ont été effectués dans le voisinage des vaches, dans la ville de Dori (Nord du Burkina Faso), et un prélèvement a été effectué dans un poulailler dans la ville de Ouagadougou (centre du Burkina Faso).

La technique de sélection utilisée a été adaptée à notre étude à partir des travaux de Nakayama et Yanoshi (1967a), consacrés à la sélection de bactéries acidifiantes appartenant aux genres *Bacillus* et *Sporolactobacillus*. Les isollements ont été réalisés avec une technique d'enrichissement sélective permettant d'écarter du lot les micro-organismes non sporulants ainsi que les bactéries aérobies et anaérobies strictes.

10.3. Expérience

Cinq grammes d'échantillon ont été mélangés dans 100 ml de bouillon GYP-NY (voir 6.2.1). Ce mélange a ensuite été traité à 80°C pendant 10 min, dans le but d'éliminer les bactéries non résistantes. Les cultures ont été incubées pendant 48 h à 30°C dans une jarre anaérobie, puis 100 µl de bouillon ont été étalés en surface sur une gélose GYP-NY contenant 0,005 % (p/v) de pourpre de bromocrésol. Les boîtes de géloses ont été incubées en atmosphère normale pendant 48 heures. Toutes les souches productrices d'acide et de catalase ont d'abord été repiquées sur de nouvelles boîtes puis les colonies constituées de bâtonnets réguliers ont été sélectionnées, purifiées et mises en collection au Centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI).

10.4. Résultats des isollements

La technique d'enrichissement utilisée, a abouti à l'isolement de plusieurs bactéries acidifiantes à partir des échantillons. La

plupart de ces isolats se présentaient sous forme de coques Gram positif et productrices de catalase. Ces coques ont été attribués selon l'arrangement de leurs cellules aux genres *Pediococcus* (paires et tétrades) et *Enterococcus* (paires et chaînes). Cette étude étant exclusivement destinée à la recherche de bactéries apparentées au genre *Bacillus* (bâtonnets réguliers), ces coques ont été écartés du lot réservé pour la caractérisation et l'identification.

Un nombre considérable de bacilles acidifiants et producteurs de catalase ont aussi été isolés et purifiés à partir des échantillons de sols. Le tableau 10.1, montre la liste complète de ces bactéries. Certaines bactéries présentées dans ce tableau sont caractérisées par la production de composés basiques lorsque les cultures sont maintenues dans l'incubateur durant de longues périodes (plus de 72 heures). Ce phénomène qui est révélé par le retour du pourpre de bromocrésol à sa coloration initiale (du jaune au pourpre) est connu chez la plupart des espèces du genre *Bacillus*. Cette alcalinisation est due à la production d'ammoniaque dans le milieu, à la suite de la bioconversion des acides aminés utilisés comme substrats. Ces bactéries alcalinisantes ont été mises en collection au CWBI, mais elles n'ont pas fait l'objet de travaux de caractérisation et d'identification. Un numéro de collection a été attribué à chaque isolat dans la collection de micro-organisme du CWBI.

Tableau 10.1 : Liste des souches isolées et purifiées dans ce travail

Souches	Origine géographique	Numéro de collection au CWBI	Observations
B2	Région Nord (Dori)	CWBI-B1082	Caractérisation
B6	Nord (Dori)	CWBI-B1086	Caractérisation
B13	Nord (Dori)	CWBI-B1084	Alcalinisation en fin de culture
BC	Nord (Dori)	CWBI-B60	Caractérisation
B21L	Nord (Dori)	CWBI-B1088	Alcalinisation en fin de culture
B61L	Nord (Dori)	CWBI-B616	Alcalinisation en fin de culture
C1	Nord (Dori)	CWBI-B1079	Alcalinisation en fin de culture
C15	Nord (Dori)	CWBI-B1080	Caractérisation
C21	Nord (Dori)	CWBI-B1081	Alcalinisation en fin de culture
D21	Nord (Dori)	CWBI-B1085	Alcalinisation en fin de culture
D81	Nord (Dori)	CWBI-B1087	Alcalinisation en fin de culture
P1	Région Centrale, (Ouagadougou)	CWBI-B1070	Caractérisation
P2	Centre (Ouagadougou)	CWBI-B623	Caractérisation
P51	Centre (Ouagadougou)	CWBI-B1071	Alcalinisation en fin de culture
P61	Centre (Ouagadougou)	CWBI-B1072	Alcalinisation en fin de culture
P71	Centre (Ouagadougou)	CWBI-B1073	Alcalinisation en fin de culture
P21	Centre (Ouagadougou)	CWBI-B1074	Alcalinisation en fin de culture

10.5. Conclusions

Les isolements ont montré la présence d'une importante quantité de bactéries acidifiantes dans le voisinage des fermes du Burkina Faso. La plupart des bactéries acidifiantes retrouvées dans ces environnements sont des coques lactiques apparentés aux genres *Pediococcus* et *Enterococcus*. L'isolement de ces coques lactiques dans les conditions réservées aux bactéries sporulantes peut s'expliquer à la fois par leur abondance dans les échantillons et par une adaptation environnementale. Parmi les souches présentées dans le tableau 10.1, seules les souches CWBI-B2, CWBI-B6, CWBI-P1, CWBI-C15, CWBI-P2 et CWBI-BC, ont fait l'objet de travaux approfondis, pour la détermination de leurs propriétés technologiques et leurs positions taxonomiques.

CHAPITRE 11. CONDITIONS DE CROISSANCE ET PROPRIETES TECHNOLOGIQUES

11.1. Introduction

L'intérêt des bactéries acidifiantes pour les bio-industries réside essentiellement dans leurs propriétés technologiques. Dans le cadre des préparations probiotiques, les conditions de croissance des micro-organismes contribuent à déterminer leur capacité à croître dans le tractus digestif des animaux. Ces paramètres constituent également un moyen de différenciation des isolats.

11.2. Détermination des conditions de croissance

11.2.1. Croissance en fonction de la température d'incubation

Pour la détermination de la température optimale de croissance des isolats, les cultures ont été réalisées dans des milieux liquides GYP, incubées à différentes températures (20°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C). Les résultats de ces tests ont été évalués par la mesure de la densité optique (D.O) des cultures à 550 nm, après 48 h d'incubation.

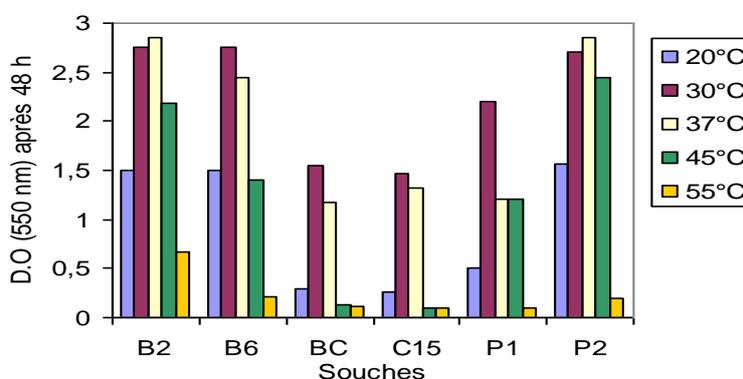


Figure 11.1: Croissance des isolats en fonction de la température, dans le milieu liquide GYP

La figure 11.1, montre l'évolution de la croissance des différents isolats en fonction de la température d'incubation des cultures. L'analyse de cette figure montre que les températures optimales de croissance pour l'ensemble des isolats sont comprises entre 30 et 37°C. Nous remarquons aussi que toutes ces souches ont des niveaux de croissance importants à 20°C et qu'elles sont pratiquement inhibées à 55°C, sauf pour la souche CWBI-B2. La plupart des bactéries acidifiantes appartenant aux genres *Bacillus* et

Sporolactobacillus sont mésophiles (Kitahara et Suzuki, 1963 ; Nakayama et Yanoshi, 1967a ; Yanagida *et al.*, 1997). Dans ce groupe, seuls *Bacillus coagulans* et *Bacillus smithii* possèdent un important caractère thermophile avec des températures optimales de croissance de 45°C et 55°C respectivement (Lawrence *et al.*, 1988). Ces deux espèces thermophiles sont d'ailleurs génétiquement très proches.

11.2.2. Croissance en fonction du pH du milieu d'incubation

Pour la détermination du pH optimal de croissance, les cultures ont été réalisées dans des bouillons GYP à différents pH. Ces pH ont été ajustés aux valeurs désirées (2 à 9) avec du NaOH et du HCl. Ces tests ont été évalués par mesure de la densité optique des cultures à 550 nm après 48 h d'incubation.

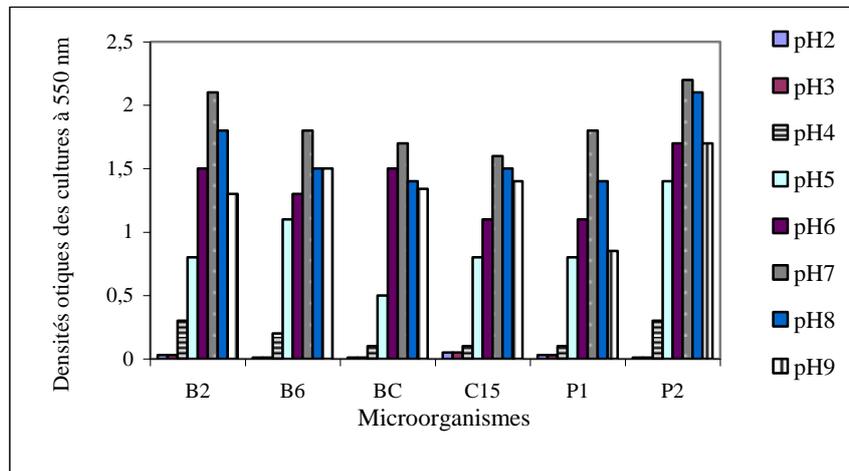


Figure 11.2: Effet du pH initial du milieu de culture sur la croissance des isolats, dans le milieu liquide GYP après 48 heures

La figure [11.2](#), montre l'évolution de la croissance des isolats en fonction du pH initial du milieu. Nous observons que malgré leur caractère acidogène, la croissance de ces bactéries est considérablement affectée par les pH acides. Aucun isolat ne se montre capable de se développer aux valeurs de pH 2, 3 et 4. Le pH optimal de croissance pour l'ensemble des isolats est compris entre pH 7 et pH 8. *B. laevolacticus*, *B. racemilacticus* ainsi que les espèces du genre *Sporolactobacillus* ont des comportements similaires (Nakayama et Yanoshi, 1967).

11.2.3. Croissance en fonction de la concentration en NaCl

Les besoins en chlorure de sodium pour la croissance ont été déterminés en milieux liquides GYP. Les milieux ont été préparés avec des concentrations en chlorure de sodium variant de 0,5 % à 10 % (p/v). L'effet de ces concentrations en sel sur la croissance a été évalué par mesure de la densité optique des cultures à 550 nm, après 48 h d'incubation.

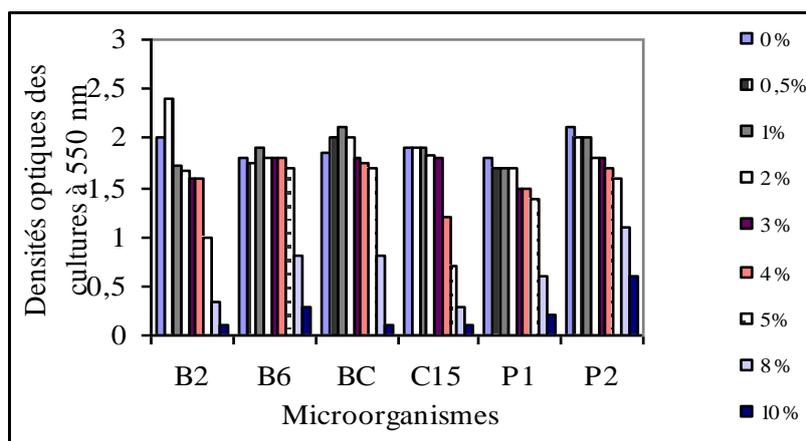


Figure 11.3: Effet du chlorure de sodium sur la croissance des isolats, dans le milieu liquide GYP après 48 heures (avec des concentrations en NaCl variant de 0,5 à 10 % p/v),

Les profils de croissance en fonction de la concentration en chlorure de sodium dans les cultures sont présentés dans la figure 11.3. L'analyse de cette figure montre que le chlorure de sodium n'est pas indispensable à la croissance des isolats. La croissance de la souche CWBI-B2 connaît une amélioration lorsqu'elle est effectuée avec 0,5 % (p/v) de NaCl dans le milieu. Le milieu GYP conseillé par Nakayama et Yanoshi (1967), pour la culture des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* est formulé avec 0,5 % (p/v) de chlorure de sodium. Nous observons que la croissance de toutes ces bactéries est significativement affectée pour les concentrations en NaCl supérieures à 5 % (p/v) et qu'elle est pratiquement inhibée lorsque cette concentration est supérieure à 10 %. La souche CWBI-P2 n'est pas une bactérie halophile mais nous observons qu'elle possède une importante tolérance au NaCl (même à 10 %).

11.2.4. Paramètres cinétiques de croissance

La croissance des micro-organismes est caractérisée par deux paramètres qui sont : le taux de croissance " μ " correspondant à la vitesse spécifique de croissance de la population, et le temps de

génération "g" correspondant au délai s'écoulant entre deux divisions cellulaires. Ces paramètres de croissance ont été déterminés pour le milieu liquide GYP. Les cultures ont été réalisées dans les conditions optimales de croissance de chaque bactérie et l'évolution de la croissance a été évaluée par la mesure de la densité optique des bouillons à 550 nm.

11.2.4.1. Résultats et discussion

Le tableau 11.1, montre les valeurs obtenues pour la détermination des paramètres cinétiques de croissance des différentes souches dans le milieu liquide GYP.

Tableau 11.1 : Paramètres cinétiques de croissance des bactéries étudiées, dans le milieu liquide GYP

Micro-organismes	Taux de croissance (h ⁻¹)	Temps de génération (h)	Temps de latence (h)
CWBI-B2	1,1	0,63	2,5
CWBI-B6	1,0	0,69	2,8
CWBI-BC	0,63	1,1	5,1
CWBI-C15	0,6	1,15	4,1
CWBI-P1	0,69	1,0	4,6
CWBI-P2	0,94	0,73	2,5
LMG 6326	0,72	0,96	5,3
LMG 16675	0,94	0,73	3,2
LMG 6938	0,98	0,7	3,6

LMG 6326: *B. coagulans*; LMG 16675: *B. laevolacticus*; LMG 6938: *B. racemilacticus*

Les temps de génération et les taux de croissance des isolats sont très variables. Nous remarquons que les souches CWBI-B2, CWBI-B6 et CWBI-P2 possèdent les taux de croissance les plus importants dans le milieu GYP. Les souches CWBI-BC, CWBI-P1 et CWBI-C15 ont des croissances plus lentes dans ce milieu. Pour ce qui concerne les temps de latence, nous observons que c'est *Bacillus coagulans* qui a le temps de latence le plus long dans le GYP, soit 5,3 heures environ.

11.3. Détermination des propriétés technologiques

11.3.1. Introduction

Les propriétés technologiques recherchées chez les bactéries acidifiantes varient en fonction des applications industrielles pour lesquelles ces bactéries sont destinées. Dans le cadre des

préparations probiotiques, les propriétés essentiellement recherchées sont :

- la production de composés inhibiteurs vis-à-vis des germes indésirables (acide lactique, bactériocines, H₂O₂, etc.)
- la capacité à coloniser le tractus intestinal, par la résistance au suc digestif (pH acides, sels biliaires, enzymes, etc.) et l'adhésion à la paroi intestinale.
- la production d'enzymes telles que les amylases, les lipases, les protéases, la β-galactosidase, etc.

Ce travail sur les propriétés technologiques des bactéries a été focalisé sur l'analyse des profils d'acidification, la résistance aux pH acides et aux sels biliaires conjugués et non conjugués, ainsi qu'à la production d'enzyme d'intérêt, notamment les lipases, protéases et amylases.

11.3.2. Profils de production d'acide lactique

La configuration de l'acide lactique produit par les bactéries utilisées dans les formulations alimentaires est importante, car seules les bactéries produisant l'isomère L(+) de ce composé sont autorisées par l'organisation mondiale de la santé (OMS) pour les préparations probiotiques destinées aux jeunes enfants (FAO/WHO, 2001). C'est sous cette forme que l'acide lactique est le plus facilement assimilable (Vaughan *et al.*, 1999). Dans l'industrie pharmaceutique et chimique, l'acide lactique est utilisé comme monomère pour la synthèse de nombreux polymères naturels. Dans ce type d'application les bactéries produisant des mélanges racémiques ne sont pas désirées (Jan *et al.*, 1993 ; Ohara et Yahata, 1996).

11.3.2.1. Expérience

La configuration et la quantité de l'acide lactique produite ont été déterminées par une méthode enzymatique faisant intervenir le lactate déshydrogénase (LDH, Boehringer Mannheim). Les dosages ont été réalisés sur des surnageants de culture de 48 heures dans un bouillon GYP.

11.3.2.2. Résultats et discussion

Les résultats de ces analyses, présentés dans le tableau 11.2, montrent que toutes les nouvelles souches produisent le même stéréo-isomère d'acide lactique, c'est-à-dire l'acide L(+) lactique. Parmi les bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* connues, seule *B. coagulans* produit du L(+) lactate. *B. racemilacticus* produit du (DL) lactate et *B. laevolacticus* du D(-) lactate. C'est peut être pour cela que *Bacillus coagulans* est la seule bactérie acidifiante du genre *Bacillus* qui fait l'objet d'exploitation industrielle comme probiotique (Cavazzoni *et al.*, 1993 ; Posenauer, 2000).

Tableau 11.2: Profils de production de l'acide lactique par les bactéries étudiées

Souches	CWBI B2	CWBI B6	CWBI C15	CWBI BC	CWBI P1	CWBI P2	LMG 6326	LMG 6938	LMG 16675
isomères	L (+)	L (+)	L (+)	L (+)	L (+)	L (+)	L (+)	DL	D (-)
Acide lactique (mg/ml)	3,2	4,2	4,3	4,2	4,5	9,1	5,2	6,6	5,3
Acide lactique (mg/ml/10⁸ CFU)	0,33	0,46	0,49	0,48	0,51	1,02	0,59	0,70	0,58
pH (48 h)	5,1	4,7	4,7	4,5	4,5	3,9	4,4	4,0	4,1

le type d'acide lactique a été déterminé par un dosage enzymatique utilisant le LDH.
 les pH et les quantités de lactate ont été mesurés dans le bouillon GYP après 48 h.
 LMG 6326 : *B. coagulans* ; LMG 6938 : *B. racemilacticus* ; LMG16675: *B. laevolacticus*

L'analyse de la quantité d'acide lactique produit par unité de milieu et par rapport à la biomasse présente dans les cultures montre que la souche CWBI-B2 possède la plus faible productivité en acide lactique par rapport aux autres souches. Cette bactérie produit une quantité moyenne 0,33 mg/ml/10⁸ CFU d'acide lactique après 48 heures de croissance dans le milieu GYP. Nous pouvons aussi remarquer que la souche CWBI-P2 est la plus acidifiante dans le milieu GYP avec une productivité moyenne de 1,02 mg/ml/10⁸ CFU d'acide lactique. Tous les autres isolats possèdent des productivités moyennes quasi similaires, variant de 0,46 mg/ml/10⁸ CFU pour la souche CWBI-B6 à 0,51 mg/ml/10⁸ CFU pour la CWBI-P1.

Concernant les souches de références utilisées dans ce travail, nous remarquons que c'est *B. racemilacticus* qui possède la meilleure productivité en acide lactique dans le GYP. Cette bactérie, produit en moyenne 0,7 mg/ml/10⁸ CFU d'acide lactique dans ce milieu. Selon les travaux de Nakayama et Yanoshi (1967a), cette bactérie produirait environ 9 g/l d'acide lactique. Les travaux antérieurs consacrés à la production d'acide lactique chez *B. coagulans* ont montré qu'il produisait des quantités variables de ce composé en fonction des souches utilisées. D'autre part, Payot *et al.* (1999) ont montré que plusieurs facteurs environnementaux (aération, concentration en sucre, etc.) influençaient la production d'acide lactique chez *B. coagulans*. Selon Jan *et al.* (1990), la production d'acide lactique par *B. laevolacticus* peut être amplifiée et portée à des niveaux intéressants pour les industries chimiques. La production d'acide lactique par *Bacillus coagulans* a été portée à 50 g/l en culture Batch et celle de *B. laevolacticus* à 13 g.l⁻¹.h⁻¹ en

culture continue dans des milieux constitués essentiellement de glucose et d'extrait de levure.

11.3.3. Tolérance aux pH acides et aux sels biliaires

La tolérance aux sels biliaires et aux pH acides constitue un critère physiologique déterminant dans la colonisation du tractus digestif par les micro-organismes (Prasad *et al.*, 1998). Les travaux de Hyronimus *et al.* (2000), ont montré que la capacité de former des endospores ne faisait pas des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* des bactéries résistantes à toutes les conditions physicochimiques du tractus digestif. Il se trouve en effet, que ces bactéries sont aussi sensibles que les bactéries non sporulantes aux sels biliaires et au pH acides (Hyronimus *et al.*, 2000 ; Spinosa *et al.*, 2000 ; Palop *et al.*, 1999).

11.3.3.1. Tolérance aux sels biliaires

Les sels biliaires sont des composées organiques très toxiques pour un grand nombre d'espèces bactériennes (Cosson et Deschamps, 1994). Selon Spinosa *et al.* (2000), les sels biliaires sont susceptibles d'inhiber la germination des spores chez certains *Bacillus*. Selon Salam et Berkorovainy (1993), la concentration minimale inhibitrice critique (CMI) pour les sels biliaires dans le cadre de la sélection de bactéries probiotiques est de 0,3 % (p/v), car la concentration en sels biliaires du petit intestin de l'homme est estimée 0,06 % (p/v).

11.3.3.1.1. Expérience

La tolérance des isolats à un mélange de sels biliaires conjugués et non conjugués de qualité analytique (Sigma) a été déterminée selon la méthode décrite par Hyronimus *et al.* (2000). Les souches ont été mises en culture sur des géloses GYP contenant des concentrations variables de sels biliaires. Les CMI, correspondant aux plus faibles concentrations en sels biliaires pour lesquelles aucune croissance n'est observée sur les géloses ont été déterminées après 5 jours de cultures.

11.3.3.1.2. Résultats et discussion

Les CMI déterminées pour les sels biliaires sont montrées dans le tableau 11.3. L'analyse de ce tableau laisse apparaître la grande sensibilité de la souche CWBI-BC pour ces composés (0,1 % p/v). Cette souche est d'ailleurs la seule à avoir une sensibilité inférieure à la valeur minimale recommandée pour la sélection des bactéries probiotiques (c'est-à-dire 0,3 %). Selon Hyronimus *et al.* (2000), les bactéries acidifiantes appartenant au genre *Sporolactobacillus* sont plus sensibles aux sels biliaires (CMI inférieur à 0,1 %) que celle appartenant au genre *Bacillus*. Les travaux de ces auteurs ont montré que *B. racemilacticus* et *B. laevolacticus*

présentaient une excellente résistance aux sels biliaires, avec des CMI supérieures 1 % (p/v), et que *B. coagulans* était plus sensible avec une CMI de 0,3 % environ.

Tableau 11.3: Tolérance aux sels biliaires

Souches	CWBI B2	CWBI B6	CWBI C15	CWBI BC	CWBI P1	CWBI P2	LMG 6326	LMG 6938	LMG 16675
CMI (%=p/v)	> 1 %	> 1 %	0,5 %	0,1 %	> 1 %	> 1 %	0,5 %	0,6 %	0,1 %

LMG 6326 : B. coagulans ; LMG 6938 : B. racemilacticus ; LMG 16675 : B. laevolacticus

D'une manière générale, les résultats obtenus dans ce travail sont similaires à ceux de Hyronimus *et al.* (2000). Nous pensons que plusieurs propriétés peuvent expliquer cette importante résistance, notamment l'adaptation environnementale des bactéries, ou leur capacité à hydrolyser ces composés, comme cela a été montré chez certaines bactéries lactiques (Brashears *et al.*, 1998 ; Klaver et van deer Meer, 1993).

11.3.3.2. La résistance des bactéries acidifiantes étudiées aux pH acides

Pour qu'une souche bactérienne ait une activité pendant son transit gastro-intestinal, il faut qu'elle survive au pH gastrique. Selon Chamba *et al.* (1994), il existe une corrélation suffisante entre la résistance des bactéries au pH acide du suc gastrique humain *in vivo*, et leur résistance à un pH acide *in vitro*.

11.3.3.2.1. Expérience

La résistance aux pH acides a été déterminée dans un tampon phosphate 0,5 M dont le pH a été ajusté à 3,0 et 2,5 selon la méthode décrite par Hyronimus *et al.* (2000). Les bactéries ont été maintenues dans ces milieux à 37°C pendant 3 heures. Les taux de survie ont été déterminés par dénombrement sur une gélose GYP, avant et après chaque traitement.

11.3.3.2.2. Résultats et discussion

La figure 11.4, montre les taux de résistance des différentes bactéries étudiées aux valeurs de pH 3,0 et pH 2,5 pendant 3 heures. L'analyse de cette figure montre que la quasi-totalité des isolats possède une excellente résistance à ces pH acides. Selon Chung *et al.* (1999), la résistance à pH 2,5 est une caractéristique qui n'est observée que chez quelques espèces du genre *Lactobacillus*. Les souches CWBI-B2, CWBI-B6 et *B. laevolacticus* sont les plus résistantes aux pH acides. Mais d'une manière générale, les niveaux

de résistance observés sont suffisants pour que ces bactéries survivent au transit gastro-intestinal et qu'elles s'implantent dans le tube digestif de l'homme.

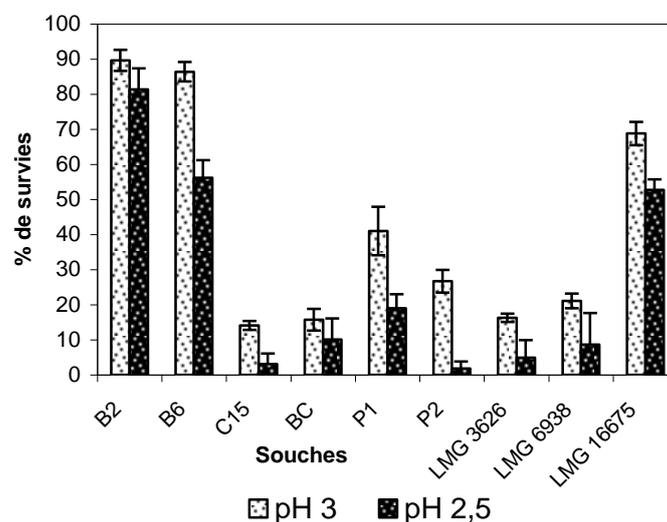


Figure 11.4: Tolérance des souches acidifiantes aux pH acides pendant 3 heures

Pour ce qui concerne *B. coagulans*, *B. racemilacticus* et *B. laevolacticus*, nos résultats ne correspondent pas à ceux de Hyronimus *et al.* (2000). En effet, ces auteurs avaient montré que ces trois bactéries ne possédaient pratiquement pas de résistance à pH 3,0 et pH 2,5 (0% de survie). Il en était de même pour certaines espèces du genre *Sporolactobacillus* sauf pour *S. inulinus* qui a montré un taux de survie de 15 % à 26 % à pH 3.

11.3.4. Production d'enzymes d'intérêts : amylases, protéases et lipases

La capacité des micro-organismes à hydrolyser les principales macromolécules (protéines, polysaccharides, lipides...) est une propriété intéressante dans la sélection des bactéries probiotiques. D'autre part, cette propriété apporte des informations intéressantes pour la différenciation des micro-organismes.

11.3.4.1. Expérience

Les productions de lipases, de protéases et d'amylases par les différentes souches ont été mises en évidence sur milieux solides GYP en présence des substrats correspondant à ces enzymes, selon une méthode décrite par Larpent et Larpent (1985).

11.3.4.2. Résultats et discussion

Les résultats des tests de production de lipases, amylases et protéases sont montrés dans le tableau 11.4. Nous remarquons dans ce tableau, qu'aucun isolat ne produit de lipases (pas d'hydrolyse de la tributyrine). Selon ces résultats, les souches CWBI-BC et LMG 16675 ont des activités amylolytiques et les souches CWBI-B2, CWBI-B6, CWBI-C15, CWBI-P1, LMG 6326 et LMG 16675 ont des activités protéolytiques. La souche CWBI-P2 est la seule bactérie qui ne montre aucune activité pour l'ensemble des enzymes recherchées.

Tableau 11.4: Quelques activités enzymatiques retrouvées chez les bactéries acidifiantes

Enzymes produites	CWBI B2	CWBI B6	CWBI C15	CWBI BC	CWBI P1	CWBI P2	LMG 6326	LMG 6938	LMG 16675
Amylases	+	-	-	+	+	-	-	-	+
Protéases	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Lipases	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) activité enzymatique ; (-) pas d'activité enzymatique

LMG 6326 : *B. coagulans* ; LMG 6938 : *B. racemilacticus* ; LMG 16675: *B. laevolacticus*

11.4. Conclusions

Les différentes souches étudiées, possèdent toutes des propriétés plus ou moins intéressantes. D'une manière générale, ces bactéries se développent assez bien dans le milieu GYP. Ce milieu peut pourtant être considéré comme un milieu minimum par rapport à ceux couramment utilisés pour la culture des *Lactobacillus* et apparentés. Les souches CWBI-BC, CWBI-C15 et CWBI-P1 possèdent les taux de croissance les plus faibles dans le bouillon GYP. Les productivités obtenues dans les cultures en fioles pour l'ensemble des bactéries laissent toutefois entrevoir des possibilités d'optimisation à travers des cultures contrôlées en fermenteurs.

La production d'acide L(+)-lactique par l'ensemble des nouvelles bactéries est en faveur de leur utilisation comme bactérie probiotique. Les quantités d'acide lactique produites ne sont pas très importantes, mais nous pensons qu'elles peuvent être améliorées notamment avec des conditions de cultures adéquates, à l'exemple de ce qui a été fait pour *Bacillus coagulans* (Payot *et al.*, 1999) et *Bacillus laevolacticus* (Jan *et al.*, 1990). La tolérance aux sels biliaires et à l'acidité ainsi que la production d'amylases et de protéases chez certains isolats sont également encourageantes pour leur utilisation comme bactéries probiotiques pour certains types d'applications.

CHAPITRE 12. TAXONOMIE POLYPHASIQUE POUR LA CARACTERISATION ET L'IDENTIFICATION DES ISOLATS

12.1. Introduction

Le terme "polyphasic taxonomy" a été introduit par Colwell en 1970, pour faire référence à une stratégie d'identification des micro-organismes tenant compte d'un nombre important de techniques et de données. Ce type de classification combine les informations apportées par les analyses écologiques, morphologiques, physiologiques, biochimiques, et génétiques afin de parvenir à des identifications plus objectives.

12.2. Caractérisation par l'analyse des propriétés microbiologiques

Les propriétés microbiologiques rassemblent un nombre de critères phénotypiques, faisant appel à des tests rapides et nécessaires pour la caractérisation des micro-organismes. Ces tests donnent des informations qui sont dans certains cas suffisantes pour classer des isolats dans des genres spécifiques. C'est le cas pour les *Bacillus* chez qui la morphologie des cellules, la position des spores, le caractère Gram positif et la production de catalase ont été utilisés pendant longtemps pour la classification des isolats (Claus et Berkeley, 1986).

12.2.1. Détermination du caractère Gram

Le caractère Gram est le premier critère de discrimination des bactéries. Selon cette caractéristique, on distingue deux groupes de bactéries, l'un dit Gram positifs et l'autre dit Gram négatifs. Ces deux groupes de bactéries diffèrent par la composition chimique et l'organisation de la structure des couches externes de leur membrane cytoplasmique. La paroi des bactéries Gram positives est essentiellement constituée d'un réseau de peptidoglycane (muréine), dans lequel se trouvent d'autres polymères tel que l'acide teichoïque et l'acide lipotéichoïque. Chez les bactéries Gram négatives cette muréine est plus mince, mais la principale particularité est la présence d'une couche externe composée essentiellement de lipopolysaccharides, de lipides et de lipoprotéines. Cette couche externe qui joue un rôle important dans le revêtement des bactéries Gram négative n'existe pas chez les bactéries Gram positives.

12.2.1.1. Expérience

La présence d'une couche externe de nature lipidique a été déterminée sur un frottis bactérien par la méthode du KOH, selon Gregersen (1978).

12.2.1.2. Résultats

Le test du KOH a montré que tous les isolats sont Gram positifs.

12.2.2. Analyse de la morphologie des cellules et des spores

Les caractéristiques morphologiques des cellules et des spores ont été les premiers critères de classification des *Bacillus*. Les espèces du genre *Bacillus* étaient ainsi réparties en trois groupes, selon la morphologie de leurs cellules et de leurs spores (voir tableau 3.1).

12.2.2.1. Expérience

Des observations ont été effectuées en microscopie à contraste de phase sur des jeunes (24 h) et vieilles (7 jours) cultures ensemencées sur milieux gélosés GYP.

12.2.2.2 Résultats et discussion

Les observations microscopiques ont révélé qu'il s'agissait pour l'ensemble des isolats, de bâtonnets réguliers dont les largeurs variaient entre 0,9 et 1,2 μm , et les longueurs de 2 à 6 μm (tableau 12.1). Des spores ont été observées chez tous les isolats à l'exception de la souche CWBI-P2 qui n'en produit pas. Les observations microscopiques réalisées sur cultures liquides ont mis en évidence des mobilités plus ou moins importantes chez l'ensemble des bactéries sporulantes.

Tableau 12.1: Caractéristiques morphologiques isolats.

Souches	Colonies	Cellules	Sporulation
CWBI-B2	Beiges, humides, envahissantes	Bâtonnets réguliers (1.2-1.5 x 4-8 μm) isolés, paire, courtes chaînes	Spore sub-terminale, non déformante
CWBI-B6	Beiges, sèches, collantes	Bâtonnets réguliers (0,9 x 2-4 μm) isolés, paire, courtes chaînes	Spores terminales, non déformantes
CWBI-BC	Beiges, sèches, envahissantes	Bâtonnets réguliers (1.0-1.2 X 4-6 μm) isolés, paire, courtes chaînes, très peu mobile	Spore sub-terminale ellipsoïdale, déformante,
CWBI-C15	Beiges, muqueuses, translucides	Bâtonnets réguliers (1.0-1.2 x 4-6 μm) isolés, paire, longues chaînes	Spore sub-terminale ; non déformante
CWBI-P1	Beiges, humides, envahissantes	Bâtonnets réguliers (1.0 x 2.5-4.0 μm) isolés, paire, courtes chaînes, mobile	Spore sub-terminale, non déformante
CWBI-P2	Blanches, arrondies, humides	Bâtonnets réguliers (1.0 x 1.5-3.0 μm) isolés, paire, courtes chaînes	Bactérie non sporulante

En supposant que les bactéries sporulantes (CWBI-B2, CWBI-B6, CWBI-BC, CWBI-C15 et CWBI-P1) appartiennent au genre

Bacillus, nous les avons classés dans deux lots, selon la morphologie et la position de leurs endospores:

- **Lot 1** : constitué des souches CWBI-B6, CWBI-C15, CWBI-P1 et CWBI-B2, pouvant être classées dans le **Groupe I** de la classification morphologique des *Bacillus*. Ces quatre isolats produisent des spores non déformantes, situées en position terminale ou sub-terminale. D'autre part, ces souches ne montrent pas d'inclusion de poly-bêta-hydroxybutyrate dans leur cytoplasme, ce qui nous permet d'envisager leur classement dans le **Groupe IB**, qui comprend *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, mais aussi toutes les bactéries acidifiantes appartenant au genre *Bacillus* connues, notamment *Bacillus coagulans*, *Bacillus laevolacticus* et *Bacillus racemilacticus*.
- **Lot 2** : constitué de la souche CWBI-BC, que nous attribuons au **Groupe II** de la classification morphologique des *Bacillus*. Cette souche produit une endospore ellipsoïdale, en position sub-terminale qui déforme le sporange de la cellule. Le Groupe II des *Bacillus* comprend plusieurs espèces dont *Bacillus circulans*, *B. macerans* et *Bacillus stearothermophilus*, mais aucune bactérie acidifiante connue. Les 10 premières bactéries transférées dans le nouveau genre "*Paenibacillus*" faisaient partie de ce groupe (*B. alvei*, *B. amylolyticus*, *B. azotofixans*, *B. gordonae*, *B. larvae*, *B. macerans*, *B. macquariensis*, *B. pabuli*, *B. polymyxa* et *B. pulvifaciens*).

12.2.3. Recherche de la catalase et la pseudocatalase

12.2.3.1. Introduction

La catalase et la pseudocatalase sont des enzymes nécessaires pour décomposer le peroxyde d'hydrogène qui est un composé toxique pour le métabolisme cellulaire. La présence d'une catalase fait partie de la définition du genre *Bacillus*, mais il est connu que certaines espèces de ce genre donnent des réactions négatives au test de la catalase. C'est notamment le cas de *B. azotoformans*, *B. lentimorbus* et *B. larvae* qui ne produisent pas la catalase (Claus et Berkeley, 1986). La pseudocatalase ou catalase de manganèse est essentiellement retrouvée chez certaines bactéries non sporulantes appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus* et *Enterococcus*.

12.2.3.2. Expérience

La production de catalase est révélée par le test du peroxyde d'hydrogène, consistant à observer le dégagement gazeux produit à la

suite du contact entre un frottis bactérien et une solution aqueuse de H₂O₂. La production de pseudocatalase est mise en évidence par le test de la benzidine. Ce test consiste à observer la coloration (bleue noire) qui apparaît sur un frottis bactérien mis en contact avec successivement de 50 µl du réactif de la benzidine et 50 µl d'une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène.

12.2.3.3. Résultats et discussion

Comme le montre le tableau 12.2, toutes les souches étudiées, sont catalase positive. Par contre la souche CWBI-P2 se singularise par sa réaction négative au test de la benzidine. Cette propriété fait de la souche CWBI-P2 un isolat assez spécial. En effet, l'absence de spores dans les cultures de cette bactérie nous laissait imaginer qu'il s'agissait d'un membre du genre *Lactobacillus*. Dans ce cas, nous nous attendions à observer une réaction positive au test de la benzidine. Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette réaction. Soit que la souche CWBI-P2 possède une peroxydase très particulière, ou alors que le test utilisé n'est pas efficace pour mettre en évidence la pseudocatalase. Nous pensons que les observations effectuées méritent d'être confirmées par d'autres moyens d'investigation de la pseudocatalase. Signalons que le test de la benzidine donne toujours des résultats positifs pour les espèces du genre *Bacillus*.

Tableau 12.2 : Résultats des tests catalase et pseudocatalase

Peroxydases	CWBI B2	CWBI B6	CWBI C15	CWBI BC	CWBI P1	CWBI P2	LMG 6326	LMG 16675	LMG 6938
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pseudocatalase	+	+	+	+	+	-	+	+	+

(+) activité enzymatique ; (-) pas d'activité enzymatique

LMG6326 : *B. coagulans* ; LMG6938 : *B. racemilacticus* ; LMG16675: *B. laevolacticus*

12.2.4. Détermination des types respiratoires et des voies fermentaires

Les bactéries acidifiantes, dites lactiques convertissent les sucres fermentescibles en acide lactique. Outre l'acide lactique, ces bactéries produisent également de l'acide acétique, de l'acide formique, de l'éthanol et du CO₂. En fonction du taux de conversion des sucres en acide lactique nous distinguons deux voies de fermentation chez ces bactéries. La voie homo-fermentaire utilisant la voie biochimique dite Embden-Meyerhof-Parnas, qui aboutit à un taux de conversion du glucose en acide lactique supérieur à 90%. Et la voie hétéro-fermentaire utilisant la voie dite des pentose-phosphates qui aboutit à

la formation quasi stœchiométrique d'une molécule de CO₂, d'une molécule d'éthanol et d'une molécule d'acide lactique.

13.2.5.1. Expérience

Les types fermentaires ont été déterminés par la mise en évidence de la production de CO₂ dans les cultures en milieu liquide GYP. Des cloches de Durham ont été submergées dans le bouillon pour matérialiser la production de gaz.

13.2.5.2. Résultats

Les investigations entreprises ont montré que seule la souche CWBI-BC produisait de l'acide lactique par la voie métabolique des pentose-phosphates, caractérisée par la production de gaz (CO₂) dans le milieu (Tableau 12.3). Toutes les autres bactéries ont des métabolismes homo-fermentaires (voie Embden-Meyerhof-Parnas).

Tableau 12.3 : Types fermentaires des bactéries acidifiantes étudiées

	CWBI B2	CWBI B6	CWBI C15	CWBI BC	CWBI P1	CWBI P2	LMG 6326	LMG 16675	LMG 6938
Types fermentaires	Hof	Hof	Hof	Héf	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof

Hof : homo-fermentaire ; Héf : hétéro-fermentaire

12.2.5. Conclusions

En conclusion à ces analyses sur la caractérisation des isolats suivant leurs propriétés microbiologiques nous disons que toutes les souches sélectionnées peuvent être apparentées au genre *Bacillus* à l'exception de la souche CWBI-P2, du fait de son incapacité à former des endospores. Cette souche présente toutefois des caractéristiques intéressantes, notamment ses réactions aux tests catalase et pseudocatalase. Le caractère hétéro-fermentaire de la souche CWBI-BC et la morphologie des spores qu'elle produit, sont en accord avec son classement dans le groupe II des *Bacillus*, dont certains représentants ont été reclassés dans le genre *Paenibacillus* (Ash *et al.*, 1994). A ce stade du travail, nous pensons que cette souche possède plus de chance d'appartenir au genre *Paenibacillus* qu'au genre *Bacillus*.

12.3. Identification par l'analyse des profils d'assimilation des substrats carbonés

12.3.1. Introduction

Le profil d'assimilation des substrats carbonés est utilisé en bactériologie depuis de nombreuses années pour caractériser et identifier les micro-organismes (Logan et Berkeley, 1984 ; Friedrich *et al.*, 1997). La capacité des isolats à acidifier à partir des 49 substrats carbonés du kit API 50CH a été déterminée dans le but de mettre en évidence leurs positions taxonomiques par rapport aux classifications connues dans la base de données du système API.

12.3.2. Expérience

Les tests API 50CH ont été effectués à 30°C pendant 48 heures conformément aux instructions du fabricant. Les profils obtenus ont été analysés dans le programme *API Lab Plus 3.0*, qui contient les profils moyens d'acidification de plusieurs bactéries connues.

12.3.3. Résultats et discussion

Les profils fermentaires sont présentés dans le tableau 12.4. L'analyse de ce tableau montre de nombreuses différences entre les profils des nouvelles bactéries et celles des bactéries acidifiantes connues (*B. coagulans*, *B. laevolacticus* et *B. racemilacticus*). La souche CWBI-B2, acidifie à partir d'un nombre important de substrats carbonés (Tableau 12.4). L'analyse du profil d'acidification de cette bactérie met en évidence sa proximité avec *Bacillus circulans* avec laquelle elle partage 69,1% d'homologie. Le profil fermentaire de la souche CWBI-B6 fait apparaître un degré d'homologie de 99,9% avec l'espèce *Bacillus pumilus*. La souche CWBI-BC a un profil fermentaire intéressant du point de vue taxonomique, car elle est incapable d'acidifier à partir de la plupart des substrats du kit API (tableau 12.4). Le taxon le plus significatif révélé par l'analyse de ce profil est *Bacillus coagulans*, avec lequel la souche CWBI-BC partage 92% d'homologie. La souche CWBI-C15 est le seul isolat capable d'acidifier à partir d'inuline. Ce qui est important à savoir dans le cadre de la différenciation de cette bactérie. L'analyse du profil fermentaire de la souche CWBI-C15 dans le système API a donné une identification par rapport à *B. circulans* avec 87,9% d'homologie. L'analyse du profil fermentaire de la souche CWBI-P1 dans le système API n'a pas donné d'identification suffisante. Les taxons révélés ont été *B. licheniformis* et *B. circulans* avec 1% de similitude. Le profil fermentaire de la souche CWBI-P2 a été jugé inconnu dans le système *API Lab*, aucune identification n'a donc été obtenue.

Tableau 12.4 : Profils fermentaires (API 50CH) des bactéries étudiées

Substrats fermentés (API 50CHB)	Souches								
	B2	B6	BC	C15	P1	P2	LMG 6326	LMG 6938	LMG 16675
Glycérol	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Ribose	+	+	-	-	+	+	+	-	-
D-Xylose	+	+	-	+	+	+	-	+	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	+	-	-	-	+	+	-	-	-
β-Methyl-xyloside	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	+	+	+	-	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	+	-	-	+	+	+	+	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	+	+	+	-	+
α-Methyl-D-mannoside	+	+	-	-	-	+	+	+	-
α-Methyl-D-Glucoside	+	-	-	-	+	+	+	+	+
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Amygdaline	+	-	-	+	+	+	+	-	+
Arbutine	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Esculine	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Salicine	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Cellobiose	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Maltose	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Lactose	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Melezitose	+	-	-	+	-	-	+	-	+
D-Raffinose	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Amidon	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Glycogène	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+
β-Gentiobiose	-	-	-	+	+	+	+	-	+
D-Turanose	+	-	+	+	+	+	+	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	+	-	-	+	-	-	+	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	+	-	-	+	+	+	-	-	+
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	+	-	-	-	-
2-Ceto-gluconate	-	-	-	-	-	+	-	+	-
5-Ceto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Des kits API 50CHB ont été utilisés pour toutes les bactéries sporulantes, pour la souche CWBI-P2 un kit API 50CHL a été utilisé.

12.3.4. Conclusions

Le tableau 12.5, donne un résumé des identifications obtenues par le système API 50CH. Selon ce système d'identification, les taxons relevés sont acceptables lorsque les degrés d'homologie calculés sont supérieurs à 90% (Biomérieux S.A., La Balme les Grottes, Montalieu Vercieu, France).

Tableau 12.5: Position taxonomique des isolats selon la base de données *API Lab Plus version 3.0*

Souches	IDENTIFICATION		
	Taxons	Similarité (%)	Observations
CWBI-B6	<i>B. pumilus</i>	99,9	Excellente identification
CWBI-B2	<i>B. circulans</i>	69,1	Faible identification
CWBI-C15	<i>B. circulans</i>	87,9	Faible identification
CWBI-BC	<i>B. coagulans</i>	92,1	Bonne identification
CWBI-P1	<i>B. licheniformis</i>	1,0	Très faible identification
CWBI-P2	-	-	Profil inconnu

Les identifications obtenues pour les souches CWBI-B2, CWBI-C15 et CWBI-P1, ont été réalisées avec des taux de similitudes inférieurs à 90 %, elles sont de ce fait insuffisantes pour faire l'objet de discussion. Les souches CWBI-B6 et CWBI-BC présentent des identifications intéressantes car les degrés d'homologies calculés sont supérieurs à 90%. La souche CWBI-BC a été déterminée comme étant un proche parent de *B. coagulans*, et la souche CWBI-B6 comme étant proche de l'espèce *B. pumilus*.

Pour ce qui concerne l'identification de la souche CWBI-BC comme un *B. coagulans* nous pensons qu'elle est mathématiquement correcte, mais très peu probable, car *B. coagulans* a un métabolisme de type homo-fermentaire, ce qui n'est pas le cas pour la CWBI-BC.

L'identification de la souche CWBI-B6 à l'espèce *B. pumilus* est en accord avec les résultats des caractérisations morphologiques. Nous pensons que cette identification est probable. Nous remarquons tout de même que la production d'acide lactique en quantité importante et de manière homo-fermentative, ne fait pas partie de la description habituelle de l'espèce *B. pumilus* (Claus et Berkeley, 1986).

12.4. Identification par l'analyse des acides gras cellulaires

12.4.1. Introduction

L'analyse des esters méthyliques des acides gras (EMAG) des bactéries par chromatographie en phase gazeuse est une méthode sensible et très sélective. Elle permet la caractérisation d'un nombre élevé de souches bactériennes (Welch, 1991). Les informations

apportées par cette analyse sont directement liées à un facteur génétique, car les enzymes participant à la synthèse de ces acides gras sont l'expression du contenu génomique. Ces informations ont de ce fait une valeur taxonomique plus importante que celles apportées par la plupart des tests chimiotaxonomiques (Suzuki *et al.*, 1993 ; Curk *et al.*, 1994 ; Vandamme *et al.*, 1996).

12.4.2. Expérience

La composition en acides gras cellulaires des isolats a été déterminée avec la collaboration du laboratoire de microbiologie de l'Université de Gent (LMG). La méthode utilisée pour l'extraction des acides gras et leur préparation ont été décrites par *Ostherhout et al.* (1991). Les profils des esters méthyliques des acides gras (EMAG) obtenus par chromatographie en phase gazeuse, ont été analysés dans le programme d'identification Midi (*Microbial Identification System, Inc., Delaware, USA*). Les comparaisons de ces profils ont été effectuées par rapport aux EMAG des bactéries sporulantes disponibles dans la banque de données du système Midi. Le programme Midi analyse dans la composition des bactéries, tous les acides gras dont la taille est comprise entre 9 et 20 atomes de carbone (Midi and inc, 2001).

12.4.3. Résultats et discussion

Dans le but de mieux faire apparaître l'importance et les particularités de la composition en acides gras des différents isolats, nous avons choisi de les analyser individuellement.

Profil des acides gras de la CWBI-B2

L'analyse des EMAG de la souche CWBI-B2 a mis en évidence deux acides gras majoritaires dans sa structure. Il s'agit de l'acide 11-methyldodécanoïque (iso-C13:0) et de l'acide 13-méthyltetradécanoïque (iso-C15:0) représentant respectivement 24% et 28% des acides gras totaux. D'autre part, nous observons que la souche CWBI-B2 ne possède que 4% d'acide 12-méthyltetradécanoïque (anteiso-C15:0). Le rapport anteiso-C15:0/iso-C15:0 de cette souche qui est de 0,14. Nous constatons que les acides gras majoritaires dans la composition de cette bactérie sont de type "iso", ce qui correspond à une structure typique des bactéries thermophiles. La souche CWBI-B2 est pourtant une bactérie mésophile, cette caractéristique pourrait être le signe d'une adaptation environnementale. La comparaison du profil des acides gras de la souche CWBI-B2 dans la base de données Midi met en évidence une identification par rapport aux espèces du groupe *Bacillus cereus* complexe avec un indice de similarité (SI) de 0,23. Signalons que le groupe *B. cereus* complexe, comprend entre autre *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* et *Bacillus weihenstephanensis*. Ces espèces sont

génétiquement très proches et leur différenciation a déjà fait l'objet de nombreux travaux dont ceux de Keneko *et al.* (1978), de Drobniowski (1993), de Bell et Friedman (1994) et de von Wintzingerode *et al.* (1997).

Profil des acides gras de la CWBI-B6

La composition des acides gras cellulaires de la souche CWBI-B6 met en évidence une dominance de l'acide 13-méthyltetradécanoïque (iso-C15:0), soit 54% des acides gras totaux. Le second acide gras présent dans une proportion de 24% est l'acide 12-méthyltetradécanoïque (anteiso-C15:0). Le rapport anteiso-C15:0/iso-C15:0 de cette bactérie est de 0,44, ce qui correspond à une valeur proche de celles retrouvées chez les bactéries thermophiles. La comparaison du profil des acides gras de cette bactérie dans la base de données Midi, donne un indice de similarité (SI) de 0,92 par rapport à l'espèce *Bacillus pumilus*. Nous pouvons remarquer que cette identification corrobore celle obtenue dans l'analyse des profils fermentaires.

Profil des acides gras cellulaires de la CWBI-P1

La composition des acides gras cellulaires de la souche CWBI-P1 correspond à un profil type retrouvé chez la plupart des espèces mésophiles du genre *Bacillus*, c'est à dire une prédominance des acides gras de type anteiso. Dans la structure de cette bactérie nous avons 43,3% d'acide 12-méthyltetradécanoïque (anteiso-C15:0) et 7,73% d'acide 13-méthyltetradécanoïque (iso-C15:0), soit un rapport anteiso-C15:0/iso-C15:0 de 9,16. Nous notons également des quantités significatives d'acide hexadécanoïque (C16:0) et d'acide 14-méthylhexadécanoïque (anteiso-C17:0) dans des proportions de 17% et 13% respectivement. L'analyse de ce profil dans la base de données (Midi) fait apparaître un indice de similarité (SI) de 0,49 avec l'espèce *Paenibacillus polymyxa* autrefois appelée *Bacillus polymyxa* (Ash *et al.*, 1994).

Profil des acides gras cellulaires de la CWBI-C15

La souche CWBI-C15 a une composition en acide gras cellulaire caractéristique des espèces mésophiles du genre *Bacillus*. En effet, l'acide gras majoritaire dans la composition des lipides de cette bactérie est l'acide 12-méthyltetradécanoïque (anteiso-C15:0) représentant 40% des acides gras totaux. Nous retrouvons d'autre part 24% d'acide hexadécanoïque (C16:0) et 13% d'acide tétradécanoïque (C14:0). Cette bactérie possède également environ 7% de chacun des acides gras suivants : l'acide 12-Méthyltridécanoïque (iso-C14:0), l'acide 13-méthyltetradécanoïque (iso-C15:0) et l'acide 14-méthylpentadécanoïque (iso-C16:0). Le rapport anteiso-C15:0/iso-C15:0 de cette bactérie est de 5,08. La comparaison de ce profil dans

la base de données (Midi) fait apparaître un indice de similarité (SI) de 0,73 avec l'espèce *Paenibacillus azotofixans*.

Profil des acides gras cellulaires de la CWBI-BC

La souche CWBI-BC a une composition en acide gras cellulaire intéressante d'un point de vue taxonomique. Selon nos analyses, cette bactérie ne posséderait pas d'acide pentadécanoïque (C15:0). La composition des acides gras de cette bactérie met en évidence la présence de trois acides gras majoritaires, dont 31% d'acide 12-méthyltetradécanoïque (anteiso-C15:0), 31% d'acide hexadécanoïque (C16:0) et 12% d'acide 13-méthyltetradécanoïque (iso-C15:0). Le rapport anteiso-C15:0/iso-C15:0 de cette bactérie est de 2,58. L'analyse de cette composition en acides gras dans la base de données (Midi) met en évidence une très faible discrimination, mais le taxon le plus proche est de la souche CWBI-BC est *Bacillus lentus* avec un indice de similarité (SI) de 0,21, puis *Paenibacillus popilliae* avec un SI de 0,16.

12.4.4. Conclusions

Le tableau 12.6, reprend les identifications obtenues pour l'ensemble des isolats dans l'analyse de la composition des EMAG cellulaires par le système Midi.

Tableau 12.6: Bilan de l'identification des souches par l'analyse des acides gras cellulaires par le système Midi

Souches	Espèces	SI	Commentaire
CWBI-B2	<i>Bacillus cereus</i>	0,233	non satisfaisant
CWBI-B6	<i>Bacillus pumilus</i>	0,926	satisfaisant
CWBI-C15	<i>Paenibacillus azotofixans</i>	0,731	satisfaisant
CWBI-BC	<i>Bacillus sp</i>	0,216	non satisfaisant
CWBI-P1	<i>Paenibacillus sp</i>	0,490	non satisfaisant
CWBI-P2	Cette analyse étant conseillée pour les bactéries sporulantes, elle n'a pas été réalisée pour la souche CWBI-P2		

Lorsque l'analyse des acides gras cellulaires est réalisée dans le système Midi, on admet que les identifications obtenues sont acceptables si les indices de similarité (SI) calculés sont supérieurs ou égaux à 0,50 (Osterhout *et al.*, 1991). Suivant ce critère, les résultats obtenus sont satisfaisants pour les souches CWBI-B6 et CWBI-C15 pour lesquelles ces indices sont de 0,92 et 0,73 respectivement. Pour ce qui concerne les autres isolats analysés par cette technique, notamment les souches CWBI-BC, CWBI-B2 et CWBI-P1 dont les

indices de similarités sont inférieurs à 0,5, l'analyse des EMAG est insuffisante pour leur classification.

L'analyse des EMAG a mis en évidence une composition en acides gras typique des bactéries thermophiles chez les souches CWBI-B2 et CWBI-B6 alors que ces bactéries sont mésophiles (selon nos analyses). Cette observation peut être attribuée à l'adaptation de ces micro-organismes à leur environnement d'origine (le sahel Burkinabé), caractérisé par des sols chauds et secs.

L'identification obtenue pour la souche CWBI-B6 est en accord avec celle des profils API 50CH (*Bacillus pumilus*). Cette identification nous semble de ce fait très probable. Pour ce qui concerne la souche CWBI-C15, identifiée à *Paenibacillus azotofixans* avec un indice de similarité (SI) de 0,72 nous pensons qu'elle est discutable et peu probable. L'identification de la souche CWBI-BC à *Bacillus lentus* et *P. popilliae* nous semble très peu probable car ces bactéries nécessitent des milieux complexes pour leur croissance, notamment de l'urée pour *B. lentus* et de la thiamine pour *P. popilliae* (Claus et Berkeley, 1986).

L'identification des bactéries par l'analyse des acides gras cellulaires possède certaines limites qu'il convient de mentionner. Il existe en effet, des cas où l'analyse de la composition des EMAG cellulaires ne permet pas de dissocier des bactéries même génétiquement et physiologiquement différentes. C'est le cas notamment pour *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* rapporté par O'Donnell *et al.* (1980).

12.5. Identification par l'analyse de la séquence des ADNr 16S

12.5.1. Introduction

Suivant les recommandations de l'International Committee on Systematic of Prokaryotes (ICSP), l'identification et la description de toute nouvelle espèce bactérienne doivent comporter le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (Stackebrandt *et al.*, 2002).

12.5.2. Expérience

Les ADNr 16S des isolats ont été amplifiés par PCR avec un couple d'amorces universelles. Pour chaque souche analysée, le produit d'amplification a été une bande unique de 1500 paires de bases. Chaque produit d'amplification a été purifié et séquencé avec l'aide de quatre couples d'amorces correspondant chacune à des positions précises dans l'ADNr 16S. Les séquences obtenues ont été alignées dans les bases de données de la banque Genbank/EMBL/NCBI à l'aide des logiciels *GeneCompar* (Applied, Maths, Belgium) et *Vector NTI* (Informax, Invitrogen, Maryland, USA). Les résultats des alignements sont présentés dans des

dendrogrammes montrant les groupes d'homologies ou clusters dans lesquels les isolats sont repris.

12.5.3. Résultats et discussion

Sur la base de l'alignement des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S, Wayne *et al.* (1987), ont montré que deux espèces différentes devaient avoir au moins 90% de similarité dans la séquence de leurs ADNr 16S pour appartenir à un même genre. L'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S des isolats a ainsi abouti à leur répartition dans trois genres bactériens :

- le genre *Bacillus* pour les souches CWBI-B2 et CWBI-B6 ;
- le genre *Paenibacillus* pour les souches CWBI-P1, CWBI-BC et CWBI-C15 ;
- et le genre *Lactobacillus* pour la souche CWBI-P2.

Dans le souci de mieux faire apparaître les identifications nous avons choisi de traiter ces souches dans leur genre respectif.

12.5.3.1. Identification des souches CWBI-B2 et CWBI-B6 dans le genre *Bacillus*

Les ADNr 16S séquencés dans les souches CWBI-B2 et CWBI-B6 à l'aide des amorces utilisées, ont des tailles de 1411 pb et 1120 pb respectivement. La comparaison des séquences nucléotidiques obtenues avec celles contenues dans les catalogues internationaux (Genbank/EMBL/NCBI) à l'aide du programme informatique *Vector NTI* a abouti à la construction d'un dendrogramme présenté dans la figure 12.1. Cette analyse donne un résultat assez proche de celui obtenu par l'analyse des EMAG pour ces deux bactéries, donnant une confirmation partielle de l'appartenance de la souche CWBI-B2 au groupe *Bacillus cereus* avec un degré d'homologie de 99,9% et de la souche CWBI-B6 à l'espèce *Bacillus pumilus* avec un degré d'homologie de 99,9% également.

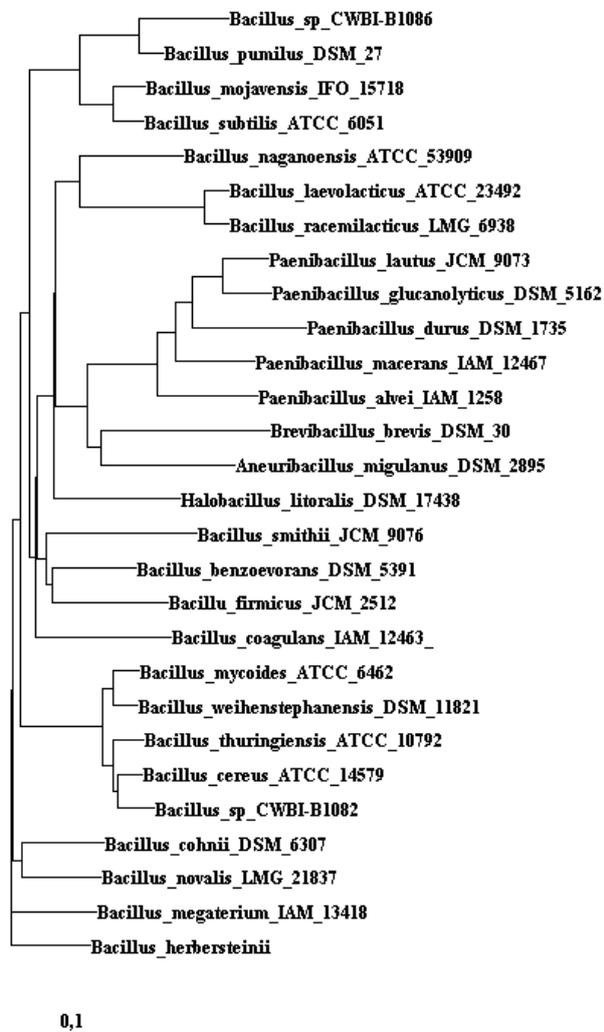


Figure 12.1: Position des souches CWBI-B2 et CWBI-B6 dans le groupe des *Bacillus*. Selon les alignements des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S. CWBI-B1086 correspond à CWBI-B6 et CWBI-B1082 correspond à CWBI-B2 (dendrogramme réalisé avec le logiciel Vektor NTI)

12.5.3.2. Identification des souches CWBI-C15, CWBI-BC et CWBI-P1 dans le genre *Paenibacillus*

Le séquençage des ADNr 16S des souches CWBI-BC, CWBI-C15 et CWBI-P1 a donné des fragments de 1424, 1440 et 1434 paires de bases respectivement. L'alignement de ces séquences dans les catalogues internationaux (Genbank/EMBL/NCBI) a mis en évidence l'appartenance de ces trois isolats au genre *Paenibacillus* (figure 12.3). Le dendrogramme de la figure 12.3 fait apparaître deux groupes d'homologie autour de ces trois isolats :

- le premier groupe d'homologie comprend la souche CWBI-P1 avec les espèces *Paenibacillus azoreducens*, *Paenibacillus cookii*, *Paenibacillus cineris*, *Paenibacillus chibensis*, et *Paenibacillus favisporus* ;
- le deuxième groupe d'homologie comprend les souches CWBI-BC et CWBI-C15 avec les espèces *Paenibacillus borealis*, *Paenibacillus odorifer*, *Paenibacillus durus*, *Paenibacillus stellifer* et *Paenibacillus graminis*.

L'appartenance de ces trois isolats au genre *Paenibacillus* est certaine, mais les degrés de similarités obtenus dans la plupart des cas sont assez faibles pour aboutir à une identification complète des isolats dans ce genre.

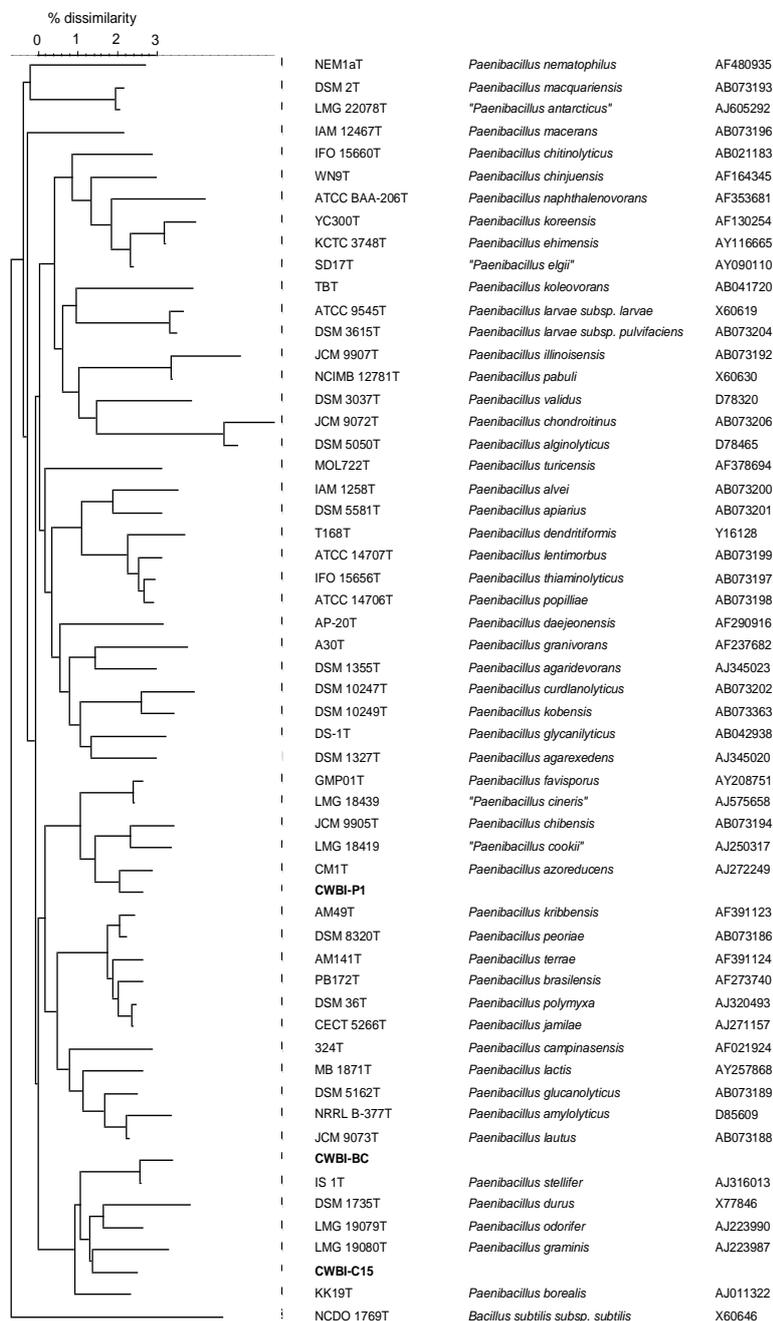


Figure 12.3: Position taxonomique des souches CWBI-BC, CWBI-C15 et CWBI-P1 parmi les espèces types appartenant au genre *Paenibacillus*. Selon les alignements des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S (dendrogramme réalisé avec le programme *GenCompar*).

12.5.3.3. Identification de la souche CWBI-P2 dans le genre *Lactobacillus*

La souche CWBI-P2 est une bactérie acidifiante, non sporulante, isolée durant ces travaux et ayant des propriétés physiologiques et biochimiques particulières. La position taxonomique de la souche CWBI-P2 dans le groupe des bactéries acidifiantes a été déterminée par l'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S.

Le séquençage de l'ADNr 16S de cette bactérie a abouti à l'obtention d'un matériel de 1522 paires de bases. L'alignement de cette séquence dans la banque de données EMBL/NCBI a clairement mis en évidence l'appartenance de la souche CWBI-P2 au genre *Lactobacillus* (figure 12.4), avec une homologie de séquence supérieure à 99%, qu'elle partage avec les espèces du groupe *Lactobacillus casei* (tableau 12.8). Ce groupe comprend *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus zeae* (Klein *et al.*, 1998). Les trois premières espèces citées sont les plus connues car elles ont fait l'objet de nombreuses publications pour leurs propriétés probiotiques. Selon *Disks et al.* (1996), les espèces appartenant à ce groupe sont génétiquement très homogènes et la plupart des travaux qui leur ont été consacrés ont abouti à des recommandations sur la réorganisation du groupe. Pour *Mori et al.* (1997), *Lactobacillus zeae* et *Lactobacillus casei* doivent être rassemblés dans un seul taxon. Les bactéries appartenant au groupe *casei* sont généralement retrouvées dans le voisinage des végétaux et des animaux (Klein *et al.*, 1998).

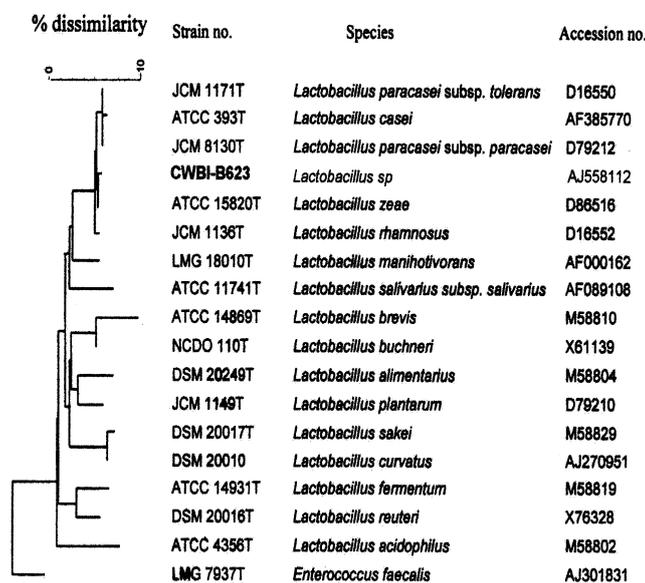


Figure 12.4 : dendrogramme montrant la position de la souche CWBI-P2 (CWBI-B623) dans le groupe des *Lactobacillus* sp. Selon les alignements des séquences des gènes codant pour l'ARNr 16S (Dendrogramme réalisé avec le programme GenCompar).

12.6. Conclusions

Les analyses phylogénétiques basées sur l'alignement des ADNr 16S ont confirmé l'appartenance des souches CWBI-B2 et CWBI-B6 au genre *Bacillus*, celle des souches CWBI-C15, CWBI-P1 et CWBI-BC au genre *Paenibacillus* et enfin l'appartenance de la souche CWBI-P2 au genre *Lactobacillus*. La classification des isolats dans ces genres ne souffre d'aucune ambiguïté. Par contre leur appartenance aux espèces révélées dans ces genres n'est pas toujours probable. L'identification des souches CWBI-B2 et CWBI-B6 par le séquençage des ADNr 16S confirme les résultats obtenus dans l'analyse des EMAG, à savoir que la souche CWBI-B2 est apparentée au groupe de *Bacillus cereus* et que la souche CWBI-B6 appartiendrait à l'espèce *Bacillus pumilus*.

Selon les identifications obtenues, les souches CWBI-C15, CWBI-P1 et CWBI-BC, et CWBI-P2 pourraient aussi bien appartenir à l'une ou à l'autre des espèces révélées par les analyses phylogénétiques ou constituer de nouvelles espèces dans les genres ciblés.

CHAPITRE 13. ETUDE DE LA SPORULATION DES BACTERIES ACIDIFIANTES

13.1. Introduction

Les principales attentes des bio-industries dans l'exploitation des bactéries acidifiantes et sporulantes résident dans leur disponibilité sous forme de spores et en quantité importante (Cavazzoni et Adami, 1993, Hyronimus *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs ont pourtant observé chez certaines bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* d'importantes difficultés à sporuler dans les conditions standards de culture (Nakayama et Yanoshi, 1967 ; Holzapfel et Botha, 1988 ; Cavazzoni et Adami, 1993). Le cas le plus remarquable est celui rapporté par Doores et Westhoff (1981), concernant la sporulation de *Sporolactobacillus inulinus*. Les quantités de spores produites par cette bactérie dans le milieu GYP sont de l'ordre de 10^2 à 10^3 CFU/ml, ce qui rend les observations microscopiques difficiles. Concernant les nouvelles bactéries sélectionnées dans ce travail et les souches de références utilisées, nous avons observé des niveaux de sporulation variables dans le milieu GYP. Des études ont ainsi été entreprises pour déterminer les paramètres influençant la sporulation et pour déterminer les conditions de culture idéales pour la production de biomasse sous forme de spores.

13.2. Rôle de la composition du milieu dans la sporulation

Un travail bibliographique a permis d'identifier les substrats et les minéraux nécessaires à la sporulation des espèces du genre *Bacillus*. Une attention a été accordée aux cas des bactéries acidifiantes de ce genre (*B. coagulans*, *B. racemilacticus* et *B. laevolacticus*). Les amidons et certains minéraux ($MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$, $CaCl_2$, et $NaCl$) sont cités dans plusieurs travaux comme étant indispensables à l'initiation de la sporulation chez les espèces du genre *Bacillus* (Weinberg, 1964 ; Vasantha et Freese 1979 ; Larpent et Larpent *et al.*, 1985; Claus et Berkeley, 1986 ; Priest et Fergus, 1993 ; Penna *et al.*, 1998 ; Cazemier *et al.*, 2001). Les tests de sporulation ont donc été réalisés en incorporant ces substances au GYP. Les milieux UM20 et SM2 décrits par Cavazzoni et Adami (1993), comme étant favorables à la sporulation de *B. coagulans* ont aussi été utilisés.

13.2.1. Expérience

Les travaux de sporulation ont été réalisés avec le milieu GYP (glucose, extrait de levure et peptone) pris comme milieu de référence. Plusieurs formulations ont été mises au point à partir de ce milieu en lui incorporant quelques nouveaux substrats. Toutes les cultures ont étéensemencées avec 1% (v/v) d'une préculture et incubées à 37°C

sous agitation orbitale pour toutes les bactéries sauf *B. coagulans* qui a été incubée 45°C. Les quantités de spores produites ont été vérifiées après 72 heures de culture par une observation microscopique, puis par un dénombrement sur une gélose GYP après un choc thermique à 80°C pendant 10 min.

13.2.2. Résultats et discussion

Les tableaux [13.1a](#) et [13.1b](#) permettent d'évaluer l'importance de la composition des milieux sur la sporulation des bactéries étudiées. Nous remarquons dans ces tableaux que la sporulation se déroule dans des conditions spécifiques à chaque bactérie. Le milieu GYP, proposé par Nakayama et Yanoshi (1967a) pour la culture des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* et *Sporolactobacillus* ne semble pas être favorable à la sporulation de toutes les bactéries utilisées. Les rendements de sporulations obtenus dans ce milieu varient de 1% à 28% environ. Les souches CWBI-B2 et CWBI-B6 possèdent les meilleurs taux de sporulation dans ce milieu soit 28% et 25% de spores respectivement. Pour les autres souches, les quantités de spores produites dans le GYP sont comprises entre 1% et 5% environ. Dans le groupe des bactéries de référence utilisées, c'est *B. racemilacticus* LMG 6938 qui possède le meilleur rendement de sporulation dans ce milieu. Les résultats obtenus avec les nouveaux milieux constitués à partir du GYP, notamment par l'apport de l'amidon et des minéraux, ne sont pas satisfaisants.

Contrairement à ce qui est observé dans la littérature sur la sporulation des *Bacillus*, l'optimisation de la sporulation des bactéries utilisées dans ce travail ne peut être envisagé par l'incorporation d'amidon ou de sels dans le milieu de base. Selon Adami et Cavazzoni (1993) les milieux TJ, UM 20 et SM 2 sont favorables à la sporulation. Les rendements de sporulation obtenus pour *Bacillus coagulans* dans ces milieux étaient supérieurs à 50%, dans leurs travaux. Les rendements que nous obtenons pour *B. coagulans* LMG 6326 avec ces milieux ne sont guère supérieurs à 1%. L'utilisation de ces milieux ne peut donc être envisagée pour la production de spores. Les analyses montrent aussi que ce sont les souches CWBI-BC, CWBI-C15 et CWBI-P1 appartenant au genre *Paenibacillus* qui possèdent les plus importantes difficultés à sporuler dans les milieux constitués. Cette caractéristique est commune à certaines espèces de ce genre, notamment *Paenibacillus popilliae* (Stahlye et Klein, 1992) et *Paenibacillus larvae* autre fois *Bacillus larvae* (Heyndrickx *et al.*, 1996). Selon Euzéby (2003) la difficulté à sporuler des espèces du genre *Paenibacillus* s'expliquerait par la complexité de leurs besoins nutritionnels.

Tableau 13.1a: Croissance et sporulation des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* dans différents milieux

Formulations	CWBI-B2			CWBI-B6			CWBI-BC			CWBI-C15		
	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores
GYP	9,47	8,93	28,6	9,07	8,48	25,2	8,71	6,61	0,8	8,73	6,50	0,6
GYP avec 0,1% glucose	8,81	8,05	17,30	8,93	7,91	9,6	8,00	6,14	1,4	7,78	4,00	0,03
GYP avec 1% d'amidon	9,08	8,49	26,2	8,93	8,38	28,6	8,71	6,78	1,2	7,49	6,30	0,8
GYP + solution saline	9,50	8,77	18,6	9,12	8,24	13,4	8,73	6,98	1,8	8,76	6,36	0,4
Bouillon TJ	7,79	6,87	12,4	7,49	6,70	8,1	7,81	5,30	0,4	7,63	4,60	0,1
Bouillon TJ + solution saline	7,80	6,85	11,3	7,53	6,43	8,1	7,62	4,90	0,2	7,55	4,47	0,08
Bouillon UM 20	9,53	8,97	27,6	8,93	8,28	22,6	8,69	6,81	1,3	8,79	6,49	0,5
Bouillon SM 2	9,26	7,78	33,8	8,94	8,34	24,8	8,69	6,79	1,2	7,91	5,75	0,7

Toutes les souches ont été inoculées dans ces milieux en tenant compte des conditions optimales de croissance. Les incubations ont été effectuées pendant 72 heures. Les milieux TJ, UM 20 et SM 2, ont été mis au point par Cavazzoni et Adami (1993), pour la production de spores de *Bacillus de coagulans*.

Tableau 13.1b: Croissance et sporulation des bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* dans différents milieux

Formulations	CWBI-P1			<i>B. coagulans</i> LMG 6326			<i>B. racemilacticus</i> LMG 6938			<i>B. laevolacticus</i> LMG 16675		
	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	%Spores
Bouillon GYP	8,94	7,60	4,6	8,74	6,82	1,2	9,34	8,45	13,1	9,04	7,62	3,8
Bouillon GYP 0,1% glucose	8,07	6,61	3,4	7,91	5,81	0,8	7,72	6,82	12,8	8,12	6,89	6,1
Bouillon GYP 1% amidon	8,92	7,74	6,7	8,21	6,14	0,9	8,82	7,98	14,5	8,70	7,36	4,5
Bouillon GYP Mn⁺⁺,Mg⁺⁺,Ca⁺⁺	8,83	7,08	1,8	8,94	6,71	0,6	9,08	8,05	9,4	8,91	7,77	7,3
Bouillon TJ	7,80	5,70	0,8	7,43	4,38	0,9	7,11	5,90	6,2	7,41	4,30	0,1
Bouillon TJ Mn⁺⁺, Mg⁺⁺	7,32	5,43	1,3	8,07	5,51	0,3	8,93	7,65	5,2	7,04	4,69	0,5
Bouillon UM 20	8,84	7,23	2,5	8,91	7,02	1,3	8,22	7,46	18,4	8,36	6,50	1,4
Bouillon SM 2	8,91	7,11	1,6	8,76	6,53	0,6	9,14	8,33	15,6	8,39	7,48	12,7

Toutes les souches ont été inoculées dans ces milieux en tenant compte des conditions optimales de croissance. Les incubations ont été effectuées pendant 72 heures. Les milieux TJ, UM 20 et SM 2, ont été mis au point par Cavazzoni et Adami (1993), pour la production de spores de *Bacillus de coagulans*.

13.2.3. Conclusions

La sporulation des bactéries étudiées dans ce travail ne semble pas être directement influencée par la composition en nutriments des milieux utilisés, sauf peut être pour les espèces appartenant au genre *Paenibacillus*. Les milieux artificiels constitués se montrent plus adaptés à la croissance qu'à la sporulation de ces bactéries. Les observations faites dans les travaux antérieurs sur la sporulation de *Bacillus coagulans*, n'ont pas été vérifiées chez la souche LMG 6326. Plusieurs propriétés liées aux métabolismes des bactéries ou à leurs besoins nutritionnels pourraient expliquer ces observations. D'autre part, les travaux de Amaha *et al.* (1956), ainsi que ceux de Cavazzoni et Adami (1993), ont montré que la sporulation de *B. coagulans* se déroulait de manière optimale sur les milieux gélosés. Des observations similaires ont été faites par Dingman et Stahly (1983), pour la sporulation de *Paenibacillus larvae* qui a pourtant la réputation d'être une bactérie très difficile. Il nous semblait de ce fait intéressant de vérifier le rôle que ce type de culture pourrait jouer dans la sporulation des bactéries acidifiantes étudiées.

13.3. Importance des milieux solides pour la sporulation

Le rôle joué par les cultures en milieu solide dans la sporulation a été analysé pour les bactéries acidifiantes. Dans ce cadre, deux systèmes d'immobilisation cellulaire ont été comparés aux cultures submergées.

13.3.1. Expérience

Trois formulations du GYP ont été utilisées dans ce travail. Il s'agissait des bouillons, des géloses et des billes d'alginate. L'inclusion des cellules dans les billes d'alginate a été réalisée à partir d'un milieu GYP formulé avec 1,5 % (p/v) d'alginate de sodium et inoculé avec 1 % (v/v) d'une préculture. Les billes ont été formées dans une solution stérile de CaCl_2 (1 M). Les quantités de biomasse produite ont été déterminées après la dissolution des billes dans un tampon phosphate 0,5 M pH 7. Pour les milieux gélosés, la biomasse produite à la surface de chaque boîte a été récoltée dans un volume de 20 ml d'eau peptonée.

13.3.2. Résultats et discussion

Le tableau [13.2](#) donnant les résultats de ces expérimentations montre que pour toutes les souches étudiées, les cultures immobilisées sont plus favorables à la sporulation, comparativement aux cultures submergées. Les différences observées entre ces deux formulations sont très significatives. Ces résultats confirment les

observations antérieures sur l'importance des cultures immobilisées pour la sporulation des micro-organismes (Amaha *et al.*, 1956 ; Dingman et Stahly, 1983 ; Cavazzoni et Adami, 1993). Chez *Bacillus coagulans*, Cavazzoni et Adami (1993), ont obtenu des rendements de sporulation de 1 % et 80 % respectivement en milieu liquide et sur milieu gélosé. Des comportements similaires ont également été observés chez certaines moisissures (Dorta *et al.*, 1996) pour lesquelles la production de spores est réalisée sur des milieux solides constitués essentiellement de résidus agricoles (pailles et son de riz). L'inclusion des cellules dans des billes d'alginate pour la sporulation se montre plus intéressante que les milieux gélosés, car nous constatons que cette formulation améliore les rendements de sporulation. Nous observons par ailleurs que la sporulation des souches CWBI-BC et CWBI-C15 (*Paenibacillus*) reste toujours insuffisante même dans les cultures immobilisées. La sporulation de la souche CWBI-P1 qui appartient également au genre *Paenibacillus* est améliorée avec l'immobilisation des cellules.

Tableau 13.2 : Etude comparative de la sporulation des bactéries acidifiantes suivant la formulation du milieu GYP (Bouillon, Gélose et Billes d'alginate)

Souches	Formulations du milieu	Biomasse Log (CFU/ml)	Spores Log (CFU/ml)	Spores %
CWBI-B2	Bouillon	9,49	8,76	18,6
	Gélose	9,65	9,62	93,3
	Billes	9,50	9,44	87,5
CWBI-B6	Bouillon	9,11	8,23	13,4
	Gélose	9,38	9,11	54,1
	Billes	8,94	8,90	92,0
CWBI-BC	Bouillon	8,72	5,97	0,18
	Gélose	9,89	7,91	10,3
	Billes	7,91	6,80	7,8
CWBI-C15	Bouillon	8,75	6,34	0,4
	Gélose	9,90	8,04	13,7
	Billes	7,93	6,86	8,4
CWBI-P1	Bouillon	8,82	7,07	2,0
	Gélose	9,20	8,39	15,6
	Billes	8,70	7,99	19,3
LMG 6938	Bouillon	9,07	8,04	9,4
	Gélose	10,04	9,88	70,0
	Billes	8,83	8,66	68,0
LMG 16675	Bouillon	8,90	7,76	7,3
	Gélose	9,88	9,49	41,2
	Billes	8,73	8,04	21,6
LMG 6326	Bouillon	8,93	6,72	0,6
	Gélose	9,89	9,47	37,9
	Billes	8,56	8,44	82,3

* Les formulations ont été réalisées dans le GYP.

Les cultures sur milieux gélosés bien qu'étant efficaces pour la sporulation ne peuvent être envisagées pour la production de spores à grande échelle et cela pour une question de rentabilité économique. Les billes d'alginate peuvent par contre être utilisées pour des productions à l'échelle industrielle. Signalons à cet effet que les billes d'alginate sont déjà utilisées dans plusieurs processus de production impliquant des micro-organismes. La principale difficulté qui se présente généralement pour la production de biomasse dans les cultures immobilisées est la limitation de la croissance. En effet, plusieurs auteurs (Champagne *et al.*, 1994 ; Cachon *et al.*, 1998 ; Krishnan *et al.*, 2001) ont montré que le taux de croissance des bactéries immobilisées était considérablement diminué suite à la création d'un microenvironnement dans le voisinage des cellules (accumulation de métabolites, modification de pH, etc.). Lorsque nous comparons les quantités totales de biomasse produites dans les différentes cultures nous observons que cette limitation de croissance existe dans les billes d'alginate et certainement dans les milieux gélosés. Il conviendra alors de ramener cette limitation de croissance à un niveau acceptable pour que la technologie des cultures immobilisées puisse être exploitée de manière rentable dans la production de spores.

13.4. Conclusions

Nous constatons que si la sporulation des bactéries acidifiantes n'est pas influencée par la composition des milieux en nutriments, elle l'est par contre pour les systèmes de culture utilisés. Chez *B. coagulans* LMG 6326, les rendements de sporulation obtenus dans les cultures immobilisées varient de 37% à 80% respectivement sur des milieux gélosés et dans les billes d'alginate, alors que dans les milieux liquides ces rendements ne dépassent guère 1%. Les milieux gélosés sont régulièrement utilisés dans plusieurs travaux pour produire des spores mais à l'échelle du laboratoire (Marshall et Beers, 1976 ; Palop *et al.*, 1999). Nous n'avons pas rencontré de travaux qui expliquent les mécanismes physiologiques et biochimiques impliqués dans l'avantage que ce type de culture apporterait à la sporulation. Nous pensons toutefois que la création d'un microenvironnement dans le voisinage des cellules immobilisées, suite à l'accumulation des métabolites excrétés, n'est pas étrangère aux phénomènes observés. Dans le chapitre suivant, des expériences ont été réalisées sur la souche *Bacillus coagulans* LMG 6326 dans le but de vérifier l'importance de la création d'un microenvironnement pour la sporulation, dans les cultures infiniment mélangées.

CHAPITRE 14. ETUDE DE LA SPORULATION DE *B. COAGULANS* EN CULTURE IMMOBILISÉE

14.1. Introduction

Les travaux réalisés dans ce chapitre ont concerné la détermination des paramètres influençant la sporulation dans les cultures immobilisées. L'ensemble des expériences a été réalisé sur la souche *B. coagulans* LMG 6326, qui partage la majeure partie des particularités biochimiques et physiologiques observées chez l'ensemble des bactéries acidifiantes.

14.2. Analyse des variations environnementales susceptibles d'influencer la sporulation

Plusieurs propriétés physiques et chimiques différencient les cultures immobilisées des cultures submergées. Parmi ces propriétés deux paramètres semblent déterminants dans la croissance. Il s'agit d'une part, de l'aération dont bénéficient les cellules immobilisées et d'autre part, de la création de gradient de concentration dans l'environnement des cellules. Selon Karel *et al.* (1985), l'accumulation de métabolites dans le voisinage des cultures contribue à modifier le métabolisme cellulaire et à engendrer d'importants changements physiologiques et morphologiques. Selon Parsek et Greenberg (2000), l'immobilisation contribue à amplifier la formation de biofilm chez les bactéries Gram négative en favorisant la perception du *quorum sensing* chez ces bactéries. Dans le cas des bactéries sporulantes, nous pensons que l'immobilisation peut agir sur la sporulation par :

- une amélioration du transfert d'oxygène ;
- une limitation de la production d'acide lactique ;
- une concentration des facteurs de sporulation de type *quorum sensing*

Ce sont ces hypothèses qui ont été vérifiées dans les expériences qui suivent.

14.2.1. Rôle de l'aération des cultures sur la sporulation

L'aération fait partie de ces conditions régulièrement citées pour l'optimisation de la sporulation chez les espèces du genre *Bacillus* (Thompson et Thames 1967 ; Dingman et Stahly, 1983 ; Larpent et Larpent, 1985 ; Bogdanova *et al.*, 2002). Cette caractéristique nous intéresse particulièrement parce que dans les cultures non submergées que nous réalisons sur gélose ou avec les billes d'alginate, les cellules bénéficient d'un meilleur transfert d'oxygène.

14.2.1.1. Expérience

L'effet de l'aération dans la sporulation de *B. coagulans* a été investigué en milieu liquide dans des fermenteurs de deux litres de type Biostat. Le seul paramètre qui a varié durant les analyses a été l'aération. Les expériences ont été effectuées dans un milieu GYP pendant 72 h, avec des débits d'aération de 0,6 vvm, 1,3 vvm et 2,0 vvm (vvm : volume d'air injecté par minute par rapport au volume de milieu dans le réacteur).

14.2.1.2. Résultats et discussion

Nous considérons que les débits d'aération de 1,3 vvm et 2,0 vvm appliqués dans les fermenteurs sont suffisants pour que les phénomènes observés soient comparables à ce qui se passe dans les cultures non submergées.

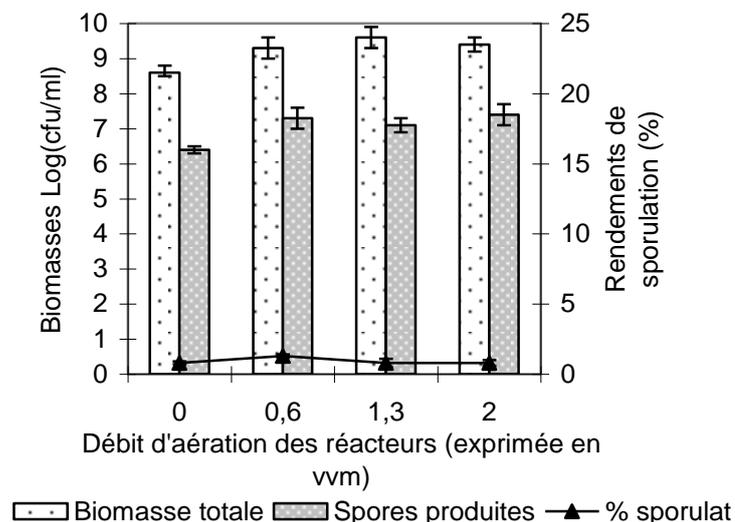


Figure 14.1: Effet de l'aération sur la croissance et la sporulation de *B. coagulans*

L'analyse de la figure 14.1 présentant les résultats des expériences de sporulation en fonction du niveau d'aération des réacteurs montre que la production de biomasse chez *B. coagulans* est influencée par l'aération des cultures. Les quantités de biomasse produites sont améliorées lorsque l'aération est appliquée dans les cultures liquides. Par contre cet effet n'est pas positivement répercuté sur la sporulation. En effet, les rendements de sporulation restent quasi identiques et aussi faibles (1% environ) que dans les cultures non aérées, comme montré sur le graphique.

14.2.2. Rôle de l'accumulation de métabolites sur la sporulation

La création d'un gradient de concentration dans l'environnement des cellules occasionne d'importants changements dans les caractéristiques physiologiques et morphologiques des cultures (Champagne *et al.*, 1994). Dans le cas de *Bacillus coagulans* qui est une bactérie acidifiante et sporulante, au moins deux types de produits d'accumulation sont susceptibles d'influencer la sporulation. Il s'agit d'une part de l'acide lactique qui selon Larpent et Larpent (1985) a un effet inhibiteur pour la sporulation, et d'autre part des facteurs de sporulation (*quorum sensing*). L'accumulation de ces facteurs de sporulation est indispensable à la sporulation de *Bacillus subtilis* (Lazazzera, 2000) et *Clostridium perfringens* (Tseng et Labbe, 2000). Le rôle que joueraient ces deux produits d'accumulation dans la sporulation de *B. coagulans* a été déterminé.

14.2.2.1. L'accumulation de l'acide lactique

Le rôle joué par l'accumulation de l'acide lactique dans les cultures pour la sporulation a été investigué en culture submergée. Deux modes opératoires s'offraient à nous pour réaliser cette opération. Le premier consistait à effectuer des cultures dans lesquelles l'acide lactique est séparé du milieu au fur et à mesure de sa formation. Ce type de séparation de composés solubles et de tailles déterminées dans les cultures peut être réalisé avec l'aide des membranes de microfiltration. Il n'a toutefois pas été retenu dans notre expérience. La seconde manière de mener cette étude consistait à effectuer des cultures avec un substrat carboné dont le métabolisme n'aboutirait pas à l'accumulation de l'acide lactique dans le milieu. Nous avons opté pour cette démarche qui était plus simple à mettre en œuvre car certains substrats carbonés, tel que le pyruvate de sodium, peuvent être utilisés pour cela.

14.2.2.1.1. Expérience

Cette expérience a été menée suivant une procédure adaptée des travaux de Dingman et Stahly (1983). Les cultures ont été réalisées dans un milieu liquide GYP dans lequel le glucose a été substitué par le pyruvate de sodium. Le pH des milieux a été ajusté à sept avant la stérilisation. Le rôle joué par le pyruvate dans la croissance et la sporulation a été évalué après 72 heures de culture, par un dosage enzymatique de l'acide lactique et par un dénombrement des biomasses et des spores sur gélose GYP.

14.2.2.1.2. Résultats et discussion

Le tableau [14.1](#), montre une étude comparative de la croissance de *B. coagulans* en présence du glucose et du pyruvate de

sodium comme source de carbone. Ces résultats montrent que le glucose peut être substitué par le pyruvate de sodium pour la croissance de *B. coagulans*. Mais que contrairement au glucose le métabolisme du pyruvate n'aboutit pas à la formation d'acide lactique dans le milieu. Nous assistons plutôt à une alcalinisation du milieu, traduite par l'augmentation du pH des cultures. Concernant la production de spores, nous observons que les cultures effectuées avec le pyruvate de sodium ne donnent pas plus de spores que celles réalisées avec le glucose. Les rendements de sporulation se situent autour de 1% dans les deux cas.

Tableau 14.1: Effet de l'accumulation de l'acide lactique dans l'environnement des cellules sur la croissance et la sporulation de *B. coagulans* LMG 6326.

Substrats	pH	Ac. Lactique (g/l)	Biomasse Log(cfu/ml)	Spores log(cfu/ml)	Sporulation (%)
Glu (0,5%)	5,2 ± 0,1	3,8 ± 0,2	8,6 ± 0,2	6,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1
Glu (1%)	4,9 ± 0,3	4,9 ± 0,1	8,9 ± 0,2	6,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1
Pyr (0,5%)	8,2 ± 0,3	0	8,6 ± 0,3	7,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2
Pyr (1%)	8,8 ± 0,2	0	7,1 ± 0,3	6,3 ± 0,2	0,9 ± 0,1

Glu : Glucose ; *Pyr* : Pyruvate de sodium ; Les mesures ont été effectuées après 72 heures d'incubation sous agitation, la quantité d'acide lactique produite a été déterminée par un dosage enzymatique avec la LDH.

Les observations effectuées dans cette expérience nous permettent de conclure que la sporulation de *B. coagulans* se déroule de la même manière en présence et en absence de l'acide lactique. L'accumulation de ce composé dans le milieu n'aurait donc pas d'impact direct sur la sporulation.

Les travaux de Dingman et Stahly (1983), sont les seuls que nous avons rencontrés, traitant du phénomène d'alcalinisation des milieux suite à l'utilisation du pyruvate comme source de carbone par les *Bacillus*. Ces auteurs ne donnent pas de description précise des mécanismes conduisant à cette alcalinisation. Ils ont toutefois formulé une hypothèse à laquelle nous adhérons car elle est fort probable. Selon cette hypothèse, l'alcalinisation du milieu serait liée à la bioconversion des acides aminés qui libérerait ainsi des composés ammoniacaux, entraînant une hausse du pH du milieu. Ainsi, l'utilisation du pyruvate comme source de carbone pourrait entraîner une modification des voies métaboliques en activant les décarboxylases et/ou désaminases cellulaires. Cette action aurait pour effet d'orienter le métabolisme vers la bioconversion des acides aminés. Nous ne pouvons exclure l'éventualité que d'autres types de mécanismes biochimiques puissent participer à cette régulation du métabolisme.

14.2.2.2. Accumulation de métabolites actifs sur la sporulation

Cette étude a été menée dans le but de vérifier l'existence d'une régulation de type *quorum sensing* dans la sporulation de *B. coagulans*. Cette régulation fait référence à l'accumulation de métabolites actifs sur la sporulation dans l'environnement des cellules. Les molécules de *quorum sensing* ont été identifiées dans la sporulation de plusieurs micro-organismes dont *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens*. Aucune étude n'a encore été réalisée pour mettre en évidence une régulation similaire dans la sporulation de *B. coagulans*.

14.2.2.2.1. Expérience

La recherche de substances actives sur la sporulation a été effectuée dans différentes cultures de *B. coagulans* LMG 6326, (bouillon, gélose et billes d'alginate). Ces travaux ont été réalisés suivant une procédure développée par Tseng et Labbe (2000), chez *C. perfringens*. Des surnageants de cultures ont été séchés par lyophilisation, puis les facteurs de sporulation ont été préparés en milieu aqueux à partir des poudres obtenues, de sorte que leurs concentrations soient 50 fois supérieures à celles des matériaux d'origine (25 fois pour les cultures en bouillon). La présence de facteurs de sporulation dans les solutions concentrées a été mise en évidence à par des tests de sporulation en milieu liquide GYP. Des proportions de 1% (v/v) de solutions concentrées ont été utilisées pour les tests de sporulation.

14.2.2.2.2. Résultats et discussion

Le tableau 14.2, montre les moyennes calculées à partir des dénombrements cellulaires effectués dans les tests de sporulation. Ces moyennes ont été calculées à partir de trois expériences différentes correspondant à trois opérations de préparation des facteurs de sporulation. Nous voyons dans ce tableau que les rendements moyens de sporulation sont de 1% environ dans les cultures témoins et de 11% et 15% respectivement dans les cultures testées avec les facteurs de sporulation issus de milieux gélosés et de billes d'alginate. Les solutions préparées dans les bouillons donnent des rendements de sporulation moins importants (5% environ) que celle des cultures immobilisées.

Tableau 14.2: Mise en évidence de la présence de facteurs extracellulaires de sporulation dans les cultures de *B. coagulans* LMG 6326.

Traitements	Biomasse Log (cfu/ml)	Spores Log (cfu/ml)	% spores
Blanco	7,79 ± 0,09	5,30 ± 0,03	0,3 ± 0,04
Témoins	7,78 ± 0,13	5,77 ± 0,02	1,0 ± 0,1
FS-ML	7,79 ± 0,09	6,45 ± 0,08	5,0 ± 1,3
FS-BA	7,81 ± 0,03	7,01 ± 0,06	15,3 ± 1,1
FS-MG	7,72 ± 0,02	6,78 ± 0,10	11,5 ± 2,8

Témoins : cultures réalisées avec un surnageant de culture concentré 25 fois dans un milieu GYP stérile ; Blanco : culture de *B. coagulans* réalisée sans aucun ajout, FS-ML : Facteurs de sporulation concentrés 25 fois à partir d'une culture réalisée en milieu liquide ; FS-BA : Facteurs de sporulation concentrés 50 fois à partir d'une culture réalisée dans des billes d'alginate ; FS-MG : Facteurs de sporulation concentrés 50 fois à partir d'une culture réalisée en milieu gélosé.

L'analyse de ces résultats par un traitement statistique ANOVA (à un facteur contrôlé et avec 5% de risque d'erreur) a montré que les différences de sporulation observées étaient significatives dans le cas des géloses et des billes d'alginate. Nous en déduisons que les solutions utilisées contiennent des substances actives sur la sporulation. Cela montre aussi que l'accumulation de métabolites dans le milieu extracellulaire peut être envisagé pour expliquer l'importance des cultures immobilisées pour la sporulation.

14.2.3. Conclusion

Ces travaux ont été réalisés dans le but de comprendre le rôle joué par les cultures immobilisées dans l'optimisation de la sporulation des bactéries acidifiantes en prenant *B. coagulans* comme modèle. Les expériences réalisées en milieu liquide ont montré qu'un important transfert d'oxygène et une accumulation d'acide lactique ne peuvent pas expliquer le rôle joué par l'immobilisation dans la sporulation. Par contre, l'accumulation dans les milieux de culture, de composés agissant comme des facteurs de sporulation peut être envisagée. Dans ce cas le modèle du "*quorum sensing*" peut être utilisé pour expliquer le phénomène observé à l'image du modèle identifié chez *B. subtilis*. Dans ce modèle, l'immobilisation interviendrait en contribuant à l'amplification de la concentration des métabolites actifs dans le voisinage des cellules.

14.3. Production de spores de *B. coagulans* en culture immobilisée

14.3.1. Introduction

Ce travail rassemble un ensemble d'investigation montrant la possibilité de produire des spores de *B. coagulans* par la technologie des cultures immobilisées. L'ensemble des procédés de production de

biomasse (culture/récolte/séchage/stockage) a ainsi été évalué pour cette technologie de production microbienne.

14.3.2. Systèmes d'immobilisation pour la production de spores de *B. coagulans*

Différents systèmes d'immobilisation ont été investigués dans cette expérience pour la production de spores chez *B. coagulans*. Les immobilisations ont été réalisées dans des billes d'alginate par inclusion et sur des billes préformées. Des immobilisations ont aussi été réalisées dans des gels de *k*-carraghénane et sur milieux gélosés.

14.3.2.1. Expérience

Tous les milieux de cultures utilisés dans ce travail ont été préparés dans le GYP. Les gels d'alginate et de *k*-carraghénane ont été préparés avec des concentrations de 1,5 % (p/v). Les résultats obtenus avec ces formulations ont été comparés aux cultures réalisées en milieux liquides et sur gélose. Les quantités de biomasses produites dans chaque support ont été déterminées par rapport aux volumes de milieux utilisés. Dans le cas des géloses, la biomasse a été récoltée dans 20 ml d'eau physiologique en tenant compte de la quantité de milieu coulée dans les boîtes de Pétri.

14.3.2.2. Résultats et discussion

La figure [14.2](#) montre les résultats des tests de croissance de *B. coagulans* suivant différentes modalités d'immobilisation des cellules. Les valeurs présentées sur cette figure sont des moyennes calculées à partir de deux expériences. L'avantage des cultures immobilisées pour la sporulation se confirme dans ces expériences. Nous voyons que les taux de sporulation obtenus, varient de 1% pour les cultures en milieu liquide, à 40% et 80% environ pour les cultures immobilisées. Les billes d'alginate et les gels de *k*-carraghénane donnent des quantités de spores quasi identiques, mais une différence est observée dans les taux de sporulation. Cette différence est due au fait que les biomasses totales sont plus abondantes dans les gels de *k*-carraghénane que dans les billes d'alginate. La production de spores de *B. coagulans* peut donc être envisagée en culture immobilisée dans les gels de *k*-carraghénane ou avec des billes d'alginate. Pour ce qui concerne les billes d'alginate nous pensons qu'il est plus avantageux d'utiliser des billes préformées pour la production de spores à grande échelle. En effet, ce système de culture est plus facile à mettre œuvre et limite considérablement les risques de contamination que nous avons très souvent constaté dans l'immobilisation avec des billes formées après stérilisation. L'avantage de cette technique repose dans le fait que le milieu d'immobilisation est préparé et stérilisé séparément puis les

cellules sont laissées en diffusion dans les espaces libres des billes où elles peuvent proliférer.

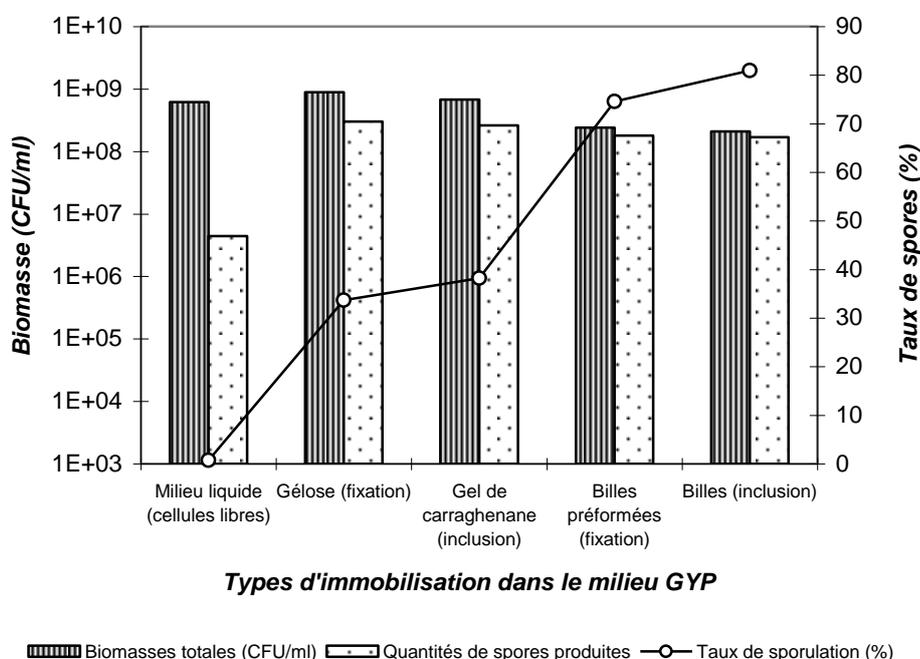


Figure 14.2: Croissance et sporulation de *B. coagulans* en fonction du type d'immobilisation appliqué.

Sur la figure 14.2, nous pouvons constater également que la production de biomasse est limitée dans les billes d'alginate, certainement à cause de l'accumulation de métabolites dans l'environnement des cellules.

14.3.3. Essais d'optimisation de la croissance de *B. coagulans* dans les billes d'alginate

L'optimisation de la croissance de *B. coagulans* dans les billes d'alginate a été envisagée par la réduction des gradients de concentration dans le voisinage des cellules et par l'enrichissement des milieux de culture. Ces deux objectifs ont été poursuivis dans une seule opération, notamment en ajoutant des quantités variables de milieu liquide GYP dans les cultures. Cette stratégie permettait à la fois d'enrichir le milieu en nutriments et de créer une dilution réduisant l'effet de l'accumulation des produits inhibiteurs pour la croissance.

14.3.3.1. Expérience

Les fioles contenant les billes d'alginate ensemencées ont été complétées avec différentes quantités de milieux liquides GYP (stériles), de 10 % à 50 % (v/v) par rapport au volume des billes d'alginate. Toutes les cultures ont été incubées pendant 72 heures sans agitation. A la fin de la période d'incubation, les dénombrements ont été réalisés après que les cultures soient dissoutes avec un tampon phosphate. Toutes les cultures ont été ramenées au même volume pour faciliter les comparaisons.

14.3.3.2. Résultats et discussion

Les résultats des essais d'optimisation de la croissance de *B. coagulans* par la réduction du gradient de concentration dans le voisinage des cellules et l'enrichissement du milieu sont montrés dans les figures 14.3 et 14.4. L'analyse de ces figures montre que la stratégie utilisée donne des résultats évoluant dans le sens de ce qui était espéré. A savoir que les quantités de biomasse formées augmentent avec la dilution des cultures. Nous remarquons toutefois que ces gains de biomasse ne sont pas suffisants par rapport aux quantités de milieux utilisées et ne sont de ce fait rentables. Le taux de sporulation évolue de manière inverse par rapport au taux de dilution du milieu. Cette remarque est valable aussi bien pour les cellules immobilisées par inclusion (figure 14.3) que pour celles immobilisées sur des billes préformées (figure 14.4). Cette remarque rejoint les observations précédentes et montre que l'accumulation de métabolites dans le voisinage des cellules est d'une part défavorable pour la multiplication cellulaire et d'autre part favorable à l'initiation de la sporulation.

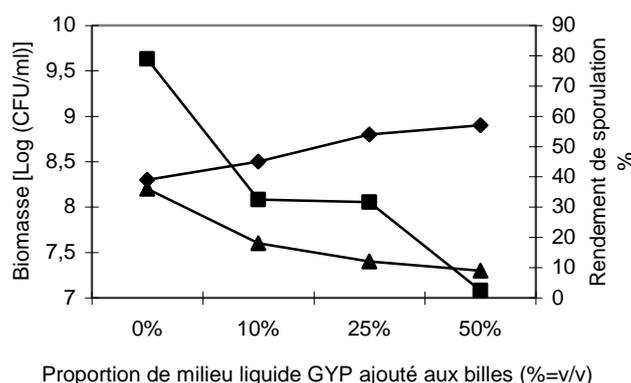


Figure 14.3: Croissance et sporulation de *B. coagulans* immobilisé par inclusion dans les billes d'alginate en présence de quantités variables de bouillon GYP. Biomasse totale (◆) quantité de spores produites (▲) rendements de sporulation (■)

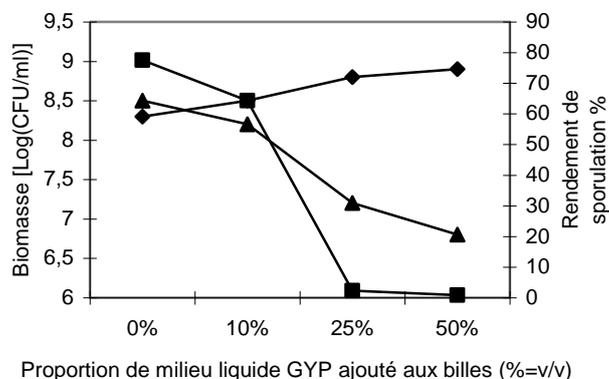


Figure 14.4: Croissance et sporulation de *B. coagulans* immobilisé sur des billes d'alginate préformées en présence de quantités variables de bouillon GYP. Biomasse totale (◆) quantité de spores produites (▲) rendements de sporulation (■).

14.4. Etude d'un schéma de production de spores sur billes d'alginate

Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer les avantages et les limites que les opérations classiques de production de biomasse pourraient avoir dans la production des spores de *B. coagulans* sur billes d'alginate. Les étapes de récolte, de séchage (lyophilisation) et la conservation des poudres cellulaires ont ainsi été analysées pour les cultures sur billes d'alginate. Ces essais ont été réalisés sur des volumes de 1000 ml de billes préformées, inoculées avec 10 ml d'une préculture de 24 heures et incubées à 45°C pendant 72 heures.

14.4.1. Importance de l'étape de récolte des biomasses

Deux systèmes ont été envisagés pour récolter la biomasse dans les billes d'alginate : le rinçage avec de l'eau physiologique stérile et la dissolution dans un tampon phosphate.

Les dénombrements effectués sur le matériel récolté à la fin des cultures sont présentés dans le tableau 14.3. Les volumes de tous les produits ont été ramenés à 1100 ml pour faciliter les comparaisons. Nous voyons dans ce tableau que la technique de récolte des biomasses par la dissolution des billes est plus intéressante que celle par rinçage des billes. Les rendements de récoltes obtenus par cette approche sont nettement plus importants. Les quantités de cellules récoltées par cette technique sont supérieures à celle obtenues par la technique du rinçage des billes. Nous pensons que cette différence peut s'expliquer par la diffusion des cellules dans les espaces libres des billes d'alginate. En effet, comme nous l'avons décrit dans la revue bibliographique et montré

sur la figure 5.2, les billes d'alginate sont des structures poreuses, possédant de nombreuses cavités dans leur structure et dans lesquelles les cellules sont susceptibles de se loger et de se fixer de manière durable (Gonçalves *et al.*, 1992). D'autres phénomènes pourraient être associés à la rétention des cellules sur les billes. Mais cette situation fait qu'il est plus avantageux de récolter la biomasse dans le mélange constitué des cellules et de l'alginate.

Tableau 14.3: Biomasses récoltées par différentes techniques dans les billes d'alginate après 72 heures de culture

	Biomasse totale [Log (CFU/ml)]	Quantité de spores [Log (CFU/ml)]
Récolte par rinçage	8,41 ± 0,03	8,32 ± 0,06
Récolte par dissolution	8,55 ± 0,11	8,44 ± 0,10

Les quantités de matériels récoltées ont été équilibrées à 1100 ml pour chaque échantillon.
Les quantités totales de biomasses produites pour les 1100 ml de matériel récolté ont été estimées pour chaque système de récolte et utilisée dans le calcul des rendements de récolte.

14.4.2. Importance du séchage et de la conservation des poudres

Le matériel récolté a été concentré par centrifugation puis séché au lyophilisateur. Les poudres cellulaires obtenues ont été stockées dans des tubes Falcon et conservées à 4°C.

Le tableau 14.4, montre les moyennes des dénombrements cellulaires effectués sur les poudres obtenues. Nous ne notons pas de différences significatives durant l'étape de séchage pour les produits récoltés. Les biomasses récoltées étant constituées essentiellement de spores, leur séchage se déroule de manière aisée avec d'excellents rendements de production. Notre attention a plutôt été portée sur la qualité des poudres cellulaires obtenues dans le mélange avec l'alginate. Ces poudres se sont montrées dans la majorité des cas assez difficiles à remettre en solution, comparativement aux poudres obtenues dans les échantillons récoltés par rinçage des billes et qui ne contiennent que très peu d'alginate. Nous avons aussi remarqué que ces poudres avaient une tendance au mottage (caractère collant lié à un problème de transition vitreuse) lorsqu'elles ne sont pas placées dès la fin de la lyophilisation à l'abri de l'humidité.

Tableau 14.4: Biomasses obtenues à la fin de la lyophilisation des produits récoltés

	Séchage du produit récolté par rinçage	Séchage du produit récolté par dissolution
Poudres obtenues (g)	12,6 ± 2,5	58,9 ± 5,8
Biomasse totale [Log (CFU/g)]	10,19 ± 0,12	9,68 ± 0,15
Quantité de spores [Log (CFU/g)]	10,14 ± 0,16	9,66 ± 0,10
Taux de survie au séchage (%)	73,1 ± 2,2	78,5 ± 3,6

Les taux de survie ont été calculés par rapport aux biomasses totales.

14.5. Conclusions

La production de spores dans les billes d'alginate est une entreprise envisageable à l'échelle pilote. Pour cela, il conviendra:

- d'effectuer les cultures sur des billes préformées en ajoutant 1% de préculture aux cultures pour limiter les effets de dilution ;
- de récolter les biomasses dans l'alginate si on veut obtenir un bon rendement de récolte et si l'alginate ne pose pas de problème pour les applications auxquelles les spores sont destinées ;
- que les poudres soient bien séchées et qu'elles restent à l'abri de l'humidité, surtout pour celles contenant d'importantes quantités d'alginate.

Le principal problème qui peut se poser dans l'utilisation des billes d'alginate dans la production de spores à l'échelle pilote, réside dans le taux de croissance qui est faible sur ce support. Nous pensons que certains types de cultures contrôlées (fermenteurs) pour substrats solides peuvent toutefois être utilisés pour réduire le niveau d'inhibition. Nous pensons notamment aux systèmes de culture sur lits fluidisés et aux fermenteurs stationnaires à plateaux, souvent utilisés dans l'immobilisation cellulaire. Des recherches additionnelles mériteraient d'être entreprises pour mesurer l'importance de ces technologies dans la production de spores sur billes d'alginate.

CHAPITRE 15. ANALYSE D'UNE REGULATION DE TYPE QUORUM SENSING DANS LA SPORULATION DE *B. COAGULANS* LMG 6326

15.1. Introduction

La formation d'un gradient de concentration a été retenue dans les expériences précédentes pour expliquer l'avantage des cultures immobilisées dans la sporulation des bactéries acidifiantes. Comme nous l'avons souligné, cette hypothèse fait référence à une régulation du type "*quorum sensing*" qui pourrait exister chez cette bactérie. Selon Lazazzera (2000), ce système de régulation de la sporulation est une réponse des micro-organismes à la perception d'un seuil de densité cellulaire. Cette régulation est assurée par des molécules extracellulaires qui contrôlent l'expression de plusieurs comportements dont la sporulation. Nous avons choisi d'étudier ce comportement dans la sporulation de *B. coagulans* en prenant comme modèle l'exemple de *Bacillus subtilis* rapporté par Solomon *et al.* (1996) et Waldburger *et al.* (1993) ainsi que celui de *Clostridium perfringens* rapporté par Tseng et Labbe (2000). Des expériences ont ainsi été effectuées dans ce chapitre dans le but de comparer le comportement de *B. coagulans* par rapport aux observations effectuées dans les travaux antérieurs, sur la sporulation de *B. subtilis* et *C. perfringens*.

15.2. Sporulation de *B. coagulans* en présence de quantités variables de facteurs de sporulation

Les facteurs de sporulation intervenant dans le *quorum sensing* de *Bacillus subtilis* sont des oligopeptides (pentapeptides). Ces molécules sont des phéromones puisqu'elles agissent sur la sporulation à de très faibles concentrations, de l'ordre de 20 nM (Lazazzera et Grossman, 1998). Les expériences réalisées pour *B. coagulans* ont montré que l'activité des facteurs de sporulation concentrés 50 fois dans les cultures était significative pour des quantités de 1% (v/v). Des quantités variables ont été ajoutées aux cultures dans l'expérience suivante afin de déterminer un profil de sporulation chez *B. coagulans* pour ces facteurs de sporulation.

15.2.1. Expérience

La conduite générale de cette expérience a été adaptée des travaux de Tseng et Labbe (2000). Les facteurs de sporulation utilisés ont été préparés à partir de cultures effectuées sur billes d'alginate. Les tests de sporulation ont été réalisés sur des cultures de 10 ml (GYP) avec des quantités de facteurs de sporulation variant de 0,05 % à 10 % (v/v) par rapport aux cultures. Toutes les cultures

ont été inoculées avec 1 % de préculture et d'incubées à 45°C pendant 24 heures.

15.2.2. Résultats et discussion

La figure 15.1, montre les résultats des tests de sporulation de *B. coagulans* en fonction de la quantité de facteurs de sporulation utilisée dans les cultures. La première remarque que nous faisons de cette figure est que le profil de sporulation obtenu confirme les observations précédentes et montre que les solutions ajoutées aux cultures possèdent une activité sur la sporulation. Cette observation confirme également le rôle joué par l'accumulation de métabolites extracellulaires sur la sporulation de *B. coagulans*. Une analyse détaillée du profil de sporulation montre que pour les quantités de 0% à 0,1% (v/v) de facteurs de sporulation dans les cultures, la sporulation n'est pas influencée. La quantité minimale de facteurs pour laquelle nous observons une activité significative sur la sporulation est de 0,5% environ. Nous remarquons aussi que pour toutes les concentrations supérieures à cette valeur la sporulation est améliorée, mais les quantités de spores produites restent quasi identiques. Les quantités maximales de spores obtenues sont de l'ordre de 10^7 CFU/ml environ alors que dans les échantillons témoins elles sont de $5 \cdot 10^5$ CFU/ml environ.

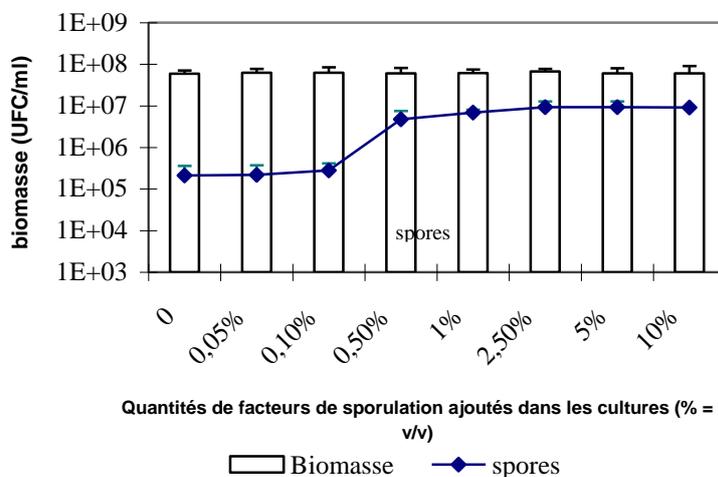


Figure 15.1: Sporulation en fonction de la quantité de facteurs de sporulation ajoutée aux cultures.

Dans les travaux antérieurs sur *B. subtilis* et *C. perfringens*, les quantités de spores obtenues avec 0,1% (v/v) de facteurs de sporulation, concentré 25 fois dans les cultures, variaient de 10^6 à 10^8 CFU/ml, alors qu'elles étaient de l'ordre de 10 à 100 CFU/ml

dans les témoins (Lazazzera et Grossman, 1998 ; Tseng et Labbe, 2000). Signalons que dans ces travaux antérieurs, l'activité des facteurs de sporulation a été mise en évidence sur des souches témoins. Ces souches témoins sont des bactéries de la même espèce possédant des difficultés à former des spores. Ce sont en général des souches mutantes (Lazazzera et Grossman, 1998) ou des souches sauvages (Tseng et Labbe, 2000). Cette approche est différente de celle que nous utilisons. Dans notre cas, les facteurs de sporulation sont testés directement sur la souche qui les produit. L'utilisation d'une souche plus sensible aurait certainement apporté d'autres types d'information sur l'activité des facteurs de sporulation utilisés. En effet, dans le cas où nous nous trouvons, il est difficile d'avoir une parfaite estimation de l'activité des substances ajoutées aux cultures avec les solutions utilisées. Si les phénomènes observés dans la sporulation de *B. coagulans* en présence du matériel utilisé sont similaires au *quorum sensing*, il serait encore indispensable de caractériser les substances actives dans ce matériel pour pouvoir l'affirmer formellement.

15.3. Relations entre la sporulation de *B. coagulans* et *B. subtilis*

Bacillus subtilis est le matériel de référence dans l'étude du *quorum sensing* dans la sporulation des organismes procaryotes. C'est aussi la seule bactérie pour laquelle les mécanismes biochimiques et génétiques du *quorum sensing* ont été suffisamment élucidés. Il était de ce fait intéressant pour nous de mettre en évidence les liens qui existeraient entre cette espèce et *B. coagulans* pour ce qui concerne la sporulation. La souche *B. subtilis* S499 a été choisie pour ce travail. Cette souche sporule de manière optimale en milieu liquide et produit des lipopeptides durant sa croissance (Akpa, 2002). Ces lipopeptides étant produits de manière différente durant la croissance, ils peuvent constituer un moyen indirect de mesure de l'état physiologique des cultures.

15.3.1. Expérience

Les cultures de *Bacillus subtilis* S499 ont été réalisées dans un milieu optimisé décrit par Jacques *et al.* (1999). La production des facteurs de sporulation et les tests biologiques ont été réalisés à la fois pour *B. coagulans* et pour *B. subtilis* suivant la procédure décrite dans les expériences précédentes. Les quantités de lipopeptides produites ont été déterminées pour les cultures de *Bacillus subtilis* par un dosage HPLC-C18, après 24 h, 48 h et 72 h d'incubation.

15.3.2. Résultats et discussion

Les expériences réalisées n'ont pas mis en évidence de relations clairement exprimées entre les développements de ces deux

bactéries avec l'addition des facteurs de sporulation concentrés dans les cultures. Nous avons observé plutôt une inhibition et une lyse cellulaire chez *B. coagulans* en présence du matériel concentré chez *Bacillus subtilis*. Il n'y a pas de doute sur le fait que ce comportement soit lié à la présence de composés toxiques pour *B. coagulans* dans le milieu extracellulaire de culture de *B. subtilis*. C'est dans le profil de production des lipopeptides chez *B. subtilis* S499 que quelques changements significatifs ont été observés. Ces observations concernent l'évolution de la concentration des trois familles de lipopeptide, dosés dans les cultures au cours du temps. Ces observations sont résumées dans les figures 15.2, 15.3 et 15.4. Elles peuvent être interprétées assez brièvement comme suit:

- Après 24 heures de culture dans les conditions mentionnées ci-dessus, les concentrations des trois familles de lipopeptides sont plus importantes dans les échantillons complétés avec des quantités de 1% et 10% (v/v) du matériel concentré dans les cultures de *B. coagulans*, par rapport aux échantillons non traités.
- Après 48 heures de culture la synthèse des lipopeptides est fortement ralentie dans les échantillons contenant ces matériaux alors qu'elle croît dans les échantillons non traités (témoins).
- Après 72 heures, nous nous trouvons dans une situation qui est tout à fait l'inverse de ce qui est observé à 24 heures. C'est à dire que les quantités de lipopeptides sont nettement plus importantes dans les témoins alors que leurs productions sont limitées dans les cultures testées avec les facteurs de sporulation de *B. coagulans*.

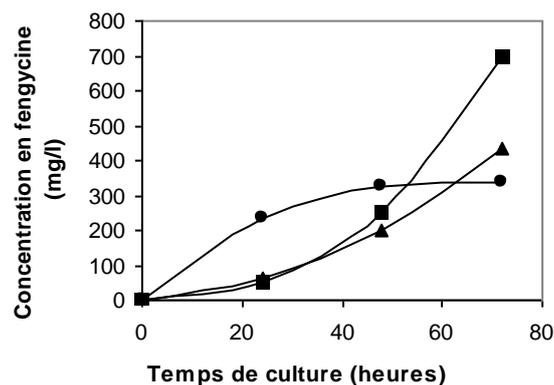


Figure 15.2: Impact du matériel concentré dans les cultures de *B. coagulans* sur la production des fengycines chez *B. subtilis* S499. (■) Cultures témoins, réalisées sans complémentation ; (▲) Cultures réalisées avec 1% (v/v) de facteurs de sporulation; (●) Cultures réalisées avec 10% (v/v) de facteurs de sporulation.

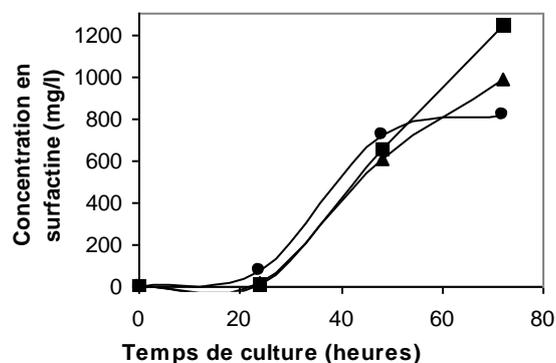


Figure 15.3: Impact du matériel concentré dans les cultures de *B. coagulans* sur la production des surfactines chez *B. subtilis* S499. (■) Cultures témoins, réalisées sans complémentation ; (▲) Cultures réalisées avec 1% (v/v) de facteurs de sporulation ; (●) Cultures réalisées avec 10% (v/v) de facteurs de sporulation.

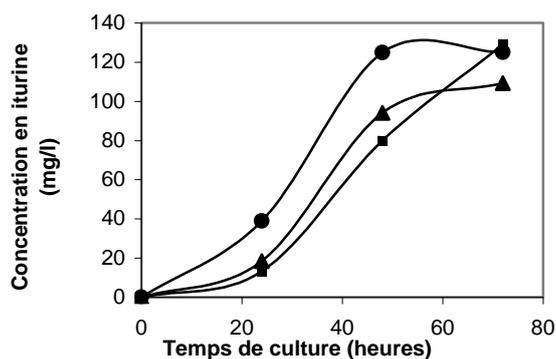


Figure 15.4: Impact du matériel concentré dans les cultures de *B. coagulans* sur la production des iturines chez *B. subtilis* S499. (■) Cultures témoins, réalisées sans complémentation ; (▲) Cultures réalisées avec 1% (v/v) de facteurs de sporulation ; (●) Cultures réalisées avec 10% (v/v) de facteurs de sporulation.

L'analyse de la quantité totale de lipopeptide produite dans les cultures (Figure 15.5) donne des résultats allant dans le même sens que ce qui est observé pour chacune des familles de lipopeptide prise individuellement.

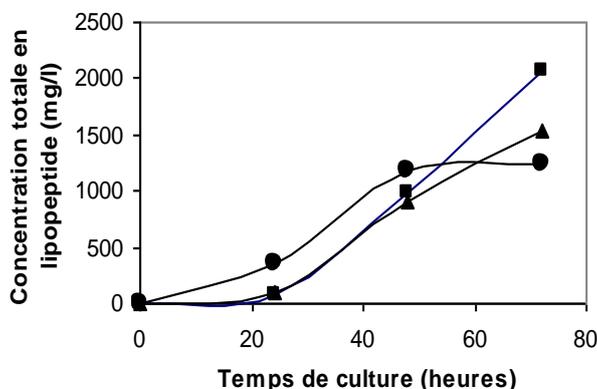


Figure 15.5: Quantités totales de lipopeptides produites dans les cultures de *B. subtilis* S499. (■) Cultures témoins ; (▲) Cultures réalisées avec 1% (v/v) de facteurs de sporulation; (●) Cultures réalisées avec 10% (v/v) de facteurs de sporulation.

Les résultats concernant la production des lipopeptides sont significatifs mais nous pensons qu'ils restent insuffisants pour faire l'objet de conclusions précises sur l'existence de relations entre la sporulation de *B. coagulans* et la production de lipopeptides chez *B. subtilis*. Les phénomènes observés dans l'évolution de la concentration des lipopeptides pour les cultures pourraient aussi bien être en relation avec les métabolites agissant sur la sporulation ou être liés à d'autres types de substances présentes dans les solutions utilisées. La seule certitude que nous pouvons avoir est que, quelles que soient la nature des composés influençant la production des lipopeptides dans le matériel utilisé, ils sont excrétés par *B. coagulans*. Ces observations gagneraient à être approfondies par des analyses similaires sur d'autres souches de *B. subtilis* productrices de lipopeptides.

15.4. Facteurs extracellulaires de sporulation chez d'autres bactéries acidifiantes

Suivant le protocole établi dans les travaux sur *B. coagulans*, la présence de facteurs extracellulaires de sporulation a été vérifiée dans les cultures de *B. racemilacticus* et *B. laevolacticus*. Des matériaux ont ainsi été concentrés 25 fois à partir des milieux extracellulaires de culture de ces bactéries. Les tests de sporulation ont été réalisés dans un milieu GYP avec des concentrations de 1%, et 5% (v/v) de facteurs de sporulation.

15.4.1. Résultats et discussion

Aucun changement n'a été observé dans la sporulation de *B. laevolacticus* et *B. racemilacticus* à l'issu des expériences réalisées avec les solutions concentrées dans les cultures. Pour toutes les cultures réalisées, les quantités de spores produites ont été maintenues à 10^7 CFU/ml environ pour *Bacillus laevolacticus* et 6.10^7 CFU/ml pour *B. racemilacticus* (24 heures). A ce stade du travail, nous avons choisi ne pas tirer de conclusions à partir de ces observations. Nous pensons en effet qu'il serait hasardeux d'affirmer que la sporulation de ces bactéries ne fait pas intervenir de régulation de type *quorum sensing*. Nous pensons aussi qu'il serait possible que la stratégie adoptée pour mettre en évidence ce phénomène chez *B. coagulans* ne soit pas toujours favorable pour d'autres bactéries acidifiantes du même genre. N'oublions pas que même chez les différentes souches de l'espèce *B. subtilis* il existe d'importantes différences dans la manière dont le *quorum sensing* est mis en évidence. Selon la plupart des auteurs les facteurs de sporulation de cette bactérie sont directement actifs sur la sporulation *in vitro*, mais pour d'autres auteurs, dont Waldburger *et al.* (1993), ces facteurs ne sont actifs *in vitro* qu'en présence de concentrations de l'ordre de 40 µg/ml de proline ou d'arginine.

15.5. Propriétés physicochimiques des facteurs de sporulation de *B. coagulans*

Ces travaux ont été réalisés dans le but de déterminer quelques propriétés physiques et chimiques des facteurs de sporulation intervenant dans la sporulation de *B. coagulans*. Puis de les comparer aux propriétés connues chez des facteurs de sporulation de *B. subtilis* (Waldburger *et al.*, 1993) et *C. perfringens* (Tseng et Labbe, 2000).

15.5.1. Résistance des facteurs de sporulation vis-à-vis des conditions environnementales

15.5.1.1. Stabilité à la chaleur

La résistance des facteurs de sporulation à la chaleur a été déterminée pour différentes températures. Cette expérience a été réalisée avec 1 ml de la solution concentrée 50 fois dans le milieu extracellulaire de culture. Ce matériel a été traité à 45°C pendant 2 heures, à 80°C pendant 20 min et à 100°C pendant 20 min.

Le tableau 15.1, montre les résultats des expériences concernant ces travaux. Nous observons dans ce tableau que l'activité des facteurs de sporulation n'est pas affectée par les traitements thermiques utilisés. Ces observations corroborent celles

effectuées par Tseng et Labbe (2000), concernant les substances extracellulaires intervenant dans la sporulation de *C. perfringens*. Selon Waldburger *et al.* (1993), les oligopeptides intervenant dans le *quorum sensing* de *B. subtilis* possèdent des résistances thermiques aussi importantes et même à 120°C pendant 20 min.

Tableau 15.1: Résistance aux températures extrêmes

Traitements	Biomasse [Log (CFU/ml)]	Spores [Log (CFU/ml)]	Sporulation (%)
Blanco	7,81 ± 0,05	5,90 ± 0,02	1,1 ± 0,4
Témoins	7,79 ± 0,03	6,14 ± 0,13	2,6 ± 0,8
Tests 45°C	7,79 ± 0,04	6,93 ± 0,07	13,1 ± 1,1
Tests 80°C	7,80 ± 0,03	6,97 ± 0,05	14,2 ± 0,6
Tests 100°C	7,79 ± 0,03	6,92 ± 0,06	13,6 ± 0,3

Témoins : Cultures effectuées avec des solutions concentrées 50 fois dans une culture nonensemencée ; Blanco : culture réalisée sans aucun ajout ; Tests 45°C : Cultures effectuées avec des facteurs de sporulation traités à 45°C (2 h) ; Tests 80°C : Cultures effectuées avec des facteurs de sporulation traités à 80°C (20 min) ; Tests 100°C : Cultures effectuées avec des facteurs de sporulation traités à 100°C (20 min).

15.5.1.2. Stabilité aux pH extrêmes

La résistance des facteurs de sporulation a été déterminée vis-à-vis des pH extrêmes, notamment à pH 2 et pH 11. Pour la réalisation de cette expérience, le pH de la solution concentrée 50 fois dans le milieu extracellulaire a été ajusté à 2,0 avec du HCl 3% et à 11,0 avec du NaOH 1N. Ces produits ont ensuite été incubés à 37°C pendant 2 heures avant d'être neutralisés et utilisés pour les tests de sporulation.

Le tableau 15.2, montre les résultats des expériences concernant l'évaluation de la résistance des facteurs de sporulation vis-à-vis des pH extrêmes. Nous remarquons que l'activité des substances concentrées dans les solutions n'est pas modifiée par les pH extrêmes (acides et alcalins). Cette observation corrobore les conclusions auxquelles Shih et Labbe (1996), sont parvenus concernant le comportement des facteurs extracellulaires utilisés dans la sporulation de *C. perfringens*. Selon Lazazzera et Grossman (1998), les facteurs de sporulation de *Bacillus subtilis* seraient autant résistants à l'action des pH extrêmes.

Tableau 15.2: Résistance aux pH extrêmes

Traitements	Biomasse [Log (CFU/ml)]	Spores [Log (CFU/ml)]	Sporulation (%)
Blanco	7,83 ± 0,04	6,04 ± 0,03	1,2 ± 0,1
Témoins	7,79 ± 0,02	6,23 ± 0,03	2,6 ± 0,1
Tests pH 2,0	7,80 ± 0,11	6,93 ± 0,08	13,3 ± 1,3
Tests pH 11,0	7,80 ± 0,09	6,91 ± 0,05	12,6 ± 0,8

Témoins : Cultures effectuées avec des solutions concentrées 50 fois dans une culture nonensemencée ; Blanco : culture réalisée sans aucun ajout ; Tests pH 2,0 : Cultures effectuées avec des facteurs de sporulation maintenus à pH 2, pendant 2 h ; Tests pH 11 : cultures effectuées avec des facteurs de sporulation maintenus à pH 11, pendant 2 h.

15.5.1.3. Stabilité vis-à-vis de l'action des protéases

Le comportement des facteurs de sporulation vis-à-vis des enzymes protéolytiques a été déterminé en présence de quelques protéases. Les protéases utilisées dans ce travail sont, la protéinase K, la papaïne, la trypsine, la pepsine et la chymotrypsine. Les solutions concentrées 50 fois dans le milieu extracellulaire de culture de *B. coagulans* ont été incubées à 37°C pendant 2 h avec 1 mg/ml d'enzymes à pH 7,2 selon la méthode de Waldburger *et al.* (1993).

Les résultats de ces tests (tableau 15.3), montrent que les protéases utilisées n'ont pas d'activité catalytique sur les facteurs de sporulation contenus dans les solutions utilisées. Cette observation nous laisse imaginer que ces substances ne seraient pas de nature protéique, ou alors qu'elles ne posséderaient pas de site de coupure pour les enzymes utilisées. Concernant les oligopeptides de quorum sensing de *B. subtilis*, Waldburger *et al.* (1993), ont montré qu'ils n'étaient pas affectés par l'action des protéases que nous avons utilisés mais aussi pour d'autres enzymes.

Tableau 15.3 : Résistance aux enzymes protéolytiques

Traitements	Biomasse [Log (CFU/ml)]	Spores [Log (CFU/ml)]	Sporulation (%)
Blanco	7,79 ± 0,03	5,84 ± 0,03	1,1 ± 0,2
Témoins	7,83 ± 0,06	5,81 ± 0,02	0,9 ± 0,08
Tests protéinase K	7,74 ± 0,12	6,74 ± 0,03	14,2 ± 2,1
Tests papaïne	7,79 ± 0,02	6,78 ± 0,08	13,6 ± 2,2
Tests trypsine	7,81 ± 0,06	6,86 ± 0,06	14,4 ± 1,6
Tests chymotrypsine	7,76 ± 0,03	6,78 ± 0,12	13,0 ± 2,0
Tests pepsine	7,78 ± 0,02	6,81 ± 0,08	13,8 ± 1,3

Témoins : Cultures effectuées avec des solutions concentrées 50 fois dans une culture nonensemencée ; Blanco : culture réalisée sans aucun ajout ; Pour tous les tests enzymatiques, les facteurs de sporulation ont été incubés dans une solution de 1mg/ml pH 7,2 d'enzyme pendant 2 h à 37°C.

15.5.2. Séparation des facteurs de sporulation sur colonne à phase inverse SPE-C18

15.5.2.1. Expérience

Des essais de séparation des facteurs de sporulation de *B. coagulans* ont été réalisés pour les solutions concentrées 50 fois dans le milieu extracellulaire de culture de cette bactérie. Ces séparations ont été réalisées par chromatographie en phase inverse sur des colonnes de type SPE-C18. Les substances fixées dans ces colonnes ont été éluées avec un gradient de méthanol (0% à 100% v/v). Les fractions éluées ont été séchées au Speed-Vac, puis remises en solution aqueuse pour les tests de sporulation. Les fractions actives sur la sporulation ont ensuite été analysées par chromatographie en phase inverse HPLC-C18. Un mélange d'acétonitrile, d'eau milliQ et d'acide trifluoroacétique (de qualités HPLC) a été utilisé comme solvant d'éluion pour la chromatographie HPLC. Les séparations ont été réalisées en conditions d'éluion isocratiques et en conditions de gradients d'acétonitrile.

15.5.2.2. Résultats et discussion

Le tableau 15.4, montre les quantités de biomasses et de spores produites dans les cultures réalisées avec les fractions recueillies de la séparation. Nous voyons dans ce tableau que ce sont, la solution entière et la première fraction éluée qui ont les plus importantes activités sur la sporulation. Toutes les autres fractions éluées, donnent des rendements de sporulation supérieurs à ceux obtenus dans les témoins mais qui restent tout de même insuffisants par rapport à ce qui est observé avec les deux premiers matériels. Les principales substances participant à la sporulation dans ces solutions seraient de ce fait des composés très polaires.

Tableau 15.4: Séparation des solutions concentrées sur une colonne SPE-C18

Fractions utilisées dans l'essai	Biomasse [Log (CFU/ml)]	spores [Log (CFU/ml)]	Sporulation (%)
Blanco	7,77 ± 0,06	5,73 ± 0,12	0,7 ± 0,2
Témoin	7,79 ± 0,04	5,92 ± 0,02	1,2 ± 0,3
Solution entière (F1)	7,76 ± 0,03	6,93 ± 0,17	14,3 ± 0,8
Fraction non retenue (F2)	7,78 ± 0,03	6,90 ± 0,11	12,3 ± 1,0
TFA 0,1% (F3)	7,75 ± 0,02	6,36 ± 0,10	3,7 ± 0,5
MeOH 25% (F4)	7,80 ± 0,06	6,55 ± 0,05	5,1 ± 0,3
MeOH 50% (F5)	7,79 ± 0,05	6,53 ± 0,06	5,4 ± 0,2
MeOH 100% (F6)	7,79 ± 0,02	6,56 ± 0,08	5,5 ± 0,3

Témoins : effectués avec des solutions concentrées à partir d'une culture nonensemencée ; Blanco : culture réalisée sans aucun ajout ; (F1) solution entière, (F2) fraction non retenue sur la colonne ; (F3) fraction éluée avec du TFA (0,1% v/v); (F4) Fraction éluée avec 25% méthanol/eau ; (4) Fraction éluée avec 50% méthanol/eau ; (F6) Fraction éluée avec 100% méthanol/eau.

La séparation de la solution entière et de la fraction non retenue sur SPE-C18, par chromatographie en phase inverse HPLC-C18, a été réalisée sans succès malgré la combinaison des systèmes d'élution isocratiques et en gradient d'acétonitrile. Cet échec dans la purification est certainement dû à l'importante polarité des composés participant à la sporulation dans ces solutions. Les colonnes octadecyl-C18 contiennent en effet une phase stationnaire apolaire (Si-C₁₈H₃₇) favorables à l'extraction de composés apolaires en présence de solvants polaires. Il conviendrait pour améliorer cette purification d'utiliser un système de séparation favorable à la rétention de composés polaires et mais aussi d'utiliser un milieu minimum (pauvre en matière organique) pour la production des facteurs de sporulation.

15.6. Conclusions

Les analyses effectuées dans ce chapitre ont apporté un nombre important d'information sur la nature des composés extracellulaires agissant sur la sporulation de *B. coagulans*. Le comportement de ces substances vis-à-vis des conditions environnementales serait similaire à ceux des molécules de *quorum sensing* de *B. subtilis* et *C. perfringens*. Ce type de résistance est caractéristique des molécules ne possédant pas d'activité catalytique.

CHAPITRE 16. DISCUSSION GÉNÉRALE

16.1. Concernant la diversité des bactéries acidifiantes isolées dans les environnements du Burkina Faso

Les environnements où des mécanismes d'adaptation sont susceptibles de se mettre en place constituent des réservoirs pour la recherche de bactéries pouvant apporter de nouvelles opportunités aux biotechnologies. Dans ce travail, nous nous sommes fixés l'objectif de parvenir à une contribution significative dans l'étude de la diversité des bactéries acidifiantes à travers la sélection de nouvelles bactéries de ce type dans les environnements du sahel Burkinabé. Les bactéries sporulantes et acidifiantes (acide lactique) retrouvées dans les classifications actuelles appartiennent aux genres *Bacillus* et *Sporolactobacillus* (Nakayama et Yanoshi, 1967a ; Hozapfel et Botha, 1988 ; Yanagida *et al.*, 1997). Le nombre de bactéries acidifiantes isolées dans les échantillons prélevés au Burkina Faso montre que le choix effectué en allant rechercher ce type de bactéries dans ces environnements est un choix judicieux. Les conditions et méthodes de sélections utilisées se sont montrées efficaces en contribuant à limiter la croissance des nombreux germes indésirables abondamment retrouvés dans les sols. C'est notamment le cas des *Clostridium*. Ce travail a de ce fait contribué à décrire une technique efficace de recherche de bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* et apparentés dans les environnements. Les bactéries acidifiantes majoritairement isolées dans les échantillons sont des *Entérocoques*. Une bactérie acidifiante, non sporulante, appartenant au genre *Lactobacillus* (la souche CWBI-P2) a aussi été isolée dans ces échantillons. La présence des *Entérocoques* et du *Lactobacille* CWBI-P2 dans le lot des isolats traduit l'abondance des bactéries non sporulantes dans les échantillons utilisés mais aussi leur adaptation aux conditions climatiques des milieux sahéliens (sols chauds et secs). La résistance de ces bactéries aux traitements thermiques de 80°C pendant 10 min utilisés pour la sélection montre que ce critère de sélection n'est pas discriminatif vis-à-vis de toutes les bactéries non sporulantes.

Les bactéries acidifiantes et sporulantes connues étaient réparties entre les genres *Bacillus* et *Sporolactobacillus*. Notre travail a montré que des représentants de ce groupe de bactéries peuvent aussi être retrouvés dans le genre *Paenibacillus* (CWBI-P1, CWBI-BC et CWBI-C15). D'ailleurs nous pouvons remarquer que toutes les bactéries acidifiantes isolées dans les environnements du Burkina Faso sont distinctes des bactéries acidifiantes et sporulantes connues (*B. coagulans*, *B. racemilacticus*, *B. laevolacticus*). La constitution de cette collection montre que d'autres bactéries

acidifiantes sont encore susceptibles d'être retrouvées dans les environnements du sahel.

Un signe de l'adaptation thermique de certaines nouvelles bactéries isolées dans le sahel Burkinabé peut être retrouvé dans la composition en acides gras de leurs lipides cellulaires. En effet, les rapports ($a\text{-C}_{2n+1}/i\text{-C}_{2n+1}$) et plus particulièrement le rapport anteiso- $\text{C}_{15:0}/\text{iso-}\text{C}_{15:0}$ des acides gras cellulaires donnent une importante indication de l'adaptation thermique des micro-organismes (Horani et Priest, 1994 ; Llarch *et al.*, 1997). Chez les espèces mésophiles du genre *Bacillus* ce rapport est supérieur à 1, car c'est l'acide anteiso- $\text{C}_{15:0}$ dont la température de fusion est de 25,8°C qui est majoritaire dans leur structure (Py *et al.*, 1970). Par contre chez les espèces thermophiles, c'est plutôt l'acide iso- $\text{C}_{15:0}$ dont la température de fusion est de 52,5°C qui est majoritaire (Py *et al.*, 1970). Le rapport anteiso- $\text{C}_{15:0}/\text{iso-}\text{C}_{15:0}$ de ces bactéries thermophiles est de ce fait inférieur à 1. Les souches CWBI-B2 et CWBI-B6 qui sont toutes deux des bactéries mésophiles selon nos analyses possèdent des rapports "anteiso- $\text{C}_{15:0}/\text{iso-}\text{C}_{15:0}$ " de 0,15 et 0,44 respectivement. Ce qui correspond à des valeurs très proches de celles retrouvées chez les bactéries thermophiles. Haque et Rusell (2004), ont montré (chez *Bacillus cereus*) que les microorganismes étaient capables de modifier le profil de leurs acides gras cellulaires, en réponse aux stress environnementaux (thermiques, hydriques etc.). Nous pensons de ce fait que les observations faites chez les souches CWBI-B2 et CWBI-B6 pourraient constituer une signature de leurs adaptations environnementales.

16.2. Concernant la caractérisation et l'identification des bactéries acidifiantes

Aucune technique de taxonomie ne peut parvenir à satisfaire toutes les classifications connues. La combinaison de plusieurs données, connue sous le nom de "taxonomie polyphasique" offre plus d'avantage, car les classifications réalisées présentent une plus grande objectivité. C'est pour atteindre un tel niveau d'objectivité dans les identifications que nous avons adopté pour une démarche similaire. Nous avons aussi fait appel à la collaboration du laboratoire de microbiologie de l'Université de Gent, disposant d'une importante banque de données pour ce type recherche.

Les identifications réalisées ont mis en évidence la diversité des bactéries productrices d'acide lactique dans la nature. Le tableau [16.1](#) donne une synthèse des taxons révélés et des degrés d'homologie estimés. Nous voyons dans ce tableau que dans la majorité des cas, l'utilisation d'une seule technique d'identification aurait sans aucun doute abouti à une classification erronée, surtout

pour ce qui concerne les caractères phénotypiques (API 50 CHB et EMAG). La souche CWBI-B6 est le seul isolat dont la classification peut être jugée entièrement satisfaisante. La classification de la souche CWBI-B2 dans le groupe de *B. cereus* complexe est probable. Elle confirmerait de ce fait la diversité écologique, biochimique et génétique observée chez les espèces appartenant à ce groupe (Claus et Berkeley, 1986).

Tableau 16.1: Bilan des différentes techniques d'identification

Souches	API 50 CHB	EMAG	RNAr 16S
CWBI-B2	<i>B. circulans</i> (69,1%)	<i>B. cereus</i> (SI :0,23)	<i>B. cereus</i> (99%)
CWBI-B6	<i>B. pumilus</i> (99,9%)	<i>B. pumilus</i> (SI :0,92)	<i>B. pumilus</i> (99,9%)
CWBI-BC	<i>B. coagulans</i> (92,1%)	<i>P. azotofixans</i> (SI :0,73)	<i>Paenibacillus</i> sp (99,1%)
CWBI-C15	<i>B. circulans</i> (87,9%)	<i>Bacillus</i> sp (SI :0,21)	<i>Paenibacillus</i> sp (98,2%)
CWBI-P1	<i>B. circulans</i> (1%)	<i>Paenibacillus</i> sp (SI :0,49)	<i>Paenibacillus</i> sp (98,7%)
CWBI-P2	Profil inconnu	Analyse non réalisée	<i>Lactobacillus casei</i> (99,9%)

Les analyses phylogénétiques sont énormément utilisées en taxonomie polyphasique pour leur stabilité aussi bien dans le temps qu'aux conditions de culture (Song *et al.*, 1999 ; Charteris *et al.*, 2001). Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S est recommandé par ICSP dans la description de toutes nouvelles bactéries mises en collection (Stackebrandt *et al.*, 2002). Toutes les bactéries appartenant à un même genre partagent une similarité de leurs séquences d'ADNr 16S supérieur à 90 %, et toutes les souches qui n'ont pas au moins 97% d'homologie de séquence de leur ADNr 16S ne possèdent aucune chance d'appartenir à une même espèce (Stackebrandt et Goebels, 1994). Si nous tenons compte de ces deux définitions, nous pouvons dire que l'appartenance des souches CWBI-C15, CWBI-BC, CWBI-P1 au genre *Paenibacillus* ne souffre d'aucune ambiguïté. Par contre leurs identifications auront besoin d'être complétées par des tests d'hybridation ADN-ADN avec les souches partageant plus de 97% d'homologie de séquence d'ADNr 16S avec elles. Le tableau [16.2](#) donne pour chacune de ces souches les espèces qui seront utilisées dans ces analyses.

Tableau 16.2 : Identification des souches CWBI-P1, CWBI-BC et CWBI-C15 dans le groupe des bactéries du genre *Paenibacillus*.

Isolats	Espèces proches	Degré de similarité (%)
CWBI-P1	<i>Paenibacillus azoreducens</i>	98,7
	<i>Paenibacillus cookii</i>	97,4
	<i>Paenibacillus cineris</i>	97,3
	<i>Paenibacillus chibensis</i>	97,0
	<i>Paenibacillus favisporus</i>	97,0
CWBI-BC	<i>Paenibacillus stellifer</i>	99,1
	<i>Paenibacillus durus</i>	97,1
	<i>Paenibacillus borealis</i>	97,1
	CWBI-C15	97,0
CWBI-C15	<i>Paenibacillus borealis</i>	98,2
	<i>Paenibacillus odorifer</i>	97,5
	<i>Paenibacillus durus</i>	97,3
	<i>Paenibacillus graminis</i>	97,1
	CWBI-BC	97,0

Le genre *Paenibacillus* est issu de la reclassification des *Bacillus* (Ash *et al.*, 1994). Il regroupait à sa création dix espèces du groupe 3 des ARNr 16 des *Bacillus* (*B. alvei*, *B. amylolyticus*, *B. azotofixans*, *B. gordonae*, *B. larvae*, *B. macerans*, *B. macquariensis*, *B. pabuli*, *B. polymyxa* et *B. pulvifaciens*). Le genre *Paenibacillus* rassemble des bacilles Gram positifs, mais pouvant apparaître Gram négatifs ou variables. Les cellules sont mobiles grâce à une ciliature péritriche, comme chez la plupart des *Bacillus* (Shida *et al.*, 1997). L'actuelle classification morphologique des bactéries appartenant à ce genre fait référence à une spore ellipsoïdale et déformante (Heyndrickx *et al.*, 1996). Si nous analysons les caractéristiques morphologiques des souches CWBI-P1, CWBI-BC et CWBI-C15, par rapport à ce critère, nous constatons que seule la souche CWBI-BC y répond positivement. La définition apportée par Ash *et al.* (1994), au genre *Paenibacillus* à sa création, a toutefois connu de nombreux remaniements avec l'introduction de plusieurs nouvelles espèces (Heyndrickx *et al.*, 1996 ; Shida *et al.*, 1997 ; Berge *et al.*, 2002 ; Velazquez *et al.*, 2004). Nous constatons que la plupart des espèces, desquelles se rapprochent les souches CWBI-BC, CWBI-P1 et CWBI-C15, dans le genre *Paenibacillus*, sont des espèces décrites assez récemment. C'est le cas de *P. stellifer* isolée par Suominen *et al.* (2003), de *P. azoreducens* isolée par Meehan *et al.* (2001), de *P. borealis* isolée par Elo *et al.* (2001) ; de *P. graminis* et *P. odorifer* isolées par Berge *et al.* (2002) ; de *P. favisporus* isolée par Velazquez *et al.* (2004) ; et de *P. cineris* et *P. cookii* isolées par Logan *et al.* (2004). Nous pensons de ce fait que les nouvelles bactéries isolées dans les environnements du Burkina Faso (CWBI-BC, CWBI-P1 et CWBI-C15) sont proches de ces bactéries, mais qu'elles seraient en réalité de nouvelles espèces dans le genre *Paenibacillus*. Cette

hypothèse pourra très rapidement être vérifiée avec la détermination des taux de réassociation des ADN complets. Les difficultés observées dans la sporulation des nouvelles bactéries les rapprochent d'avantage du genre *Paenibacillus*, car les espèces connues dans ce genre s'illustrent très souvent par ce comportement (Stahly et Klein, 1992).

Face à la diversité des bactéries acidifiantes isolées dans ce travail, nous proposons de discuter la réorganisation du genre *Bacillus* et de défendre l'idée de la création d'un groupe des bactéries lactiques sporulantes (BLS) dans ce genre. Il faut dire que la classification des *Bacillus* est un problème important pour la microbiologie moderne. Les *Bacillus* interviennent dans plusieurs activités de la vie des hommes et des plantes, aussi bien dans le développement des pathologies que dans les productions agricoles, pharmaceutiques et environnementales. Les *Bacillus* sont très variables tant du point de vue morphologique, biochimique, que génétique et de nombreux phénomènes de dissociation ont déjà été observés au sein de ce genre, certains comportements biochimiques pouvant varier en fonction des conditions environnementales. L'existence de "variant", de souche "aberrante" ou de souche "intermédiaire" chez certaines espèces a été rapportée dans des travaux portant sur l'identification des *Bacillus* (Lemille *et al.*, 1968 ; Drobniewski, 1993). La poursuite de la réorganisation du genre *Bacillus* est de ce fait justifiée. Seulement, nous pensons que cette réorganisation doit aussi contribuer à mettre en évidence les principaux groupes de *Bacillus* possédant des particularités d'intérêt industriel. Dans ce cadre, nous proposons la création d'un groupe des "bactéries lactiques sporulantes" (BLS) dans le genre *Bacillus*. Ce groupe rassemblerait l'ensemble des BLS appartenant aux trois genres connus actuellement (*Bacillus*, *Sporolactobacillus* et *Paenibacillus*). Cette nouvelle organisation est aussi justifiée par le fait que plusieurs auteurs dont Suzuki et Yamasato (1994), ont déjà montré que les espèces du genre *Sporolactobacillus* étaient génétiquement et biochimiquement plus proches des *Bacillus* que des *Lactobacillus*. Nous pensons qu'un tel regroupement contribuera à donner une plus grande valeur aux BLS vis-à-vis des scientifiques et des industriels. En effet, la bibliographie concernant le sujet des bactéries acidifiantes, capables de sporuler, est presque inexistante par rapport à d'autres sujets. La création d'un groupe des BLS rassurera les industriels et les utilisateurs sur le fait que certaines espèces appartenant au genre *Bacillus* peuvent être d'excellentes bactéries lactiques. En effet, *B. coagulans* qui est certainement la plus performante des BLS (production de bactériocine) est très peu citée dans les ouvrages consacrés aux bactéries lactiques. Cette bactérie est utilisée dans les formulations industrielles sous le nom *Lactobacillus sporogenes*. Pourquoi ? Parce que les *Bacillus* sont

généralement perçus dans les industries alimentaires comme des bactéries résistantes, responsables de putréfactions et de pathologies. Ce qui est souvent juste, mais pas pour tous les représentants de ce genre.

16.3. Concernant l'isolement du *Lactobacillus* sp. CWBI-P2

La souche CWBI-P2 est une bactérie acidifiante appartenant au genre *Lactobacillus*, isolée dans des conditions de sélection réservées aux bactéries sporulantes (choc thermique 80°C pendant 10 min). Nous pensons d'abord que la présence de cette bactérie dans le lot des isolats est révélatrice de la diversité des *Lactobacillus* dans la nature. Bien que ce travail soit consacré à l'étude des bactéries sporulantes, nous avons choisi d'y inclure cette souche, notamment pour ses particularités biochimiques et physiologiques. La première particularité observée chez cette souche réside dans la réaction qu'elle donne au test de la catalase. La catalase produite par la souche CWBI-P2 est différente de celle retrouvée chez les *Bacillus*, mais nous n'avons pas pu établir le lien qu'elle aurait avec la pseudocatalase des *Lactobacillus*. Le test de la benzidine qui est le principal test microbiologique utilisé pour mettre en évidence la présence des pseudocatalases a donné des résultats négatifs pour cette souche. Nous ne sommes pas allés plus loin dans l'étude de cette peroxydase, mais nous pensons que le comportement observé chez la CWBI-P2 pourrait être lié à la sensibilité du test utilisé. Il existe chez les *Lactobacillus*, au moins trois types de pseudocatalase. Ces peroxydases sont généralement différenciées par le nombre de sous-unités protéiques qui les composent et par l'état d'oxydation de leur noyau manganèse (Abriouel *et al.*, 2004). Sur le plan biochimique la souche CWBI-P2 est assez proche de *Lactobacillus kunkeei*. Cette bactérie produit une pseudocatalase, de l'acide L(+)-lactique et acidifie à partir d'un nombre important de substrats carbonés (Edwards *et al.*, 1998). L'alignement des séquences des gènes codant pour les ARNr 16S de ces deux bactéries a montré qu'elles étaient différentes (91% d'homologie de séquence). Si l'appartenance de la souche CWBI-P2 au genre *Lactobacillus* est complètement établie, son appartenance au groupe des *Lactobacillus casei* reste encore incertaine. L'identification de la souche CWBI-P2 devra de ce fait être complétée par la détermination des homologies ADN-ADN avec les souches reprises dans le tableau 16.3.

La seconde particularité qui a retenu notre attention chez la souche CWBI-P2 concerne ses propriétés physiologiques et biochimiques. Cette souche possède plusieurs des propriétés physiologiques et technologiques recherchées dans les formulations probiotiques. La résistance de souche la CWBI-P2 aux traitements

thermiques, ainsi que sa résistance aux pH acides et aux sels biliaires sont assez rares chez les espèces du genre *Lactobacillus*. Cette bactérie possède une importante production d'acide lactique et des besoins nutritionnels modestes du fait de sa bonne croissance dans le milieu GYP. La production de catalase par cette souche peut être exploitée industriellement, car en plus de l'élimination du peroxyde d'hydrogène, la catalase peut aussi catalyser les réactions de dégradation des composés phénoliques. Ces composés phénoliques sont considérés comme des facteurs anti-nutritionnels à cause de leur résistance aux enzymes digestives et de leur toxicité. Ainsi, la catalase peut jouer un rôle de détoxification en transformant ces composés phénoliques en dérivés non toxiques (Zamocky *et al.*, 2001).

Tableau 16.3 : Identification de la souche CWBI-P2 dans le groupe des *Lactobacillus*

Espèces proches	Degrés de similarités (%)
<i>Lactobacillus zeae</i>	99.8
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	99.1
<i>Lactobacillus casei</i>	99.1
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>	98.8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	98.8

Les alignements ont été réalisés avec les souches types des différentes espèces

16.4. Concernant les propriétés technologiques des bactéries isolées

La recherche de nouvelles bactéries pour des applications industrielles doit avant tout tenir compte des qualités fonctionnelles et des propriétés technologiques des micro-organismes. C'est pour cette raison que les bactéries acidifiantes du genre *Bacillus* constituent d'excellents candidats pour les formulations probiotiques. La formation de spores permet à ces bactéries d'acquérir plus de résistance vis-à-vis des stress en relation avec la formulation et la conservation des produits. On pourrait penser que ces bactéries produisent moins d'acide lactique que les bactéries lactiques (*Lactobacillus...*), mais cela ne peut pas constituer un frein à leur utilisation, car les bactéries acidifiantes et sporulantes possèdent plusieurs propriétés technologiques intéressantes qui ne sont pas retrouvées chez les bactéries lactiques. Ces bactéries possèdent une meilleure résistance aux propriétés physicochimiques du tractus digestif, notamment aux pH acides et aux sels biliaires. L'importante activité enzymatique observée chez ces bactéries ne peut pas non plus être retrouvée chez les *Lactobacillus* utilisés comme probiotiques. Une forte activité protéolytique peut toutefois constituer un obstacle dans certaines préparations alimentaires

(produits laitiers). En effet, la dégradation microbienne des protéines alimentaires est souvent accompagnée de développement de caractéristiques organoleptiques indésirables et finit par avoir un impact sur la stabilité des produits. Pour d'autres types de fermentation, l'activité protéolytique est plutôt recherchée. Nous pensons particulièrement à la fermentation des graines du caroubier africain ou néré (*Parkia biglobosa*) très riche en protéines. La souche CWBI-B6, pourrait apporter une amélioration dans ce type de fermentation, car plusieurs souches de *Bacillus pumilus* participent à cette fermentation (Sarkar *et al.*, 2002 ; Ouaba *et al.*, 2003). La production d'une bactériocine appelée coaguline a été mise en évidence chez *B. coagulans*, par Hyronimus *et al.* (1998). La structure de cette bactériocine a été déterminée par Le Marrec *et al.* (2000), elle serait identique à celle de la pediocine produite par *Pediococcus acidilactici*. Des observations similaires pourraient être faites pour d'autres bactéries acidifiantes du genre *Bacillus*, même si ce n'est pas le cas pour le moment. La souche CWBI-B2 apparentée au groupe de *Bacillus cereus* complexe est le seul isolat pour lequel nous pensons qu'il serait difficile de développer une utilisation dans le domaine alimentaire. Certains membres de ce groupe sont impliqués dans des toxi-infections alimentaires (toxine de *B. anthracis*, toxine de *B. thuringiensis*, entérotoxine de *B. cereus*). La production d'acide lactique ayant déjà été observée dans ce groupe, notamment chez *B. thuringiensis* et *B. cereus sensu stricto* (Ohara et Yahata, 1996), nous imaginons qu'une telle activité puisse être amplifiée chez la souche CWBI-B2 pour l'industrie chimique.

16.5. Concernant la sporulation des bactéries acidifiantes

Des difficultés à sporuler ont été observées chez plusieurs bactéries acidifiantes appartenant aux genres *Bacillus* et *Sporolactobacillus* (Kitahara et Lai, 1967; Nakayama et Yanoshi, 1967a ; Cavazzoni et Adami, 1993). Les investigations menées dans ce travail ont apporté des informations intéressantes dans la compréhension et l'amélioration de la sporulation des bactéries acidifiantes. Nous savons que la composition chimique des milieux de culture a peu d'influence sur leur sporulation. Nous savons aussi que ces bactéries sont adaptées à la présence de l'acide lactique dans leur environnement et que ce composé n'est pas responsable des problèmes de sporulation observés. Enfin nous savons que les cultures non submergées sont efficaces dans la sporulation de ces bactéries acidifiantes. Dans plusieurs travaux de laboratoire consacrés à *B. coagulans*, des milieux gélosés ont été utilisés pour la production de spores (Amaha *et al.*, 1956 ; Marshall et Beers 1976 ; Adami *et al.*, 1999 ; Palop *et al.*, 1999). L'efficacité de ce type de

culture pour la sporulation est donc connue depuis plusieurs années. Mais aucune étude ne met clairement en évidence les mécanismes physiologiques et biochimiques qui l'expliquerait. Il est connu que le confinement des micro-organismes engendre d'importants changements dans les cultures (Karel *et al.*, 1985 ; Barbotin *et al.*, 1989). Plusieurs mécanismes peuvent être associés à ces changements dans les cultures immobilisées. Il s'agit notamment d'une limitation des transferts de masse, de la création d'un microenvironnement autour des cellules et dans le cas des cultures non submergées d'une augmentation des transferts d'oxygène. Certains changements peuvent aussi être dus à des mécanismes de reconnaissance spécifiques développés par les micro-organismes, comme c'est le cas dans la formation de biofilm chez *E. coli* (Prigent *et al.*, 1999).

A travers des études consacrées à la souche *B. coagulans* LMG 6326, le rôle joué par un certain nombre de mécanismes en relation avec l'immobilisation a été vérifié. Les investigations entreprises ont montré que l'aération dont bénéficient les cellules immobilisées n'avait pas d'influence directe sur la sporulation. D'ailleurs, toutes les bactéries acidifiantes étudiées sont aérobies facultatives. Nous avons montré que la création d'un gradient dans l'environnement extracellulaire participait à la stimulation de la sporulation de *B. coagulans* dans les cultures immobilisées. Ce type de régulation de la sporulation fait appel à la notion du *quorum sensing*. L'immobilisation agirait ainsi sur la sporulation en favorisant la création de gradient de concentration pour le *quorum sensing*. Cette concentration serait nettement plus importante dans les cultures en milieu infiniment mélangé. Ce phénomène a été étudié chez *B. coagulans* en comparaison à l'action des facteurs de sporulation de *Bacillus subtilis* (Walburger *et al.*, 1993) et de *Clostridium perfringens* (Tseng et Labbe, 2000). Nous pensons que le mécanisme de régulation de la sporulation observé chez *B. coagulans* peut être assimilé à celui des facteurs de sporulation de ces bactéries. Les essais de séparation réalisés dans les solutions concentrées dans le milieu extracellulaire de culture n'ont pas apporté d'informations significatives sur la nature des composés chimiques responsables de la sporulation. Selon les résultats obtenus, il s'agirait de composés polaires. Les facteurs de *quorum sensing* participant à la sporulation de *B. subtilis* sont hydrophobes (Waldburger *et al.*, 1993). Selon Lazazzera et Grossman (1998), il en est de même pour la plupart des peptides excrétés par les micro-organismes, certainement à cause des propriétés de la bicouche lipidique dans les membranes cellulaires. Si la nature des peptides intervenant dans la sporulation de *Bacillus subtilis* est connue, il n'en est pas de même pour ceux de *Clostridium perfringens*. Selon Shih et Labbe (1996), il s'agirait chez cette espèce de peptide de taille

compris entre 500 à 1500 Da. Le caractère hydrophile des composés intervenant dans la sporulation de *B. coagulans* nous permet de dire qu'il s'agirait de molécules de nature différente des oligopeptides de *B. subtilis* et *C. perfringens*. Nous imaginons qu'il puisse s'agir dans ce cas de molécules hydrophiles, de petites tailles, telles que des acides aminés, des glucosamines, des glucopeptides, d'oligopeptides hydrophiles, etc. La détermination de la structure de ces composés est importante, car elle pourrait contribuer à la production de spores de manière optimale en milieu liquide. Il suffirait dans ce cas d'ajouter aux cultures liquides les quantités nécessaires de facteurs de sporulation préalablement synthétisés.

Des systèmes similaires de régulation de la sporulation peuvent être retrouvés chez d'autres bactéries acidifiantes, même si nous n'avons pas pu le mettre en évidence chez *B. racemilacticus* et *B. laevolacticus*. La méthode d'investigation utilisée pour *B. coagulans* a la particularité d'utiliser une même souche, à la fois pour produire les facteurs de sporulation et pour mettre en évidence leurs activités dans la sporulation. Dans les travaux antérieurs, les facteurs de sporulation sont testés sur des souches témoins de la même espèce rendues sensible à leurs actions (Lazazzera et Solomon, 1997 ; Tseng et Labbe, 2000 ; Leighton *et al.*, 2001). L'utilisation d'une approche similaire aurait permis de mieux faire apparaître le rôle joué par les facteurs extracellulaires dans la sporulation de *B. coagulans*. Pour *Bacillus subtilis* et *Clostridium perfringens*, il existe des souches sensibles à l'action des facteurs de sporulation (Shih et Labbe, 1996 ; Waldburger *et al.*, 1993 ; Tseng et Labbe, 2000).

Le *quorum sensing* est sans aucun doute le plus important système de contrôle de la croissance des micro-organismes découvert ces dernières années. Selon Kleerebezem et Quadri (2001), la maîtrise de ce phénomène pourrait apporter des avantages aux biotechnologies. Selon Claverys *et al.* (2000), les phéromones utilisées par les micro-organismes pour contrôler leur densité de population offrent des opportunités pour le développement de nouveaux produits pharmaceutiques. Ces auteurs pensent notamment au contrôle de la prolifération des bactéries pathogènes possédant ces systèmes. Selon Otto *et al.* (1998) ces nouveaux produits pourraient contribuer à empêcher les germes pathogènes de nuire en les désorganisant et en limitant leur prolifération. Selon Ahmer *et al.* (1988), ce type de molécule pourrait aussi avoir un avantage sur les antibiotiques classiques car il ne poserait pas de problème de résistance, vu que la sélection naturelle serait extrêmement lente, sinon inexistante.

Nous avons montré dans ce travail que les cultures immobilisées notamment les billes d'alginate offraient une alternative

pour la production de spores chez *Bacillus coagulans*. La création d'un microenvironnement dans le voisinage des cellules contribue malheureusement à limiter la croissance cellulaire sur ce support. Les analyses réalisées dans le but de réduire cette limitation de croissance n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Il apparaît que ce sont les mêmes phénomènes qui stimulent la sporulation et limitent la croissance cellulaire. Les billes d'alginate peuvent tout de même être utilisées pour la production de spores à l'échelle pilote. Dans ce cas, des travaux complémentaires seront nécessaires pour adapter le système de production décrit à cette échelle. Il s'agira de :

- trouver le moyen de produire d'importantes quantités de billes d'alginate ;
- et de mettre au point un réacteur pour substrats solides favorable à cette production.

Pour ce qui concerne le réacteur pour substrats solides, nous pensons que les réacteurs stationnaires sur plateaux (figure 16.1) pourront être adaptés à ce type de culture. Ce type de fermenteur a l'avantage de contenir plusieurs plateaux perforés sur lesquels peuvent être étalées des couches de billes de 5 à 10 centimètres. Les perforations réalisées dans les plateaux permettent de réguler la température, l'humidité et l'aération dans le réacteur. Ce type de réacteur pourrait aussi avoir l'avantage d'améliorer la production de biomasse en favorisant la réalisation de plusieurs fermentations sur un même support. Seulement, dans ce cas les spores ne pourront être récoltées que par le rinçage des billes avec les inconvénients que cela possède.

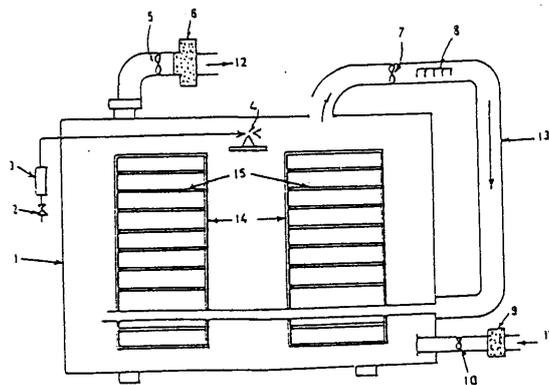


Figure 16.1 : Fermenteur pour substrat solide sur plateaux (selon Mitchell *et al.*, 1992). 1.Chambre de fermentation; 2.Valve; 3.Tube UV germicide; 4.Humidificateur; 5.Ventilateur; 6.Filtre; 7.Ventilateur; 8.Chauffage; 9.Filtre à air; 10.Ventilateur; 11.Entrée d'air; 12.Sortie d'air; 13.Tuyau de circulation d'air; 14.Armature; 15. Plateaux perforés.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

1. CONCLUSION GENERALE

Ce travail est une contribution à l'étude de la diversité et de la sporulation des bactéries acidifiantes apparentées au genre *Bacillus*. Les activités entreprises ont abouti à :

- la création d'une collection de bactéries acidifiantes et sporulantes au Centre wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Dix-sept nouvelles bactéries sont placées dans cette collection, dont six ont été caractérisées et identifiées,
 - une description partielle de la diversité des communautés microbiennes retrouvées dans les environnements extrêmes au Burkina Faso. Notons que c'est la première fois que ce type de bactérie est recherché dans ces environnements. Nous pensons de ce fait que d'autres bactéries acidifiantes et sporulantes pourraient encore être isolées dans ces milieux. Les bactéries isolées sont toutes différentes des bactéries acidifiantes connues. L'identification des souches CWBI-BC, CWBI-C15 et CWBI-P1 dans le genre *Paenibacillus* ajoute ce genre à la liste des bactéries acidifiantes et sporulantes,
 - la confirmation des difficultés observées chez les bactéries acidifiantes à sporuler de manière optimale dans les milieux artificiels et cela en cultures liquides. Les travaux effectués sur *B. coagulans* LMG 6326 montrent que ces bactéries sont bien adaptées à la présence de l'acide lactique dans leur environnement et que la présence de ce composé dans le milieu n'a pas d'impact significatif sur la sporulation. La composition des milieux de cultures (en nutriment notamment), possède elle aussi peu d'influence sur la sporulation,
 - la mise en évidence du rôle joué par les milieux solides et les milieux infiniment mélangés dans la sporulation des bactéries acidifiantes. Les cultures immobilisées (gélose, gel de *k*-carraghénane, billes d'alginate) constituent d'excellents supports pour la sporulation de ces bactéries. Dans ce cadre, les billes d'alginate peuvent servir de support pour la production de spore en masse. Toutes les étapes classiques de production de biomasse (culture, récolte, séchage et stockage) peuvent être réalisées avec ce support d'immobilisation. Le principal facteur limitant dans l'utilisation des billes d'alginate pour les productions de biomasse à l'échelle pilote réside dans la limitation de
-

croissance. En effet, la phase stationnaire de croissance des bactéries est plus rapidement atteinte avec l'immobilisation et le nombre de division cellulaire est moins important que dans les cultures libres (bouillon). La production de biomasse peut toutefois être réalisée de manière rentable avec les billes d'alginate si des systèmes tels que les fermenteurs à l'état solide avec plateaux perforés sont adaptés à ce type de production,

- la mise en évidence du rôle joué par la concentration de métabolites dans l'environnement des cellules immobilisées pour la sporulation de *B. coagulans* LMG 6326. Cette régulation de la sporulation peut être comparée au phénomène de *quorum sensing* déjà observé dans la sporulation de certains *Bacillus* dont *B. subtilis* et *B. cereus*, ainsi que chez *Clostridium perfringens*. La structure des métabolites intervenant dans la sporulation de *B. coagulans* n'est pas précisée dans ce travail, mais certaines de leurs caractéristiques dont la polarité nous permettent d'imaginer qu'il s'agisse de substances de nature différente de celles des phéromones de *quorum sensing* de *B. subtilis*.

2. PERSPECTIVES

Au terme de cette recherche, nous disposons d'un ensemble de connaissance sur la diversité et les propriétés des bactéries acidifiantes apparentées au genre *Bacillus*. Nous disposons également d'un moyen de production de spores chez ces bactéries. Les différents résultats et les conclusions qui ont été dégagés tout au long de cette étude ouvrent la voie à une série de recommandations et de recherches additionnelles.

- i. La recherche de nouvelles bactéries acidifiantes capables de résister aux conditions extrêmes devrait être poursuivie dans les environnements du Burkina Faso. Nous recommandons que ces futures recherches soient réalisées sur un nombre plus important d'échantillon, provenant de plusieurs régions du pays. Cette disposition permettrait d'une part de confirmer les observations effectuées ici sur la diversité des bactéries isolées, et d'autre part, elle permettrait d'établir un profil plus large des propriétés technologiques susceptibles d'être retrouvées chez ce type de bactérie. Les scientifiques et les bio-industries pourront ainsi avoir d'avantage de raisons de
-

s'intéresser à la problématique de ces bactéries « lactiques » sporulantes.

- ii. Les identifications des souches CWBI-BC, CWBI-C15, CWBI-P1, CWBI-P2 et CWBI-B2 devraient être complétées par des tests d'hybridation ADN-ADN et la détermination des G+C% de leurs ADN génomiques. Nous pensons que ces souches possèdent d'importantes chances de constituer de nouvelles espèces et que les bio-industries tireraient des avantages dans leurs identifications complètes.
 - iii. Nous recommandons pour la réorganisation du genre *Bacillus* que toutes les bactéries sporulantes productrices d'acide lactique soient réunies dans un seul groupe apparenté à ce genre. Cette disposition apporterait sans aucun doute plus de clarté sur la problématique des "bactéries lactiques sporulantes" et encouragerait leur valorisation. En effet, depuis les travaux de Nakayama et Yanoshi (1967a), nous n'avons rencontré aucun travail sur l'isolement de nouvelles bactéries acidifiantes dans le genre *Bacillus*. On pourrait expliquer cet état par la rareté de ces bactéries dans la nature. Mais au vu de nos résultats nous pensons que c'est aussi parce que très peu de travaux leur sont consacrés.
 - iv. L'utilisation des billes d'alginate pour la production industrielle de spores est envisageable. Dans ce cadre, d'autres travaux devraient être réalisés pour déterminer les conditions optimales dans lesquelles un fermenteur à l'état solide pourrait être adapté à ce type de production.
 - v. La confirmation du *quorum sensing* et la détermination de la structure moléculaire des facteurs de sporulation seront d'une contribution considérable pour l'amélioration de la production de spores. Il serait possible dans ce cas de synthétiser ces médiateurs et de les ajouter aux cultures liquides de sorte que la concentration optimale nécessaire au déclenchement des réactions de la sporulation soit atteinte. La compréhension du mécanisme d'action des médiateurs de *quorum sensing* pourrait aussi contribuer au développement d'une nouvelle classe de substances pouvant contrôler la croissance et la prolifération des micro-organismes.
-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abriouel H., Herrmann A., Stärke J., Yousif N.M.K, Wijaya A., Tauscher B., Holzapfel W. et Franz C.M.A.P. (2004). Cloning and heterologous expression of hematin-dependent catalase produced by *Lactobacillus plantarum* CNRZ 1228. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 603-606.
- Adami A. et Cavazzoni V. (1999). Occurrence of selected bacteria group in the faeces of piglet fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *J. Basic Microbiol.* 39, 3-9.
- Adami A., Sandrucci A. et Cavazzoni V. (1997). Piglets fed from birth with the probiotic *Bacillus coagulans* as additive: zootechnical and microbiological aspects. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 47, 139-149.
- Aguilera J.V.I. et Karel M. (1997). Preservation of biological materials under dessication. *Crit.Rev. Food. Sci. Nut.* 37, 287-309.
- Ahimou F. (2000). Etude des propriétés de surface et d'adhésion de *Bacillus subtilis*. (Thèse de doctorat). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, p 200.
- Ahmer B., van Reewijk J., Timmers C., Valentine P. et Heffron F. (1998). *Salmonella typhimurium* encodes an *SdiA* homolog, a putative quorum sensor of the *LuxR* family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J. Bacteriol.* 180, 1185-1193.
- Akpa E.E. (2002). Etude de l'influence des conditions physiologiques sur la biosynthèse des lipopeptides chez *Bacillus subtilis*. (Thèse de doctorat). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, p 210.
- Alper S., Duncan L. et Losick R. (1994). An adenosine nucleotide switch controlling the activity of a cell type-specific transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 77, 195-205.
- Amaha M., Ordal J. et Touba A. (1956). Sporulation requirements of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans* in complex media. *J. Bacteriol.* 72, 34-41.
- Amann R. I., Ludwig W. et Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
- Andersch I., Planka S., Fritz D. et Claus D. (1994). Description of *Bacillus laevolacticus* (ex Nakayama and Yanoshi 1967) Sp.nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 659-664.
-

- Andersen A.A. et Werkman C.H. (1939). Description of dextro-lactic acid forming organism of the genus *Bacillus*. *Iowa State Col .J.Sci.* 14, 187-194.
- Arellano M., Jomard P., El Kaddouri S., Roques C., Nepveu F. et Couderc F. (2000). Routine analysis of short-chain fatty acids for anaerobic bacteria identification using capillary electrophoresis and indirect ultraviolet detection. *J. Chromatogr B: Biomedical Sciences and Applications.* 741, 89-100.
- Ash C., Farrow J.A.E., Wallbanks S. et Collins M.D. (1991). Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 202-206.
- Ash C., Priest F.G. et Collins M. D. (1994). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 64, 253-260.
- Babu K.R. et Satyanarayana T. (1995). α -amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. *Process. Biochem.* 30, 305-309.
- Barbotin J.N., Nava Saucedo J.E. et Thomasset B. (1989). Morphological observations on immobilized cells. *In* J.A.M. De Bont , J. Visser, B. Mattiasson, et J. Tramper, eds. *Physiology of immobilized cells.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp 110-152.
- Bashan Y. (1986). Alginate beads as synthetic carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Env. Microbiol.* 51, 1089-1098.
- Batra N., Singh J., Banerjee U.C., Patnaik P.R. et Sobti R.C. (2002). Production and characterization of a thermostable betagalactosidase from *Bacillus coagulans* Rcs3. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, 1-6.
- Bayane A. (2001). Isolement et caractérisation de bactéries du genre *Bacillus* aux propriétés acidifiantes (Mémoire de DEA). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Gembloux, Belgique, p 70.
- Bayraktar E. et Mehemetoglu U. (2000). Production of citric acid using immobilized conidia of *Aspergillus niger*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 87, 117-125.
- Bel Industrie. (1992). *Sporolactobacillus* N° I-1089: un bioreacteur. Brevet FR 2677038 (FROMAGERIES BEL) publié le 4 décembre 1992. Additif alimentaire pour l'alimentation humaine et animale et aliments contenant, p 2.
- Bell J.A. et Friedman S.B. (1994). Genetic structure and diversity within local populations of *Bacillus myciodes*. *Evol.* 48, 1698-1714.
-

- Berge O., Guinebretiere M.H., Achouak W., Normand P. et Heulin T. (2002). *Paenibacillus graminis* sp. Nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. Nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 607-616.
- Bergmaier D. (2002). Production d'exopolysaccharides par fermentation avec des cellules immobilisées de *Lb. rhamnosus* RW-9595M d'un milieu à base de perméat de lactosérum. Thèse de doctorat, Université Laval, Québec, Canada, p 149.
- Berner, A.L. et O'Donnell, A.J. (1998). Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. *Int. Dairy J.* 8, 355-362.
- Berry R.N. (1933). Some new heat resistant acid tolerant organisms causing spoilage in tomato juice. *J. Bacteriol.* 25, 72-73.
- Blom H. et Mortvedt C. (1991). Antimicrobial substances produced by food-associated micro-organisms. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 694-698.
- Bogdanova T.I., Mulyukin A.L., Tsaplina I.A., El-Registan G.I. et Karavaiko G.I. (2002). Effect of the Medium Composition and Cultivation Conditions on Sporulation in Chemolithotrophic Bacteria. *Microbiol.* 71, 158 - 163
- Bonnie L.B. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 582-587.
- Bontinck G. (1987). Taxonomie bactérienne appliquée à l'étude de la microbiologie des aliments. Faculté de Medecine Veterinaire, Université de Liège, Belgique, pp 265-308.
- Borch E., Kant-Muermans M.L. et Blixt Y. (1996). Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food. Microbiol.* 33, 103-120.
- Bottazzi V. et Mercier A. (1994). Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des bactéries lactiques. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume II, Chap VI-5, pp 409-418.
- Bourlioux P. (1994). Ecologie microbienne du tractus digestif humain. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume II, Chap VI-2, pp 369-381.
- Brashears M.M., Gilliland S.E. et Buck L.M. (1998). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.* 81, 2103-2110.
- Brenner D.J., Fanning G.R., Rake A.V. et Johnson K.E. (1969). A batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Anal. Biochem.* 28, 447-459.
-

- Brenner D.J., Staley J.T. et Krieg N.R. (2001). Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Specification. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, Springer-Verlag, New-York, pp 119-166.
- Brosius J., Palmer L.M., Kennedy P.J. et Noller H.F. (1978). Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75, 4801-4805.
- Brotz H., Josten M., Weidemann I., Schneider U., Gotz F., Bierbaum G. et Sahl H.G. (1998). Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Mol. Microbiol.* 30, 317-327.
- Brul S. et Coote P. (1999). Review, Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 1-17.
- Bruno M. et Montville T.J. (1993). Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3003-3010.
- Buckenhüskes, H.J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 253-272.
- Burke W.F. et Spizizen J. (1977). Selective inhibition of *Bacillus Subtilis* sporulation by acridine orange and promethazine. *J. Bacteriol.* 129, 1215-1221.
- Cachon R., Antérieux P. et Diviès C. (1998). The comparative behaviour of *Lactococcus lactis* in free and immobilized culture processes. *J. Biotechnol.* 63, 211-218.
- Caplice E. et Fitzgerald G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food. Microbiol.* 50, 131-149.
- Casula G. et Cutting S.M. (2002). *Bacillus* Probiotics: Spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl. Env. Microbiol.* 68, 2344-2352.
- Cavazzoni V. et Adami A. (1993). Biomasse production, preservation and characteristic of a strain of *Bacillus coagulans* usable as probiotic. *Microbiol. Alim. Nutr.* 11, 93-100.
- Cavazzoni V., Adami A. et Castrovilli G. (1998). Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. *Br. Poult. Sci.* 39, 526-529.
-

- Cavazzoni V., Adami A. et Castrovilli G., Succi G. (1993). A preliminary experimentation on broilers with a strain of *Bacillus coagulans* as probiotic. *Microbiol. Alim. Nutr.* 11, 457-462.
- Cazemier A.E., Wagenaars S.F.M. et ter Steeg P.F. (2001). Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *J. Appl. Microbiol.* 90, 761-770.
- Chamba J.F., Duong C., Fazel A. et Prost F. (1994). Sélection des souches de bactéries lactiques. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume I, Chap III-2, pp 499-521.
- Champagne C.P., Lacroix C. et Sodini-Gallot I. (1994). Immobilized cell technology for the dairy industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 109-134.
- Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L. et Collins JK. (2001). Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37 degrees C. *J. Basic Microbiol.* 41, 241-251.
- Chung H.S., Kim Y.B., Chun S.L. et Ji G.E. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant *Bifidobacteria*. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 25-32.
- Clark D.S. (1989). Noninvasive techniques in studies of immobilized cells. In J.A.M. De Bont, J. Visser, B. Mattiasson, et J. Tramper, eds. *Physiology of immobilized cells*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp 115-149.
- Claus D. et Berkeley R.C.W. (1986). Genus *Bacillus* Cohn 1972, 174AL. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.A., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. Vol. 2, pp 1105-1139.
- Claverys J.P., Grossiord B. et Alloing G. (2000). Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions. *Res. Microbiol.* 151, 457-463.
- Cleveland J., Montville T., Nes F. et Chikindas L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobial of food preservation. *Inter. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.
- Collins M.D. et Jones D. (1979). Isoprenoid quinone composition as a guide to the classification of *Sporolactobacillus* and possibly related bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 47, 356-360.
- Collins M.D., Phillips B.A. et Zanoni P. (1989). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 105-108.
-

- Collins J.K., Thornton G. et Sullivan G.O. (1998) Selection of Probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* 8, 487-490.
- Condon S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS. Microbiol. Rev.* 46, 269-280.
- Condon S. et Sala F.J. (1992). Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and food of different pH. *J. Food Prot.* 55, 605-608.
- Connick W.J. (1982). Controlled release of the herbicides 2,4-D and dichlobenil from alginate gels. *J. Appl. Polymer Sci.* 27, 3341-3348.
- Cosby M., Vollenbroich W.D., Lee O.H. et Zuber P. (1998). Altered srf expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the spo0K oligopeptide permease and the comQX system of extracellular control. *J. Bacteriol.* 180, 1438-1445.
- Cosentino S., Mulargia A.F., Pisano B., Tuveri P. et Palmas F. (1997). Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 235-238.
- Cosson C. et Deschamps A. M. (1994). Comportement de souches bactériennes probiotiques en présence de bile et de sels biliaries. *Microbiol. Alim. Nutr.* 12, 93-98.
- Curk. M.C., Boeufgras. J.M., Decaris. B. et Cavini. F. (1994). Méthodes d'indentification des bactéries lactiques. Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume I, Chap I-3, pp 141-168.
- Daffonchio D., Brin S., Consolandi A. et Mora D. (1988). 16S rRNA internal transcribed spacers as molecular markers for the 16S rRNA group I of the genus *Bacillus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 163, 229-236.
- Davies D., Parsek M., Pearson J., Iglewski B., Costerton J. et Greenbreg E. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280, 295-298.
- de Alteriis E., Giovanni S., Massimo P., Vittorio R., Daniele C., Concetta C. et Palma P. (2004). *Kluyveromyces lactis* cells entrapped in Ca-alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase. *J. Biotechnol.* 109, 83-92.
- De Backer L. (1996). Immobilisation of cells in porous carriers. In Willaert G., G.V. Baron, et L. De Backer, eds. *Immobilised living cell systems: Modelling and experimental methods.* John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, p 373.
- De Clerck E., Rodriguez-Diaz M., Forsyth G., Lebbe L., Logan N.A. et DeVos P. (2004). Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 50-60.
-

- De Ley J. (1970). Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 101, 737-754.
- De Vuyst L., et Vandamme E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, Genetics, and Applications. *Blackie Academic and professional, London, united Kingdom*, pp 91-142.
- Dellaglio F., De Roissart H., Torriani S., Curk M. C. et Janssens D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. *In Bactéries lactiques. Tome 1 : Aspects fondamentaux et technologiques. Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume I, Chap I-1, pp 25-116.
- Dellaglio F., Dicks L.M.T., du Toit M. et Torriani S. (1991) Designation of ATCC 334 in place of 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei subsp. casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 340-342.
- Dellaglio F., Felis G., Giovanna E. et Torriani S. (2002). The status of *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 285-287.
- Desmazeaud M.J. et de Roissart H. (1994). Métabolisme général des bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume I, Chap I-4, pp 169-207.
- Desmazeaud M.J. (1994). Le lait milieu de culture. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume II, Chap IV-1, pp 25-54.
- Diep D.B. et Nes F.I. (2002). Ribosomal synthesized antibacterial peptides in gram positive bacteria. *Curr. Drug Targets.* 3, 107-122.
- Dingman D.W. et Stahly D.P. (1983). Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Env. Microbiol.* 46, 860-869.
- Dicks L.M.T., Du Plessis E.M., Dellaglio F. et Lauer E. (1996) Reclassification of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as neotype of *Lactobacillus casei subsp. casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 337-340.
- Divies C., Cavin J.F. et Prevost H. (1994). Bactéries lactiques immobilisées. Bactéries Lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume II, Chap VII-4, pp 527-536.
-

- Dodwell J. et Losick R. (1998). Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180, 1334-1337.
- Doores S. et Westhoff D.C (1983). Selective method for the isolation of *Sporolactobacillus* from food and environmental sources. *J. Appl. Bacteriol.* 54, 273-280.
- Doores S. et Westhoff. D.C. (1981). Heat resistance of *Sporolactobacillus inulinus*. *J. Food Sci.* 46, 810-812.
- Dorta B., Ertola R.J. et Arcas J.A. (1996). Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid substrate fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 434-439.
- Drobniewski F.A (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6. 324-338.
- Ducan L., Alper S., Arigoni F., Losick R. et Stragier P. (1995). Activation of cell-specific transcription by a serine phosphatase at the site of asymmetric division. *Science.* 270, 641-44.
- Dufour P., Jarraud S., Vandenesch F., Etienne J. et Lina G. (2000). Polymorphisme du système de régulation des exoprotéines chez *Staphylococcus aureus*. *Méd. Mad. Infec.* 30, 739-744.
- Dunne W.M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately ? *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 155-66.
- Eberhard A., Burlingame A.L., Eberhard C., Kenyon G.L., Nealson K.H. et Oppenheimer N.J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry-US.* 20, 2444-2449.
- Edwards C.G., Haag K.M., Huston R.A. et Huang Y.C. (1998). *Lactobacillus kunkeei* sp. nov.: a spoilage organism associate with grape juice fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 84, 698-702.
- Elo S., Saxelin M. et Salminen S. (1991). Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: Comparison with other dairy strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 154-156.
- Elo S., Suominen I., Kampfer P., Juhanoja J., Salkinoja-Salonen M. et Haahtela K. (2001). *Paenibacillus borealis* sp. Nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 535-545.
- el-Shafei H.A. et Rezkallah L.A. (1997). Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase. *Microbiol. Res.* 152, 199-208.
- Engbrecht J., Nealson K. et Silverman M. (1983). Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell.* 32, 773-781.
-

- Euzéby J. P. (2003). Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/bb/bacillus.html>
- FAO/WHO: Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation. (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, october 2001. http://www.mesanders.com/probio_report.pdf
- Fortina M.G., Pukall R.P., Schumann D., Mora C.P., Manachini L. et Stackebrandt E. (2001). *Ureibacillus* gen. nov., a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson *et al.* 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus* sp. nov. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51, 447-455.
- Fox G. E., Pechman K. R. et Woese C. R. (1997). Comparative cataloging of 16S Ribosomal Ribonucleic Acid : Molecular approach to procaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27, 44-57.
- Fulele E.Y.W. (1999). Caractérisation de rhizobia tropicaux isolés de diverses légumineuses herbacées au Sénégal. (Thèse de doctorat). Université de Liège, Belgique, p 175.
- Fuqua W.C., Winans S.C. et Greenberg E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176, 269-275.
- Garcia-Lara J., Shang L. et Rothfield L. (1996). An extracellular factor regulates expression of *sdjA*, a transcriptional activator of cell division gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 6618-6622.
- Gasser F., Montel M-C., Talon R. et Champonier M. (1994). Application de la taxonomie moléculaire à la classification des bactéries lactiques. Bactéries Lactiques. : Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume I, Chap I-2, pp 117-140.
- Gauthier R. (2002). Le mode d'action des acidulants et leur intérêt en engraissement. Actualités en production porcine. Maisons-Alfort, 5-6 décembre, pp 2-7.
- Gikas P. et Livingston A.G. (1998). Use of specific ATP concentration and specific oxygen uptake rate to determine parameters of a structured model of biomass growth. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 500-510.
- Gillis M., Vandamme P., De Vos P., Swings J. et Kersters K. (2001). Polyphasic Taxonomy. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, Springer- Verlag, New-York, pp 43-48.
-

- Givskov M., Eberl L. et Molin S. (1997). Control of exoenzyme production, motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 115-122.
- Gomez M.P et Malcata F.X. (1999). *Bifidobacterium spp.* And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Sci. Techn.* 10, 139-157.
- Gonçalves L.M.D., Barreto M.T.O., Xavier A.M.B.R., Carrondo M.J.T. et Klein J. (1992). Inert supports for lactic acid fermentation - a technological assessment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 305-311.
- Gournier-Chateau N., Larpent J.P., Castellanos M.I. et Larpent J.L. (1994). Les probiotiques en alimentation animale et humaine. Lavoisier, Technique et Documentation (ed), Paris, France, p 192.
- Grandfils C. (2002). Communication personnelle : Microencapsulation, principes et application. Centre Interfacultaire des Biomatériaux, Université de liège.
- Green D.H, Wakeley P.R., Page A., Barnes A., Baccigalupi L., Ricca E. et Cutting S.M. (1999). Characterization of two *Bacillus probiotics*. *Appl. Env. Microbiol.* 65, 4288-4291.
- Gregersen T. (1978). A rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 5, 123-127.
- Grimont F. et Grimont P.A.D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 137, 165-175.
- Grimont. P.A.D. et Le Flèche A. (2000). Identification des pathogènes émergents. Identification moléculaire, outil privilégié pour les bactéries pathogènes émergentes. *Ann. Inst. Pasteur/Actualités.* 12, 21-35.
- Groboillot A., Boadi D.K., Poncelet D. et Neufeld R.J. (1994). Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14, 75-107.
- Grossman A.D. (1995). Genetics networks controlling the initiation of sporulation and development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 29, 477-508.
- Grossman A.D. et Losich R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 4369-4373.
- Guillot J.F. et Ruckebusch Y. (1994). Microflore digestive des animaux. Bactéries Lactiques. :Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume II, Chap VI-1, pp 343-367.
-

- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. *Collection Dunod, Paris*, p 604.
- Hammer B.W. (1915). Bacteriological studie on the coagulation of evaporated milk. *Iowa Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 19, 119-131.
- Haque M.d.A. et Russell J.N. (2004). Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiol.* 150, 1397-1404.
- Havenaar R., Ten B.B. et Huis in't, J.H. (1992). Selection of strains for probiotic use. In: Fuller, R. (Ed.). *Probiotics : The Scientific Basic. Chapman & Hall, London*, pp 209-224.
- Heal R.D. et Parsons A.T. (2002). Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physically separated populations. *J. Appl. Microbiol.* 92, 1116-1122.
- Healy J., Weir J., Smith I. et Losick R. (1991). Post-transcription control of sporulation regulatory gene encoding transcription factor s^H in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5, 477-487.
- Heriban V., Sturdik E., Zalibera L. et Matus P. (1993). Process and metabolic characteristics of *Bacillus coagulans* as a lactic acid producer. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16, 243-246.
- Herrero M., Laca A., Garcia L.A. et Diaz M. (2001). Controlled malolactic fermentation in cider using *Oenococcus oeni* immobilized in alginate beads and comparison with free cell fermentation. *Enzyme Microb. Techn.* 28, 35-41.
- Heyndrickx M., Lebbe L., Kersters K., De Vos P., Forsyth G. et Logan N. A. (1998). *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 99-106.
- Heyndrickx M., Vandemeulebroeke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., De Vos P., Logan N.A., Ali N. et Berkeley R.C.W. (1996). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *Larvae* and *P. larvae* subsp. *Pulvifaciens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 270-279.
- Hoch J.A. (1993). The phosphorelay signal transduction pathway in the initiation of *Bacillus subtilis* sporulation. *Cell. Biochem.* 51, 55-61.
- Hoch J.A. (1995). Control of cellular development in sporulating bacteria by the phosphorelay two-component signal transduction system. In *Two-component signal transduction*, ed. Hoch J.A., Silhavy T.J. Washington, DC: *Am. Soc. Microbiol*, pp 129-144.
-

- Hoch J.A. (1998). Initiation of bacterial development. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 170-174.
- Hofmeister A.E.M., Londono-Vallejo A., Harry E., Stragier P. et Losick R. (1995). Extracellular signal protein triggering the proteolytic activation of a developmental transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Cell* 83, 219-226.
- Holzapfel W.H. et Botha S.J. (1988). Physiology of *Sporolactobacillus* strains isolated from different habitats and the indication of in vitro antagonism against *Bacillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 7, 161-168.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U. et Huis in't J.H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 85-101.
- Horani H.K. et Priest F.G. (1994). Thermotolerant varieties of *Bacillus licheniformis* isolated from desert environment. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 392-400.
- Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P. et Nickerson K.W. (2001). Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2982-2992.
- Horowitz-Wlassowa L.M. et Nowotelnow N.W. (1932). Über eine sporogenes Milchsäurebakterienart, *Lactobacillus sporogenes* n. sp. *Cent F Bak, II Abt.* 87, 331.
- Hosoi T. et Kiuchi K. (2003). Natto – A food made by fermenting cooked soybeans with *Bacillus subtilis* (nato). In: Handbook of fermented functional Foods. Farnworth E.R, Ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, pp 227-245.
- Hugenholdt J. et de Veer G.J. (1991). Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. Nisin and Novel antibiotiques. Jung G. Sahl, H.G (Eds.). ESCOM, Leiden, pp 440-448.
- Hughes K.T. et Mathee K. (1998). The antisigma factors. *Annu. Rev. Microbiol.*, 52: 231-86.
- Hyronimus B., Le Marrec C. et Urdaci M.C. (1998). Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. *J. Appl. Microbiol.* 85, 42-50.
- Hyronimus B., Le Marrec C., Hadj S.A. et Deschamps A. (2000) Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 193-197.
- Jack R.W., Tagg J.R. et Ray B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol.* 59, 171-200.
-

- Jacques P., Hbid C., Destain J., Razafindralambo H., Paquot M., De Pauw E. et Thonart P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *B. subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Appl. Bioch. Biotechnol.* 77-79, 223-233.
- Jan M., Gunter D., Jos V. et Chuanwu X. (2001). Processing and export of peptide pheromones and bacteriocins in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 9, 164-168.
- Jan P.D., Teixeira M.J. et Neijssel O.M. (1990). D(-)-lactic acid production by suspended and aggregated continuous cultures of *Bacillus laevolacticus*. *Appl. Microbiol. Biotech.* 304, 149-153.
- Jan P.D., Teixeira M.J. et Neijssel O.M. (1993). pH and glucose profiles in aggregate of *Bacillus laevolacticus*., *Appl. Env. Microbiol.* 59, 2474-2478.
- Jarry A. (1994). Production industrielle d'acide lactique. Bacteries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume II, Chap VII-3, pp 519-525.
- Jordan K.N., O'Donoghue M., Condon S. et Cogan T.M. (1996). Formation of diacetyl by cell-free extracts of *Leuconostoc lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 143, 291-297.
- Kalogridouvasiliadou D. (1992). Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *J. Dairy Sci.* 75, 2681-2686.
- Kämpfer P. (1995). An efficient method for preparation of extracts from gram-positive bacteria for comparison of cellular protein patterns. *J. microbial. Meth.* 21, 55-60.
- Kanamaru K, Stephenson S et Perego M. (2002). Overexpression of the PepF oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 184, 43-50.
- Kandler O. et Weiss N. (1986). Regular non-sporing Gram-positive rods. Genus *Lactobacillus* (Beijerinck 1901, 22). In "Bergey's manual of systematic bacteriology". 8th ed, vol. 2 (Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. & Holt J.G.). *William and Wilkins Co, Baltimore*, pp 1208-1234.
- Kaneda T. (1963). Biosynthesis of branched chain fatty acids. I. Isolation and identification of fatty acids from *Bacillus subtilis* (ATCC 7059). *J. Biol. Chem.* 238, 1222-1228.
- Kaplan H.B. et Grenberg E.P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* 163, 1210-1214.
- Karel S.F., Libicki B. et Robertson C.R. (1985). The immobilization of whole cells: Engineering principles. *Chem. Eng. Sci.* 40, 1321-1354.
-

- Keilmen G.R., Burrts K., Tanimoto B. et Doi R.H. (1976). Effect of netropsin on the derepression of enzymes during growth and sporulation of *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* 128, 80-85.
- Keith S. et James A.H. (2002). Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Mol. Microbiol.* 2, 297-304.
- Keneko T., Nozaki R. et Aizawa K. (1978). Deoxyribonucleic acid relatedness between *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Immunol.* 22, 639-641.
- Kitahara K. et Lai C.L. (1967). On the spore formation of *Sporolactobacillus inulinus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 197-203.
- Kitahara K. et Suzuki J. (1963). *Sporolactobacillus*. Nov. Subgen. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 9, 59-71.
- Ki-Yong L. et Tae-Ryeon H. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Appl. Envir. Microbiol.* 66, 869-873.
- Klaenhammer T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemistry-US.* 70, 337-349.
- Klaver F.A.M. et van deer Meer R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1120-1121.
- Kleerebezem M., Boels I.C., Groot M.N., Mierau I., Sybesma W. et Hugenholtz. (2002). Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *J. Biotech.* 98, 199-213.
- Kleerebezem M. et Quadri L.E. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: case of multicellular behavior. *Peptides.* 22, 1579-1596.
- Klein G., Pack A., Bonaparte C. et Reuter G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 103-125.
- Klein J. et Vorlop K.D. (1985). Immobilization techniques-Cells. in M. Moo-Young, C.L. Cooney, et A.E. Humphrey, eds. *Comprehensive biotechnology*. Pergamon Press, Oxford, NY, USA, pp 203-224.
- Krishnan S., Gowda L.R., Misra M.C. et Karanth N.G. (2001). Physiological and morphological changes in immobilized *L. plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. *Food Biotechnol.* 15, 193-202.
-

- Kroos L., Zhang B., Ichikawa H. et Yu Y.T. (1999). Control of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol. Microbiol.* 31, 1285-1294.
- Kuipres O.P., de Ruyter P.G., Kleerebezem M. et Willem M. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* 64, 15-21.
- Kulkarni A.R., Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Dave A.M. et Mehta M.H. (2000). Glutaraldehyde crosslinked sodium alginate beads containing liquid pesticide for soil application. *J. Control Release.* 63, 97-105.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M., Alloni G., Azevedo V., Bertero M.G., Bessières P., Bolotin A., Borchert S., Borriss R., Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.-K., Codani J.-J., Connerton I.F., Cummings N.J., Daniel R.A., Denizot F., Devine K.M., Dusterhft A., Ehrlich S.D., Emmerson P.T., Entian K.D., Errington J., Fabret C., Ferrari E., Foulger D., Fritz C., Fujita M., Fujita Y., Fuma S., Galizzi A., Galleron N., Ghim S.-Y., Glaser P., Goffeau A., Golightly E.J., Grandi G., Guiseppi G., Guy B.J., Haga K., Haiech J., Harwood C.R., Hénaut A., Hilbert H., Holsappel S., Hosono S., Hullo M.-F., Itaya M., Jones L., Joris B., Karamata D., Kasahara Y., Klaerr-Blanchard M., Klein C., Kobayashi Y., Koetter P., Koningstein G., Krogh S., Kumano M., Kurita K., Lapidus A., Lardinois S., Lauber J., Lazarevic V., Lee S.-M., Levine A., Liu H., Masuda S., Maueï C., Médigue C., Medina N., Mellado R.P., Mizuno M., Moestl D., Nakai S., Noback M., Noone D., O'Reilly M., Ogawa K., Ogiwara A., Oudega B., Park S.-H., Parro V., Pohl T.M., Portetelle D., Porwollik S., Prescott A.M., Presecan E., Pujic P., Purnelle B., Rapoport G., Rey M., Reynolds S., Rieger M., Rivolta C., Rocha E., Roche B., Rose M., Sadaie Y., Sato T., Scanlan E., Schleich S., Schroeter R., Scoffone F., Sekiguchi J., Sekowska A., Seror S.J., Serror P., Shin B.-S., Soldo B., Sorokin A., Tacconi E., Takagi T., Takahashi H., Takemaru K., Takeuchi M., Tamakoshi A., Tanaka T., Terpstra P., Tognoni A., Tasato V., Uchiyama S., Vandenbol M., Vannier F., Vassarotti A., Viari A., Wambutt R., Wedler E., Wedler H., Weitzenegger T., Winters P., Wipat A., Yamamoto H., Yamane K., Yasumoto K., Yata K., Yoshida K., Yoshikawa H.-F., Zumstein E., Yoshikawa H. et Danchin A. (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* 390, 246-249.
- Lambert R.J. et Straford M. (1999). Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.* 86, 157-164.
- Lankaputhra W.E.V. et Shah N.P. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod. J.* 30, 2-7.
- Larpent J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne : Les principaux groupes bactériens. *Collection Technique & documentation*, p 212.
-

- Larpent, J.P. et Larpent, M.G. (1985). Manuel pratique de Microbiologie. Collection Hermann, Paris (France), p 230.
- Lawrence K.N., Blumestock I. et Claus D. (1988). Taxonomic study of *Bacillus Coagulans* Hammer 1915 with a proposal for *Bacillus smithii* Sp.nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 38, 63-77.
- Lazazzera B.A. et Grossman A.D. (1998). The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbial.* 6, 288-294.
- Lazazzera B.A. et Solomon J.M. (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell.* 89, 917-925.
- Lazazzera B.A., Kurtser I.G., McQuade R.S. et Grossman A.D. (1999). An Autoregulatory circuit affecting peptide signalling in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* 181, 5193-5200.
- Lazazzera B.A. (2000). Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 177-182.
- Le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B. et Urdaci M.C. (2000). Biochemical and genetic characterization of coagulatin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* 14. *App. Env. Microbiol.* 66, 5213-5220.
- Lechevalier M.P. (1977). in Critical Review in Microbiology. Eds A. I. Laskin & H. Lechevalier; CRC Press, pp 39-46.
- LeDeaux J.R., Solomon J.M. et Grossman A.D. (1997). Analysis of non-polar deletion mutations in the gene of the *spo0K* (*opp*) operon of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett.* 153, 917-925.
- Leighton J., Core S.I. et Marta P. (2001). A free terminal carboxylate group is required for PhrA pentapeptide inhibition of RapA phosphatase. *Peptides.* 22, 1549-1553.
- Lejard F., Boyaval P., de Roissart H. et Maruejouis R. (1994). Production de ferments concentrés pour ensemencement direct. Bactéries lactiques. Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume I, Chap III-4, pp 539-553.
- Lemille F., De Barjac H. et Bonnefoi A. (1969). Essai de classification biochimique de 97 *Bacillus* groupe 1, appartenant à 9 espèces différentes. *Annales de l'Institut Pasteur.* Ed. Masson et Cie, Paris. Volume 116 (6), pp 809-819.
- Levin P.A. et Losick R. (1996). Transcription factor Spo0A switches the localization of the cell division protein FtsZ from a medial to a bipolar pattern in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 10, 478-88.
-

- Lilly D.M. et Stillwell R.H. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147, 747-748.
- Lindgren S.E. et Dobrogosz W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and food fermentations. *FEMS Microbiol.* 87, 149-163.
- Llarch A., Logan N.A., Castellvi J., Prieto M.J et Guinea J. (1997). Isolation and characterization of thermophilic *Bacillus* spp. from geothermal environments on Deception Island. South Shetland Archipelago. *Microb. Ecol.* 34, 58-65.
- Logan N.A. et Berkeley R.C.W. (1984). Identification of *Bacillus* strains using the Api system. *J. Gen. Microbiol.* 130, 1871-1882.
- Logan N.A., Clerck E.D., Lebbe L., Verhelst A., Goris J., Forsyth G., Diaz M.R., Heyndrickx M., et De Vos P. (2004). *Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookii* sp. nov., from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1071-1076.
- Lopez M., Gonzalez I., Condon S. et Bernado A. (1996). Effect of the Heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 405-410.
- Losick R., Youngman R. et Piggot P.J. (1986). Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 20, 625-670.
- Madhavan N.K. et Ashok P. (1998). Immobilization of brevibacterium cells for the production of l-glutamic acid. *Bioresource Technol.* 63, 101-106.
- Major N.C. et Bull A.T. (1989). The physiology of lactate production by *Lactobacillus delbrueckii* in a chemostat with cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 592-599.
- Mallidis C.G., Frantzeskakis P., Balatsouros G. et Katsaboxakis C. (1990). Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *Int. J. Food Sci. Technol.* 25, 442-448.
- Mamur J. et Doty P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.* 5, 109-118.
- Mandic-Mulec I., Kraigher B., Cepon U. et Mahne I. (2003). Variability of the quorum sensing in natural isolates of *Bacillus* sp. *Food Technol. Biotechnol.* 41, 23-28.
- Mansour M., Amri D., Bouttefroy A., Linder M. et Millière J.B. (1999). Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. *J. Appl. Microbiol.* 86, 311-324.
- Marcon M.J. (1997). Probiotics in Health and Medicine: Moving from fashion to scientific validity. *Clin. Microbiol. Newsletter.* 19, 89-96.
-

- Marshall R. et Beers R.J. (1976). Growth of *Bacillus coagulans* in chemically defined media. *J. Bacteriol.* 94, 517-521.
- Marteau P. et Seksik P. (2004). Place des probiotiques dans la prévention et le traitement des diarrhées post-antibiotiques. *Revue Française des Laboratoires.* 368, 73-76.
- Marteau P. et Rambaud J.C. (1993). Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 207-220.
- Mauro G., Bertone S., Soumetz F.C. et Ruggiero C. (2004). An advanced approach based on artificial neural network to identify environmental bacterial. *Int. J. Comput. Intelligence.* 2, 78-85.
- McGowen S.L., Pepperman A.B., Johnson R.M. et Selim H.M. (1998). Fate of Metribuzin from alginate controlled release formulations in a sharkey soil: 1. desorption. *Soil Sci.* 163, 529-534.
- Meehan C., Bjourson A.J. et McMullan G. (2001). *Paenibacillus azoreducens* sp. Nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 1681-1685.
- Messing R.A. et Oppermann R.A. (1979). Pore dimensions for accumulating biomass. I. Microbes that reproduce by fission or by budding. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 49-58.
- Midi and Inc. (2001). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *Technical Note # 101.* www.Midi-inc.com.
- Mietton B., Desmazeau M., de Roissart H. et Weber F. (1994). Transformation du lait en fromage. In Bactéries lactiques. Tome II : Aspects fondamentaux et technologiques. *Lorica (Ed.)*, Uriage, France. Volume II, Chap IV-3, pp 55-133.
- Milton D., Hardman A., Camara M., Chabra S. et Bycroft B. (1997). Quorum sensing in *Vibrio anguillarum*: characterisation of the autoinducer N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 179, 3004-3012.
- Mitchell D.A., Lonsane B.K., Durand A., Renaud R., Almanza S., Maratray J., Desgranges C., Crooke P.S., Kong K., Tanner R.D. et Malaney G.W. (1992). General principles of reactor design and operation for solid-substrate cultivation. In: solid-substrat cultivation. Elsevier Applied Science, London and New-York, pp 115-140.
- Modler H.W, McKellar R.C et Yaguchi M. (1990). *Bifidobacteria* and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23, 29-41.
- Mori K., Yamazaki K., Ishiyama T., Katsumata M., Kobayashi K., Kawai Y. et Shinamo H. (1997). Comparative sequence analyses of the genes
-

- coding for 16S-rDNA of *Lactobacillus casei* related taxa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 54-57.
- Nakamura L.K. et Jackson M.A. (1995). Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 46-49.
- Nakano M.M, Magnuson R., Myers A., Curry J., Grossman A.D. et Zuber P. (1991). *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 173, 1770-78.
- Nakayama O. et Yanoshi M. (1967a). Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. I.Taxonomic studies on *Bacillus laevolacticus* nov.sp. and *Bacillus racemilacticus* nov.sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 139-153.
- Nakayama O. et Yanoshi M. (1967b). Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. II.Taxonomic studies on the catalase negative strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13, 155-165.
- Nazina, T.N., Tourova T.P., Poltarau A.B., Novikova E.V., Grigoryan A.A., Ivanova A.E., Lysenko A. M., Petrunyaka V.V., Osipov G.A., Belyaev S.S., et Ivanov M.V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 433-446.
- Ndir B. (2002). Caractérisation microbiologique et biochimique du nététu, condiment alimentaire obtenu par fermentation des graines de caroubier africain *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth. (Thèse de Doctorat). Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgique, p 180.
- Nielsen J.C et Richelieu M. (1999). Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Appl. Env. Microbiol.* 65, 740-745.
- Niemann S., Puehler A., Tichy H. V., Simon R. et Selbitschka W. (1997). Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *J. Appl. Microbiol.* 82, 477-484.
- Niimura Y., Koh E., Yanagida F., Suzuki K.I., Komagata K. et Kozaki M. (1990). *Amphibacillus xylanus* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digesting bacterium which lacks cytochrome, quinone, and catalase. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40, 297-301.
-

- Norton S., Lacroix C. et Vuilleumard J.C. (1994). Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized *Lactobacillus helveticus* for lactic acid production. *Enz. Microbiol. Technol.* 16, 457-465.
- O'Byrne C.P. et Booth I.R. (2002). Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 203-216.
- O'Donnell A.G., Norris J.r., Berkeley R.C.W., Claus D., Kaneko T. et Logan N.A. (1980). Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *B. licheniformis* and *B. amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests, and Api systems. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 448-459.
- O'Toole G., Kaplan H.B. et Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 49-79.
- Ohara H. et Yahata M. (1996). L-lactic acid production by *Bacillus sp.* In anaerobic and aerobic culture. *J. ferment. bioeng.* 81, 272-274.
- Osterhout G.J., Shull V.H. et Dick J.D. (1991). Identification of clinical isolates of non-fermentative bacteria by an automated cellular fatty acid identification system. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1822-1830.
- Otto M., Submuth R., Jung G. et Gotz F. (1998). Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis agr* system. *FEBS Lett.* 424, 89-94.
- Ouoba L.I.I., Rechinger K.B., Diawara B., Traoré A.S. et Jakobsen M. (2003). Degradation of proteins during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) by strains of *Bacillus Subtilis* and *Bacillus pumilus* for production of Soumbala. *J. Appl. Microbiol.* 94, 396-402.
- Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M. M. et Axelos M. A. V. (1998). Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks.* 6, 393-408.
- Palkova Z. et Forstova J. (2000). Yeast colonies synchronise their growth and development. *J. Cell Sci.* 113, 1923-1928.
- Palop A., Marco A., Raso J., Sala F.J. et Condon S. (1997). Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 25-30.
- Palop A., Raso J., Pagan R., Condon S. et Sala F.J. (1999). Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *Int. J. Food Microbiol.* 46, 243-249.
- Parsek M.R. et Greenberg E.P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8789-8793.
-

- Payot T., Chemaly Z. et Fick M. (1999). Lactic acid production by *Bacillus coagulans* – kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 24, 191-199.
- Pearson J., Gray K., Passador L., Tucker K. et Eberhard A. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 197-201.
- Penna T.C., Machoshvili I.A., Taqueda M.E. et Ferraz C.A. (1998). *Bacillus stearothermophilus* sporulation response to different composition media. *PDA. J. Pharm. Sci. Technol.* 52, 198-208.
- Perego M. et Brannigan J.A. (2001). Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides.* 22, 1541-1547.
- Pereira D.I.A. et Gibson G.R. (2002). Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 37, 259-281.
- Petra A.L. et Grossman A.D. (1998). Cell cycle and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 630-635.
- Piggot P.J. (1996). Spore development in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 531-537.
- Pikuta E., Lysenko A., Chuvilskaya N., Mendrock U., Hippe H., Suzina N., Nikitin D., Osipov G. et Laurinavichius K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 2109-2117.
- Piva A. (2000). Alternatives to antibiotics. Compte-rendues, conference de nutrition de l'Est. Association de nutrition animale du Canada, Montréal, Quebec, p 12.
- Poncelet D., Babak V., Dulieu C. et Picot A. (1999). A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. Physicochemical and Engineering Aspects. *Colloid Surface B.* 155, 171-176.
- Posenaer Development International Labs. (2000). *Lactobacillus sporogenes* A Superior Probiotic. Reproduced from a pamphlet titled: Lactospore- the effective probiotic, p 4.
- Pottathil M. et Lazizzera B. (2003). The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front. Biosci.* 8, 32-45.
-

- Prasad J., Gill H., Smart. et Gopal P.K. (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* 8, 993-1002.
- Prenosil J.E., Kut Ö.M., Dunn I.J. et Heinzle E. (1995). Immobilized biocatalysts. *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. VCH, Weinheim, Germany, pp 4-57.
- Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (1999), Microbiologie, Collection De Boeck & Larcier S.A., Bruxelles, p 1164.
- Presser K.A., Ratkowsky D.A. et Ross T. (1997). Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Env. Microbiol.* 63, 2355-2360.
- Priest G.F. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In: *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria (Sonenshein A.L, Hoch J.A, and Losick R, Eds.). *American Society of Microbiology, Washington, DC*, pp 3-16.
- Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C. et Lejeune P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 5993-6002.
- Py Sh., Coles E., Foote J.I. et Stenesh J. (1970). Fatty acid distribution in mesophilic and thermophilic strains of the genus *Bacillus*. *J. Bacteriol.* 3, 479-481.
- Rafter J. (2003). Probiotics and colon cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 17, 849-859.
- Rainey A.F., Fritz D. et Stackebrandt E. (1994). The phylogenetic diversity of thermophilic members of the genus *Bacillus* as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol. lett.* 15, 205-212.
- Ramage G., Saville S.P., Wickes B.L. et Lopez-Ribot J.L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5459-5463.
- Rashid M.H., Rumbaugh K., Passador L., Davies D.G., Hamood A.N., Iglewski B.H. et Kornberg A. (2000). Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 9636-9641.
- Renco P. (1942). Recherche su un fermento lactico sporingo (*Bacillus thermoacidificans*). *Ann. Microbiol.* 2, 109-114.
- Rhaese H.J., Hoch J.A. et Groscurth R. (1977). Studies on the control of development: isolation of *Bacillus subtilis* mutant blocked early in sporulation and defective in synthesis of highly phosphosylated nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 1125-1129.
-

-
- Robinson D.K. et Wang D.I.C. (1987). A novel bioreactor system for biopolymer production. *Ann. Natl. Acad. Sci. USA.* 506, 229-241.
- Roe A.J., McLaggan D., Davidson I., O'Byrne C. et Booth I.R. (1998). Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *J. Bacteriol.* 180, 767-772.
- Rudner D.Z., LeDeaux R.J., Ireton K. et Grossman A.D. (1991). The spo0K locus of *Bacillus Subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J. Bacteriol.* 174, 1388-1398.
- Ruimy R. et Andremont A. (2004). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* : molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation.* 13, 176-184.
- Russell J.B. et Diez-Gonzalez F. (1998). The Effects of Fermentation acids on Bacterial Growth. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 206-234.
- Russell N.J., Evans R.I., TerSeeg P.F., Hellemons J, Verheul A. et Abee T. (1995). Membrane as a target for stress adaptation. *Int. J. Microbiol.* 28, 255-261.
- Ryter A. (1965). Etude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Anales de l'Institut Pasteur.* 108, 40-60.
- Saitou N. et Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Salam A. I. et Berkorovainy A. (1993). Survival of Bifidobacteria in the presence of bile salt. *J. Sci. Food Agric.* 62, 351-354.
- Salminen S. et Saxelin M. (1996). Comparison of successful probiotic strains. *Nutr. Tod. Sup.* 31, 32- 34.
- Salminen S., Ouwehand A.C. et Isolauri E. (1998). Clinical application of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 8, 563-572.
- Sanders M.E., Morelli L. et Tompkins. (2003). Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety.* 2, 101-110.
- Sarkar P.K., Hasenack B. et Nout M.J.R. (2002). Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and Locust bean (African Soumbala). *Int. J. Food Microbiol.* 77, 175-186.
- Schauder S. et Bassler B.L. (2001). The languages of bacteria. *Gene. Dev.* 15, 1468-1480.
- Scheinbach S. (1998). Probiotics: Functionality and commercial status. *Biotechnol. adv.* 16, 581-608.
-

- Schillinger U. (1999). Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 79-87.
- Schleifer K.H., Ludwig W., Amann R. et Hertel C. (1991). Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria and their identification with nucleic acid probes. *Actes du colloque Lactic*, pp 23-32.
- Schlesner H., Lawson P. A., Collins M. Weiss D., Wehmeyer U., Völker H. et Thomm M. (2001). *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 51, 425-431.
- Schlöter M., Lebuhn M., Heulin T. et Hartmann A. (2000). Ecology and evolution of bacterial microdiversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 647-660.
- Senthuran A., Senthuran V., Mattiasson B. et Kaul R. (1997). Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 841-853.
- Shah P. A., Aebi M. et Tuor U. (1998). Method to immobilize the aphid-pathogenic fungus *Erynia neoaphidis* in an alginate matrix for biocontrol. *Appl. Env. Microbiol.* 64, 4260-4263.
- Shchepin, R., Hornby, J.M., Burger, E., Niessen, T., Dussault, P. et Nickerson, K.W. (2003). Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chem. Biol.* 10, 743-750.
- Shida O., Takagi H., Kadowaki K. et Komagata K. (1996). Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 939-946.
- Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L.K. et Komagata K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the Genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 289-298.
- Shih N.J. et Labbe R.G. (1996). Sporulation-promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids. *Appl. Env. Microbiol.* 62, 1441-1443.
- Sneath P.H. (2001). Numerical Taxonomy. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edition, Springer-Verlag, New-York, pp 39-42.
- Solomon J., Su L, Shyn S. et Grossman A.D. (2003). Isolation and characterization of mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport. *J. Bacteriol.* 185, 6425-6433.
-

- Solomon J.M., Lazizzera B.A. et Grossman A.D. (1996). Purification and characterisation of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Gene. Dev.* 10, 2014-2024.
- Song H.J. et Richard J. (1997). Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 155-161.
- Song Y.L., Kato N., Matsumiya Y., Liu C.X., Kato H. et Watanabe K. (1999). Identification of *Lactobacillus* species of human origin by a commercial kit. *J. Assoc. Rapid. Meth. Automation Microbiol.* 10, 77-82.
- Sow-Légrand N.M. (2004). Sélection et caractérisation de bactéries lactiques d'origine africaine en vue d'une utilisation comme probiotiques (thèse de doctorat). Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques, Belgique, Gembloux, Belgique, p 217.
- Spinosa M.R., Braccini T. et Ricca E. (2000). On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res. Microbiol.* 151, 361-368.
- Spring S., Ludwig W., Marquez M.C., Ventosa A., et Schleifer K.H. (1996). *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 46, 492-496.
- Stackebrandt E. et Goebel B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Bacteriol.* 44, 846-849.
- Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M., Grimont P.A.D., Kämpfer P., Maiden M.C.J., Nesme X., Rossello-Mora R., Swings J., Truper H.G., Vauterin L., Ward A.C. et Whitman W.B. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1043-1047.
- Stahly D.P. et Klein M.G. (1992). Problems with in vitro production of spores of *Bacillus popilliae* for use in biological control of the Japanese beetle. *J. Invertebrate Pathol.* 60, 283-291.
- Stephens C. (1998). Bacterial sporulation: a question of commitment? *Curr. Biol.* 8, 45-48.
- Stephensons S., Mueller C., Jiang M. et Perego M. (2003). Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185, 4861-4871.
- Stragier P. et Losick R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 30, 297-341.
-

- Suominen I., Spröer C., Kämpfer P., Rainey F.A., Lounatmaa K. et Salkinoja-Salonen M. (2003). *Paenibacillus stellifer* sp. nov., a cyclodextrin-producing species isolated from paperboard. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1369-1374.
- Suzuki T. et Yamasato K. (1994). Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 115, 13-18.
- Swift S., Karlyshev A.V., Fish L., Durant E.L., Winson M.K., Chhabra S.R., Williams P., Macintyre S. et Stewart G.S. (1997). Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate N-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* 179, 5271-5281.
- Tannock G.W. (1997). Probiotic properties of lactic-acid bacteria: Plenty of scope for fundamental R&D. *Trends Biotechnol.* 15, 270-274.
- Thompson P.J. et Thames O.A. (1967). Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol.* 15, 975-979.
- Thonart P., Paquot M., Baijot B. et Dalemans D. (1983). Les cellules immobilisées. Techniques du génie biochimique. *Annales de Gembloux.* 89, 221-237.
- Throup J., Camara M., Briggs G., Winson M. et Chhabra S. (1995). Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* 17, 345-356.
- Touzel J.P., O'Donohue M., Debeire P., Samain E. et Breton C. (2000). *Thermobacillus xylanilyticus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic thermophilic xylan degrading bacterium isolated from farm soil. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 50, 315-320.
- Trach K., Burbulys D., Strauch M., Wu J.J., Dhillon N., Jonas R., Hanstein C., Kallio P., Perego M. et Bird T. (1991). Control of the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* by a phosphorelay. *Res. Microbiol.* 142, 815-23.
- Tseng W.J. et Labbe R.G. (2000). Characteristics of a sporulation stimulating factor from *clostridium perfringens* type A. *Lett Appl. Microbiol.* 30, 254-257.
- Uchida K. et Mogi K. (1973). Cellular fatty acid spectra of *Sporolactobacillus* and some other *Bacillus-Lactobacillus* intermediates as a guide to their taxonomy. *Vaccine.* 18, 1730-1738.
- Van Rensen C.A., Chikindas M.L., Van Zyl W.H. et Dicks L.M.T. (2003). Characterization and heterologous expression of a class IIa Bacteriocin, plantacin 423 from *Lactobacillus plantarum* 423, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 29-40.
-

- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K. et Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60, 407-438.
- Vasantha N. et Freese E. (1979). The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus Subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 112, 329-336.
- Vaughan E.E., Beat M. et Willem M. (1999). Fonctionnalité de probiotiques et intestinal lactobacilli : light in the intestinal tunnel. *Curr. Opin. biotechnol.* 10, 505-510.
- Velazquez E., de Miguel T., Poza M., Rivas R., Rossello-Mora R. et Villa T.G. (2004). *Paenibacillus favisporus* sp. Nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 59-64.
- Velings N.M. et Mestdagh M.M.. (1995). Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Network.* 3, 311-330.
- Vick R.T.B., Mandel D.K., Dea D.K., Blanch H.W. et Wilke C.R. (1983). The application of cell recycle to continuous fermentative lactic acid production. *Biotechnol. Lett.* 5, 665-670.
- von der Weil I., Edilson P., Nobrega A., Elsas J.D. et Seldin L. (2000). Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Res. Microbiol.* 151, 369-381.
- von Wintzingerode F., Rainey F.A., Kroppenstedt R.M. et Stackebrandt E. (1997). Identification of environmental strains of *Bacillus mycoides* by fatty acid analysis and species-specific 16S rDNA oligonucleotide probe. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24, 201-209.
- Waino M., Tindall B.J., Schumann P. et Ingvorsen K. (1999). *Gracilibacillus* gen. nov., with description of *Gracilibacillus halotolerans* gen. nov., sp. nov.; transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri* comb. nov., and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus* gen. nov., as *Salibacillus salexigens* comb. nov. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 49, 821-831.
- Waldburger C., Gonzalez D. et Chambliss G.H. (1993). Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus Subtilis*. *J. Bacteriol.* 175, 6321-6327.
- Wang S.D. et Wang D.I.C. (1989). Cell adsorption and local accumulation of extracellular polysaccharide in an immobilized *Acinetobacter calcoaceticus* system. *Biotechnol. Bioeng.* 34, 1261-1267.
- Ward L.J.H. et Timmins M.J. (1999) Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 90-92.
-

- Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. et Trüpper H.G. (1987). Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacteria systematic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 463-464.
- Weinberg E. (1964). Manganese requirement for sporulation and other secondary biosynthetic processes of *Bacillus*. *Appl. Microbiol.* 12, 436-441
- Welch F.D. (1991). Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 422-438.
- Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J. et Salmond G.P. (2001). Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 365-404.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk P.J., Fox G.E., Deinhard G. et Poralla K. (1992). Comparative sequences analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 263-269.
- Yanagida F., Suzuki K., Kozaki M. et Komagato K. (1997). Proposal of *sporolactobacillus nakayamae*. Subsp. *Nakayamae* Sp. Nov., Subsp. *Racemicus* subsp. Nov., *Sporolactobacillus terrae* sp.nov., *Sporolactobacillus lactosus* Sp.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 499-504.
- Yesowitch R., Cohen A. et Szilagyi A. (2003). Failure to improve lactose (La) or lactulose (Lu) intolerance with probiotics: a pilot study. *Am. J. Gastroentol.* 98, S263.
- Yoon H.G., Lee K.H., Kim H.Y., Kim H.K., Shin D.H., Hong B.S. et Cho H.Y. (2002). Gene cloning and biochemical analysis of thermostable chitosanase (Tch-2) from *Bacillus coagulans* Ck108. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 986-995.
- Zamocky M., Godocikova J., Koller F. et Polek B. (2001). Potential application of catalase-peroxidase from *Comamonas terrigena* N3H in the biodegradation of phenolic compounds. *Antonie Leeuwenhoek.* 79, 109-117.
- Zhang L-H. et Dong Y-H. (2004). Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53, 1563-1571.
- Zuber P. (2001). A peptide profile of the *Bacillus subtilis* genome. *Peptides*, 22, 1555-1577.
- Zukowski M.M. (1992). Production of commercially valuable products. In: *Biology of Bacilli, Applications to industry* (Doi R.H., McGloughlin M., Eds) USA, Butterworth-Heinemann, pp 311-337.
-

ANNEXES : PROFILS DES ACIDES GRAS CELLULAIRES DES ISOLATS

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.578	479192875	0.029		7.008	SOLVENT PEAK		< min rt	
1.678	3919	0.015		7.209			< min rt	
1.771	2595	0.029		7.395			< min rt	
1.895	150	0.016		7.643			< min rt	
2.481	521	0.028		8.818			< min rt	
4.306	1001	0.029	1.047	11.609	12:0 ISO	2.00	ECL deviates -0.000	Reference -0.005
5.356	12705	0.031	1.018	12.614	13:0 ISO	24.62	ECL deviates -0.000	Reference -0.004
5.457	1526	0.030	1.015	12.703	13:0 ANTEISO	2.95	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
6.630	3672	0.033	0.995	13.619	14:0 ISO	6.96	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
7.145	614	0.037	0.988	14.000	14:0	1.15	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
9.094	15315	0.038	0.978	14.624	15:0 ISO	28.53	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
8.231	2369	0.039	0.977	14.713	15:0 ANTEISO	4.41	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
9.467	1367	0.041	0.967	15.484	Sum In Feature 2	2.52	ECL deviates -0.004	14:0 3OM/16:1 ISO I
9.698	1949	0.047	0.966	15.624	16:0 ISO	3.59	ECL deviates -0.003	Reference -0.006
10.083	5143	0.041	0.964	15.858	Sum In Feature 3	9.44	ECL deviates 0.006	15:0 ISO 2OM/16:1w7c
10.318	1447	0.039	0.962	16.000	16:0	2.65	ECL deviates -0.000	Reference -0.004
10.986	934	0.040	0.959	16.389	ISO 17:1 w10c	1.70	ECL deviates 0.001	
11.111	1975	0.044	0.958	16.462	ISO 17:1 w5c	3.60	ECL deviates 0.001	
11.401	3233	0.040	0.957	16.631	17:0 ISO	5.89	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
*****	1367				SUMMED FEATURE 2	2.52	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
*****							16:1 ISO I/14:0 3OM	14:0 3OM/16:1 ISO I
*****	5143				SUMMED FEATURE 3	9.44	16:1 w7c/15 iso 2OM	15:0 ISO 2OM/16:1w7c

Solvent	Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
479192875		53251	53251	100.00	52521	10	0.002	0.004

TSBA50 [Rev 5.0]	Bacillus	%	Reference
	B. mycoloides	0.233	(Bacillus cereus group)
	B. m. GC subgroup B	0.233	(Bacillus cereus group)

Annexe 1: composition en acide gras de la CWBI-B2

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.578	477645719	0.030		7.005	SOLVENT PEAK		< min rt	
5.358	507	0.034	1.018	12.614	13:0 ISO	0.42	ECL deviates -0.000	Reference -0.003
6.632	889	0.034	0.995	13.619	14:0 ISO	0.72	ECL deviates -0.000	Reference -0.002
7.148	1451	0.038	0.988	14.001	14:0	1.16	ECL deviates 0.001	Reference -0.001
8.097	68593	0.038	0.978	14.623	15:0 ISO	54.24	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
8.233	30170	0.039	0.977	14.713	15:0 ANTEISO	23.83	ECL deviates -0.000	Reference -0.002
9.311	602	0.035	0.969	15.388	16:1 w7c alcohol	0.47	ECL deviates 0.001	
9.705	1784	0.041	0.966	15.627	16:0 ISO	1.39	ECL deviates -0.000	Reference -0.002
9.922	3155	0.039	0.965	15.758	16:1 w11c	2.46	ECL deviates 0.001	
10.321	3337	0.041	0.962	16.000	16:0	2.59	ECL deviates 0.000	Reference -0.002
10.988	3183	0.042	0.959	16.389	ISO 17:1 w10c	2.47	ECL deviates 0.001	
11.140	980	0.041	0.958	16.477	Sum In Feature 4	0.76	ECL deviates 0.001	17:1 ISO I/ANTEI B
11.403	7415	0.043	0.957	16.631	17:0 ISO	5.73	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
11.561	4879	0.042	0.956	16.722	17:0 ANTEISO	3.77	ECL deviates -0.001	Reference -0.003
*****	980				SUMMED FEATURE 4	0.76	17:1 ISO I/ANTEI B	17:1 ANTEISO B/I I

Solvent	Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
477645719		126944	126944	100.00	123726	9	0.001	0.002

TSBA50 [Rev 5.0]	Bacillus	%	Reference
	B. pumilus	0.926	
	B. p. GC subgroup B	0.926	

Annexe 2: Composition en acide gras de la CWBI-B6

 ID: 12512 ID-7669(B210/P47) Date of run: 07-APR-04 21:37:11
 Bottle: 25 SAMPLE [TSBA50]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.577	482447781	0.029	. . .	7.005	SOLVENT PEAK		< min rt	
4.661	535	0.029	1.032	12.000	12:0	0.50	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
6.630	1939	0.036	0.994	13.619	14:0 ISO	1.76	ECL deviates -0.000	Reference -0.005
7.145	4500	0.035	0.988	14.000	14:0	4.06	ECL deviates -0.000	Reference -0.004
8.093	8708	0.037	0.979	14.623	15:0 ISO	7.78	ECL deviates 0.000	Reference -0.004
8.231	48550	0.037	0.978	14.714	15:0 ANTEISO	43.34	ECL deviates 0.001	Reference -0.003
8.669	463	0.033	0.974	15.001	15:0		ECL deviates 0.001	
9.703	9896	0.041	0.968	15.627	16:0 ISO	8.74	ECL deviates 0.000	Reference -0.003
10.318	19203	0.041	0.964	15.999	16:0	16.91	ECL deviates -0.001	Reference -0.004
11.403	4469	0.042	0.959	16.631	17:0 ISO	3.91	ECL deviates 0.001	Reference -0.002
11.561	14842	0.043	0.959	16.723	17:0 ANTEISO	12.99	ECL deviates -0.000	Reference -0.003

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
482447781	113106	112644	99.59	109518	9	0.000	0.004

 TSBA50 [Rev 5.0] Paenibacillus 0.490 (Bacillus)
 P. polymyxa 0.490 (Bacillus)
 Rothia 0.362
 R. dentocariosa 0.362

Annexe 3: composition en acide gras de la CWBI-P1

 ID: 12505 ID-7665(QALL/B210/P47) Date of run: 07-APR-04 18:20:30
 Bottle: 18 SAMPLE [TSBA50]

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.578	478544312	0.030	. . .	6.999	SOLVENT PEAK		< min rt	
6.636	1743	0.035	0.995	13.619	14:0 ISO	6.90	ECL deviates 0.000	Reference 0.000
7.149	3273	0.036	0.988	14.000	14:0	12.86	ECL deviates -0.000	Reference -0.000
8.099	2048	0.038	0.978	14.623	15:0 ISO	7.97	ECL deviates 0.000	Reference -0.000
8.235	10384	0.038	0.977	14.713	15:0 ANTEISO	40.34	ECL deviates -0.000	Reference -0.001
9.707	1798	0.039	0.966	15.627	16:0 ISO	6.91	ECL deviates 0.000	Reference -0.001
9.925	293	0.032	0.965	15.760	16:1 wllc	1.12	ECL deviates 0.003	
10.322	6251	0.042	0.962	16.000	16:0	23.91	ECL deviates -0.000	Reference -0.001

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
478544312	25790	25790	100.00	25152	6	0.001	0.001

 TSBA50 [Rev 5.0] Paenibacillus 0.731 (Bacillus azotofixans)
 P. azotofixans 0.731 (Bacillus azotofixans)

Annexe 4 : Composition des acides gras de la CWBI-C15

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.578	478496875	0.029	7.004	SOLVENT PEAK	<	min rt	
6.634	3358	0.035	0.995	13.619	14:0 ISO	5.89	ECL deviates	-0.000 Reference -0.001
7.148	4391	0.036	0.988	14.000	14:0	7.65	ECL deviates	0.000 Reference -0.001
8.098	7113	0.038	0.978	14.624	15:0 ISO	12.27	ECL deviates	0.001 Reference -0.001
8.234	18103	0.037	0.977	14.713	15:0 ANTEISO	31.18	ECL deviates	0.000 Reference -0.001
8.673	549	0.036	0.973	15.001	15:0		ECL deviates	0.001
9.706	4957	0.041	0.966	15.627	16:0 ISO	8.44	ECL deviates	-0.000 Reference -0.001
10.321	18132	0.042	0.962	15.999	16:0	30.75	ECL deviates	-0.001 Reference -0.002
11.405	1380	0.041	0.957	16.630	17:0 ISO	2.33	ECL deviates	0.000 Reference -0.001
11.565	885	0.038	0.956	16.723	17:0 ANTEISO	1.49	ECL deviates	0.000 Reference -0.000

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amnt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
478496875	58868	58320	99.07	56728	8	0.000	0.001

TSBA50 [Rev 5.0]	Bacillus	0.216
	B. lentus	0.216
	Paenibacillus	0.167 (Bacillus)
	P. popilliae	0.167 (Bacillus)
	P. larvae	0.153 (72h, Bacillus)
	P. l. larvae	0.153 (72h, Bacillus)

Annexe 5: Composition en acide gras de la CWBI-BC