

50376
1975
130

50376
1975
130

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE TROISIEME CYCLE

Spécialité : Biochimie

Mention : Microbiologie

par

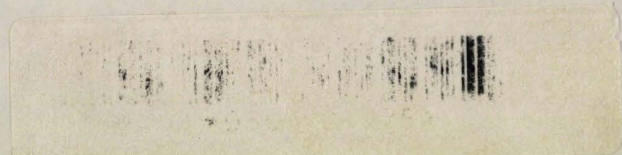
Patrick MYSSYNE

ESSAIS DE PRODUCTION IN VITRO DE CELLULASES A PARTIR DES BACTERIES DU RUMEN



Soutenue le 29 Septembre 1975, devant la COMMISSION D'EXAMEN

Membres du Jury : M. J. GUILLAUME Président
Mlle G. SPIK
M. J.C. DERIEUX
M. J.P. ROUSSEAU



Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Technologie et des Fermentations de l'Institut Pasteur de Lille.

Je suis heureux d'exprimer ici toute ma gratitude à Monsieur le Professeur J. GUILLAUME qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a toujours encouragé et conseillé.

Mes plus sincères remerciements s'adressent également à Mademoiselle G. SPICK, Monsieur J.C. DERIEUX et à Monsieur J.P. ROUSSEAU qui ont bien voulu juger ce travail et participer au jury de cette thèse.

Je remercie le Personnel des Abattoirs de la Ville de Lille pour l'aide apportée lors des prélèvements de liquide de rumen.

J'adresse un très grand merci à Madame COLMANT qui m'a fait bénéficier de sa précieuse et efficace collaboration Technique.

Enfin, je suis heureux de dédier cette thèse à ceux et à celles dont l'amitié et l'affection m'ont soutenu et encouragé pendant ces deux années.

P L A N

I^{ère} PARTIE : L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE IN "VITRO" DU RUMEN

I . LE RUMEN

Page 6

- a) Description
- b) La Symbiose
- c) La Microbiologie
 - 1. Les bactéries
 - 2. Les protozoaires

II . LES BACTERIES CELLULOLYTIQUES

Page 12

- a) Généralités
- b) Les formes bacillaires
- c) Les cocci cellulolytiques

III. LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES

Page 17

- a) Généralités
- b) Mécanisme d'action
 - 1. Théorie oxydative ou hydrolytique
 - 2. Multiplicité ou unicité enzymatique
 - 3. Attaque de la cellulose en bout de chaîne ou au hasard
- c) Importance industrielle
 - 1. Préservation des matériaux cellulosiques
 - 2. Utilisation des cellulases comme source d'énergie

IV . L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE "IN VITRO" DU RUMEN

Page 27

- a) Matériel et Méthodes
 - 1. Le prélèvement du liquide de rumen
 - 2. Dosage
 - a - Principe
 - b - Dosage de la cellulose résiduelle
 - 3. Les substrats cellulosiques

b) Influence de différents paramètres

1. Influence du substrat

- a - Concentration en cellulose
- b - Nature de la cellulose

2. Influence du Tampon

- a - Composition du Tampon
- b - Influence des constituants
- c - Concentration en Tampon

3. Influence du temps d'incubation

4. Influence du liquide de rumen

- a - Alimentation
- b - Heure du prélèvement
- c - "Vieillessement"

CONCLUSION

Page 46

2^{ème} PARTIE : CULTURE "IN VITRO" DES MICROORGANISMES CELLULOLYTIQUES
DU RUMEN DE BOEUF

I . CULTURE DES BACTERIES CELLULOLYTIQUES DU RUMEN

Page 49

a) L'Anaérobiose

1. Le gaz carbonique
2. L'anaérobiose dans les fioles de cultures
3. Etanchéité des bouchons

b) Le milieu de culture

1. Généralités

- Les agents réducteurs
- Les indicateurs d'oxydo-réducteur
- La régénération des milieux

2. Sélection d'un milieu de culture

- Les milieux testés
- Résultats
- Conclusion

c) L'activité cellulolytique des cultures

1. Matériel et Méthodes
2. Influence de différents paramètres
 - Concentration en cellulose
 - Concentration en Tampon
3. Conclusion

II . ESSAIS D'OPTIMISATION DE LA CELLULOLYSE : MODIFICATION DU MILIEU
DE CULTURE

Page 65

a) Influence de la source carbonée et azotée

1. Matériel et Méthodes
2. Influence de la source carbonée
 - Résultats
 - . Influence de différents sucres
 - . Influence du lactose
 - Conclusions
3. Influence de la source azotée
 - Résultats
 - . Remplacement des ions sulfate
 - . Influence de la concentration en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 - . Influence de la nature de la source azotée
 - Conclusions

b) Addition de différents produits au milieu de HUNGATE

1. Matériel et Méthodes
2. Résultats et conclusion

c) Essais de substitution du liquide de rumen

1. Dilution du liquide de rumen incorporé
2. Substitution du liquide de rumen
 - Le Corn Steep
 - Les acides gras volatils
 - La biotine
3. Mélange de ces différents substituants
 - Le nouveau milieu de base

- Addition de différents produits

- . Antibiotiques
- . Vitamine B₁₂

d) Conclusion

III. ESSAIS DE CULTURE DES BACTERIES CELLULOLYTIQUES AU NIVEAU SEMI INDUSTRIEL

Page 92

a) La Préculture

1. Importance du volume de préculture
2. Influence de l'âge de la préculture

b) Etude en fermenteur

1. Le matériel et l'anaérobiose
2. La microflore des cultures
 - Matériel et Méthodes d'étude
 - Evolution du nombre de bactéries
 - Evolution des espèces
3. L'activité des cultures en fermenteur envers la cellulose
 - L'activité cellulolytique
 - L'activité cellulasique
 - Evolution du pH
 - Libération de sucres dans le milieu

3^{ème} PARTIE : LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES DES CULTURES DE BACTERIES DU RUMEN

I . OBTENTION DES CELLULASES A PARTIR DES CULTURES DE BACTERIES DU RUMEN

Page 108

a) Localisation de l'activité cellulolytique

1. Méthode
2. Résultats et conclusion

b) Libération des cellulases liées

1. Méthode physique
2. Méthode chimique
3. Méthode enzymatique
 - influence de la concentration en enzyme
 - influence du temps d'action

c) Conclusions

a) Historique

b) Caractéristiques des cellulases

1. Méthodologie

2. Résultats

1 - pH

2 - Température

3 - Influence de la concentration en substrat

4 - Influence de la concentration en enzyme

5 - Cinétique d'action

6 - Influence de la nature du substrat

c) Essais de fractionnement des cellulases

1. Précipitation fractionnée

2. Fractionnement sur colonne

Conclusions

INTRODUCTION

La cellulose est la substance organique la plus abondante dans la nature puisqu'elle est le constituant majeur de la plupart des végétaux. Le bois en contient 40 à 50 % tandis que le coton en est composé de 90 %. La production annuelle mondiale est d'environ 100 billions de tonnes. C'est pourquoi elle est utilisée dans de nombreux domaines tels que la fabrication du papier, textiles, explosifs, revêtements, bois de construction et même dans l'industrie alimentaire.

Pour l'homme, la cellulose n'est pas seulement une matière première pour les industries mais aussi un élément indispensable à son alimentation. Dans la nature d'autres organismes l'utilisent ; en effet, c'est un polyholoside pouvant constituer une substance nutritive. Ces organismes sont des invertébrés, des insectes, des végétaux, des champignons supérieurs et surtout des microorganismes (bactéries et champignons imparfaits). Les ruminants assimilent une partie de la cellulose grâce à la présence de bactéries cellulolytiques dans le rumen.

La dégradation biologique de la cellulose est certainement la plus importante réaction d'hydrolyse existant dans la nature. Elle joue un rôle essentiel dans le cycle du carbone. Selon GHOSE (29), 95 billions de tonnes de CO_2 sont libérés dans l'atmosphère chaque année. COWLING a calculé que si le mécanisme de cette réaction était bloqué, toute vie cesserait sur terre dans les vingt ans qui suivent (16).

Cependant, malgré cette nécessité, la dégradation de la cellulose par les microorganismes n'en est pas moins parfois gênante. Ceux-ci s'attaquent non seulement à la cellulose native (bois vert et coton) mais aussi aux produits cellulosiques utilisés par l'homme.

Aux ETATS-UNIS, les résidus cellulosiques urbains sont d'environ un kg par personne et par jour. Les résidus agricoles sont évalués à 6 à 10 fois ce poids. C'est pourquoi, on a songé à incorporer ces déchets cellulosiques dans l'alimentation du bétail.

Cependant, l'utilisation de la cellulose est augmentée lorsqu'elle est hydrolysée en son monomère : le glucose. Celui-ci peut servir alors à différentes productions comme des protéines d'origine bactériennes, d'éthanol, d'hydrocarbures... Ceci explique les nombreux travaux réalisés sur la dégradation de la cellulose. Celle-ci peut se faire de deux façons :

- soit par une hydrolyse acide
- soit par dégradation biologique par les microorganismes.

L'hydrolyse acide est la méthode la plus ancienne. DUNNING et LA THROP (22) procèdent de la façon suivante : les résidus, après séchage et broyage sont mis au contact d'acide sulfurique concentré pendant un temps très court. Puis l'hydrolyse se poursuit en milieu acide faible (H_2SO_4 8 %) et à la température de $120^{\circ} C$. Cependant, cette technique est assez onéreuse et n'est rentable qu'en période de crise (première et deuxième guerres mondiales).

La seconde méthode a l'avantage d'être peu coûteuse et permet d'autre part la récupération du microorganisme qui peut présenter une valeur nutritive. Les microorganismes cellulolytiques sont nombreux dans la nature. On peut les classer en quatre catégories :

- les microorganismes aérobies mésophiles
- les microorganismes anaérobies mésophiles
- les microorganismes aérobies thermophiles
- les microorganismes anaérobies thermophiles.

Tous les microorganismes ne possèdent pas le même pouvoir de dégradation de la cellulose. Parmi les plus actifs, deux champignons imparfaits Trichoderma viride et Myrothecium verrucaria sont les plus cités et étudiés. Certaines bactéries anaérobies mésophiles possèdent également une forte activité cellulolytique. Ce sont essentiellement les bactéries du rumen et celles de la terre. Cependant, peu de travaux utilisent ces microorganismes pour la dégradation de la cellulose. Cela est surtout dû aux

nombreuses difficultés rencontrées lors de leur culture : ce sont des bactéries anaérobies strictes ayant de nombreuses exigences ainsi qu'une croissance lente.

Nous avons orienté nos recherches sur les bactéries du rumen. Malgré les difficultés précédemment citées, notre choix a été dicté par deux raisons. Les bactéries du rumen sont responsables de la dégradation des aliments cellulosiques ingérés par les ruminants et permettent ainsi le développement de ces animaux. Ceci suppose que les enzymes cellulolytiques, les cellulases, secrétées par ces bactéries possèdent une forte activité d'hydrolyse de la cellulose insoluble.

La seconde raison concerne les conditions d'obtention de ces microorganismes. Ceux-ci sont présents en grand nombre et espèce dans l'appareil digestif de nombreux animaux, essentiellement les ruminants. Leur obtention est réalisée sans difficulté majeure à partir de prélèvement de liquide de rumen.

L'étude de l'activité cellulolytique des bactéries du rumen de boeuf s'est déroulée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, nous avons décrit le rumen et sa microbiologie et en particulier les bactéries cellulolytiques. Puis, nous nous sommes attachés à mesurer cette activité lors de conditions d'expérience "in vitro". Pour cela, il nous a fallu définir notre méthode de dosage de la cellulolyse, ainsi que les différents paramètres l'influençant.

Comme certains facteurs modifient considérablement l'activité cellulolytique du liquide de rumen, il nous a semblé judicieux de réaliser des cultures de bactéries du rumen en milieu liquide. Cette deuxième étape nécessite de proposer un milieu de culture adapté plus particulièrement aux microorganismes cellulolytiques ; ce milieu devant satisfaire à leurs exigences, tout en restant peu complexes . Les bactéries du rumen étant

tuées par l'oxygène, il nous a fallu également définir les conditions pour avoir une anaérobiose la plus totale lors des cultures.

Finalement, nous avons essayé d'obtenir par différentes techniques, physiques, chimiques ou enzymatiques, les enzymes responsables de la cellulolyse et nous nous sommes limités à décrire leurs principales caractéristiques (ph, température...).

I^{ère} PARTIE :

L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE

"IN VITRO" DU RUMEN

Depuis plus de deux siècles, de nombreuses recherches ont été entreprises pour étudier la digestion des ruminants. Les premiers travaux remontent à 1685, date à laquelle PEYER (71) montra que l'estomac de ces animaux était le siège d'une fermentation. Un siècle plus tard, SPALLANZANI décrivit l'appareil digestif du boeuf. HAUBNER en 1855, par des analyses quantitatives d'aliments et d'excréments, mit en évidence la disparition d'une quantité importante de cellulose lors de la digestion. L'hypothèse d'une dégradation de la cellulose par des sucs digestifs présents dans l'estomac des ruminants, fut alors émise.

Ce n'est que depuis le début du XX^e siècle que de nombreux travaux ont permis de comprendre et de décrire le mécanisme de la digestion ainsi que de mettre en évidence la présence de microorganismes dans le rumen. La dégradation de la cellulose n'est pas le fait de sucs digestifs mais est due à l'activité cellulolytique de certaines espèces bactériennes.

I. LE RUMEN

a) Description

L'estomac des ruminants est composé de quatre poches bien distinctes communiquant entre elles. Nous distinguons le réseau ou reticulum, la panse ou rumen, le feuillet ou omasum et la caillette ou obomasum.

Le rumen est la partie la plus vaste de l'estomac. En moyenne, il atteint une quinzaine de litres chez le mouton. Chez le boeuf ce chiffre peut être multiplié par 20 et le rumen représente alors près de 1/7 du poids total. Cela explique l'importante quantité d'aliments et d'eau pouvant être absorbés par ces animaux.

Les aliments ingérés sont mastiqués pendant un temps très court puis façonnés par la salive en une "masse" ou "bol" (le poids moyen d'un bol est d'environ 100 g). Celui-ci est alors mené jusqu'au rumen par de

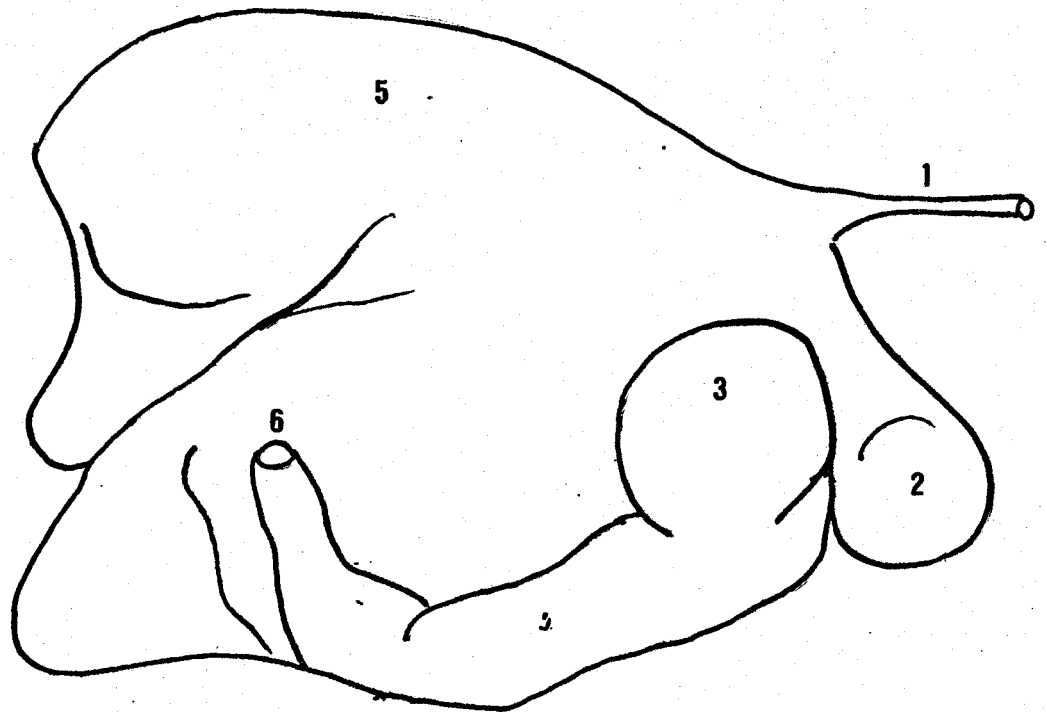
puissantes contractions péristaltiques de l'oesophage. Arrivés à ce niveau, les aliments sont soumis à une intense fermentation pendant vingt-quatre heures environ.

Intérieurement, le rumen est divisé en parties plus ou moins distinctes par plusieurs piliers musculaires. Au contraire de la face externe du rumen qui est lisse et blanchâtre, la face interne est couverte de protubérances en forme de papilles. Celles-ci sont de forme variable, de 1 à 10 mm de diamètre à 3 à 10 mm de longueur. Elles permettent d'augmenter la surface en contact avec le liquide de rumen et d'accroître ainsi les phénomènes d'absorption.

La découverte de protozoaires par GRUBY et DELAFOND (34) en 1943, fut la première preuve de l'existence de microorganismes dans le rumen. VON TAPPEINER (1884) montra que la dégradation de la cellulose dans l'estomac des ruminants était inhibée lorsqu'on y ajoutait des antiseptiques. Les différentes tentatives d'isolement de bactéries restèrent longtemps vaines. Ce n'est qu'en 1948 que SIJPESTEIJN (79) isola les principales bactéries responsables de la cellulolyse.

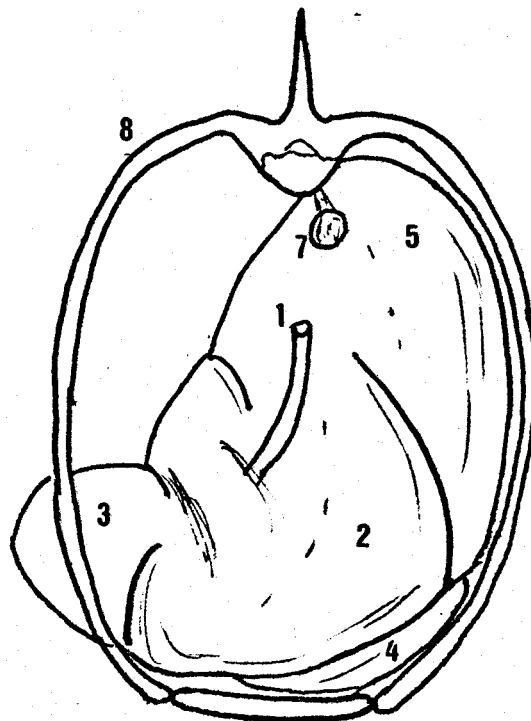
Depuis, de nombreux travaux ont permis d'établir un inventaire des différentes espèces bactériennes présentes dans le rumen ainsi que les relations existant entre ces microorganismes et l'animal hôte.

COTE DROIT



LEGENDE :

- 1 Oesophage
- 2 Reticulum
- 3 Omasum
- 4 Obomasum
- 5 Rumin dorsal
- 6 Pylore
- 7 Trachée artère
- 8 6ème côte



VUE ANTERIEURE DE L'ESTOMAC DE BOEUF IN SITU

D'APRES FROMENTIN 1952



b) La Symbiose

La présence de cette flore et faune dans l'estomac des ruminants et des non ruminants, fait intervenir la notion de Symbiose. Les relations d'interdépendance entre l'animal hôte et les microorganismes ont été définies par HUNGATE (48). Avec lui, nous pouvons distinguer deux types de symbiose.

La première est celle qui existe entre la population microbienne totale et l'hôte. La régulation des conditions écologiques nécessaires à la survie des microorganismes est assurée uniquement par l'animal hôte. Ces conditions écologiques sont chez le boeuf :

- un ph voisin de 6,8. La régulation de l'acidité du rumen est assurée par le pouvoir tampon de la salive ainsi que par l'absorption au niveau de la paroi de la panse, des acides formés.

- une atmosphère dépourvue d'oxygène. L'anaérobiose est préservée par les différents sphincters oesophagiens du larynx, du diaphragme et du cardia.

- une température constante de 39° faisant intervenir la thermo-régulation de l'animal.

Ces relations d'interdépendance nécessaires aussi bien à l'animal qu'aux microorganismes se poursuivent à un autre niveau. En effet, il faut aussi noter une symbiose entre les différentes espèces bactériennes. Certaines dépendent d'autres bactéries pour leurs nutriments primaires tels que sucres ou facteurs de croissance (vitamines, acides gras volatils...).

c) La microbiologie du rumen

De nombreuses tentatives d'étude et d'isolement des microorganismes du rumen ont été réalisées. Ce n'est que vers 1950 que ces recherches

ont été couronnées de succès. Devant l'ampleur de ce travail, il a fallu définir certains critères permettant d'établir l'appartenance d'une souche ou d'une espèce à la flore authentique et permanente du rumen.

DOETSCH et ROBINSON (20) ont proposé les critères suivants :

- Critère numérique : L'organisme isolé doit avoir une bonne croissance dans le rumen.

- Critère écologique : Il faut vérifier s'il y a correspondance entre les exigences de l'organisme et les conditions de vie dans le rumen.

En observant au microscope une goutte de liquide de rumen, nous apercevons une multitude de formes aussi bien chez les protozoaires, que chez les bactéries. Devant l'importance de cette faune et flore, nous nous limiterons à citer les grands groupes de microorganismes. Nous réserverons le chapitre suivant à l'étude plus approfondie des bactéries cellulolytiques du rumen.

1. Les bactéries

Au lieu d'une classification suivant le type morphologique des espèces, les bactéries du rumen ont été rangées suivant leur critère biochimique.

L'alimentation des ruminants est essentiellement composée d'herbe, de paille et de fourrage. Ces matières contiennent une forte proportion de cellulose, de l'amidon et peu de protéines. Au niveau des espèces bactériennes nous retrouvons cette distribution.

C'est ainsi que les bactéries cellulolytiques sont très nombreuses (environ 90 % de la population bactérienne). A côté de celles-ci, nous notons la présence de quelques souches amylolytiques (Streptococcus bovis, Bactéroïdes amylophilus, Bactéroïdes ruminicola, Selenomonas ruminantium...) et peu de bactéries protéolytiques. D'autres espèces utilisent les produits de dégradation libérés ainsi que les différents

métabolites produits. Parmi celles-ci citons :

- . les bactéries utilisant des sucres : Lactobacillus lactis,
Lactobacillus brevis...
- . les bactéries utilisant les acides : genre Selenomonas
- . les bactéries lipolytiques : Anaerovibrio lipolytica
- . les bactéries méthanogéniques : Methanobactérium ruminantium

2. Les protozoaires

La plupart des protozoaires du rumen sont ciliés. Cependant quelques espèces de petits flagellés sont régulièrement observées.

On distingue deux grands groupes de ciliés : les Holotriches et les Entodiniomorphes.

Parmi les Holotriches nous trouvons Isotricha prostoma et Dasytricha ruminantium.

Les Entodiniomorphe peuvent être classés en quatre sous-groupes :

- . les Entodinium : Entodinium caudatum
- . les Diplodinium : Diplodinium neglectum
- . les Epidinium : Epidinium ecaudatum
- . les Ophryoscolex

Différents travaux (CLEVELAND 1926, AKKADA (1) 1963) montrèrent que certains Entodiniomorphes sont capables de digérer la cellulose. Cependant leur activité est pratiquement négligeable devant celle des bactéries cellulolytiques. De plus, les tentatives de culture des protozoaires du rumen ont montré que leur taux de survie est pratiquement nul après 8 heures de culture "in vitro". De ce fait, nous nous limiteront dans l'étude de l'activité cellulolytique du rumen à celle des bactéries dégradant la cellulose.

II. LES BACTERIES CELLULOLYTIQUES

a) Généralités

Pendant de nombreuses années, la culture des bactéries cellulolytiques du rumen a été vouée à l'échec. Aucune formule de milieu de culture ne savait reproduire les conditions de celui-ci. Ce n'est qu'après l'incorporation de liquide de rumen dans les milieux que l'on a pu les isoler.

Les bactéries cellulolytiques sont des bactéries anaérobies strictes, se développant à un ph légèrement acide compris entre 5,5 et 7 et à une température voisine de 39°. Leur nombre varie entre 10^6 et 10^8 par millilitre et ceci suivant les conditions utilisées pour le dénombrement. Elles montrent une vaste dispersion géographique (Europe, Afrique du Sud, Etats Unis) ainsi qu'une large possibilité d'adaptation à des espèces de ruminants et non ruminants (porc et lapin, HALL (35) 1952).

Selon leur morphologie, elles sont classées en deux grands groupes les formes bacillaires et les cocci.

b) Les formes bacillaires

Trois bactéries sont abondantes. Ce sont Bactéroides succinogenes, Butyrivibrio fibrisolvens et Clostridium lochheadii. Les autres espèces sont plus rarement trouvées.

- Bacteroides succinogenes

Isolée en 1947 par HUNGATE (45), on la trouve en grande quantité dans le rumen ($0,5 \cdot 10^8$ bactéries par ml).

C'est une cellule gram négatif de 0,3 à 0,4 μ de diamètre et de 1 à 2 μ de long.

- Butyrivibrio fibrisolvens (HUNGATE (46) 1950, BRYANT et SMALL (10) 1956)

La forme des cellules varie suivant l'espèce. Le diamètre est de 0,4 à 0,8 μ et la longueur est comprise entre 1,5 à 3 μ .

Les cellules sont gram négatif et possèdent un flagelle polaire mobile.

- Clostridium lochheadii

Découverte en 1957 par HUNGATE (47), la cellule végétative est gram positif. Elle mesure 0,7 μ sur 7 μ tandis que la forme clostridiale de 1,2 à 1,7 μ sur 7 μ , et la spore 1 - 1,5 x 2 à 3 μ . Cette bactérie attaque très rapidement la cellulose.

- Clostridium longisporum HUNGATE (47) 1957

Donne des colonies colorées en orange.

Les cellules végétatives, gram positif, sont très longues : 1 μ x 7 à 15 μ . La forme clostridiale mesure de 2 à 3 μ de diamètre et les spores de 1 μ x 3 à 6 μ . Les cellules possèdent des cils péritriches.

- Cillobacterium cellulosolvens BRYANT (11) 1958

Ce batonnet, gram positif, possède des cils péritriches.

Il produit de l'acide lactique.

- Acetigenic rod

Cellule incurvée digérant lentement mais complètement la cellulose.

- Cellulomonos fini

Isolé au Japon par HIGUCHI (41) en 1962. Ce microorganisme semblerait jouer un rôle dans la digestion de la cellule.

c) Les cocci cellulolytiques

Ces bactéries identifiées au microscope par HENNEBERG en 1922 constituent un très grand groupe : 84 % des bactéries cellulolytiques (KISTNER, 54, 1964).

- Ruminococcus flavefaciens SIJPESTEIJN (80) 1951 et HUNGATE (47) 1957

Ces cellules de 0,8 à 0,9 μ de diamètre forment de courtes chaînes et sont gram positif. Lorsqu'on les cultive sur un milieu cellulosé, il y a production d'un pigment jaune.

- Ruminococcus albus HUNGATE (47) 1957

Ces cellules produisent des colonies blanches. Elles sont isolées ou par 2. Leur taille est d'environ 0,8 à 2 μ de diamètre. Leur coloration de gram est plutôt négative.

Les Ruminococci sont tués par l'oxygène. La digestion de la cellulose est rapide avec la plupart des espèces cependant avec certaines variétés, elle est parfois difficilement perceptible.

Source carbonée	R. FLAVEFACIENS	R. ALBUS	B. SUCCINOGENES	Bv. FIBRISOLVENS	C. LOCHHEADII	C. LONGISPORUM
Xylose	-	- +	-	+	-	-
Arabinose	-	- +	-	+	-	-
Glucose	- +	- +	+	+	+	+
Fructose	-	- +	-	+	+	+
Galactose	-	-	-	+	-	+
Saccharose	- +	- +	-	+	+	+
Lactose	- +	- +	+	+	-	+
Maltose	-	- +	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Amidon	-	-	+	+	+	-
Xylan	+	+	-	+	-	-
Cellulose	+	+	+	- +	+	+
Mannitol	-	-	-	-	+	- +
Salicine	-	- +	-	+	+	+
Esculine	- +	-	-	+	-	+

Fermentation des substrats carbonés par les bactéries cellulolytiques. D'après GIESECKE (28)

+ : fermente le sucre
 - : ne fermente pas le sucre



Espèces	CO ₂ / HCO ₃ ⁻	Acétate	Acides gras volatils	NH ₄ ⁺	Acides Aminés
Bacteroides succinogenes	E	-	E	E	-
Butyvirbio fibrisolvens	+ -	+ -	E -	E -	E -
Clostridium lochheadii	+		-		
Ruminococcus flavefaciens	E	+	E -	E -	E +
Ruminococcus albus	E	+ -	E	E	+

Besoins des différentes espèces cellulolytiques. D'après GIESECKE (28)

Légende : E essentiel pour la croissance
 E + essentiel et stimule la croissance
 E - essentiel ou non
 + stimule la croissance
 + stimule ou non la croissance
 - non nécessaire pour la croissance



III. LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES

a) Généralités

En 1886, BARY nota que la moisissure Periza sclerotium sécrétait des enzymes qui dissolvaient la cellulose. Deux ans plus tard, MARSHALL-WARD observe que le tissu macéré de la moisissure Botrytis a une forte activité de décomposition envers la cellulose. Cependant, ce n'est qu'en 1906 que SEILLIERE démontra une action lente du jus hépatopancréatique d'escargot sur la cellulose native et une action plus rapide sur la cellulose régénérée.

Les principaux organismes producteurs d'enzymes cellulolytiques sont surtout des bactéries et des moisissures. Une partie de ceux-ci est répertoriée dans l'ouvrage de J.A. et M.M. GASCOIGNE (27).

Le tableau 1 rassemble les principaux microorganismes cellulolytiques ; nous nous apercevons que la répartition de ceux-ci est très vaste dans le monde vivant.

Les cellulases ou β - 1,4 - glucan 4 - glucanohydrolases (E. C. 3. 2. 1. 4.) produites par les microorganismes sont utilisées de 3 façons :

- 1) Comme agents morphogéniques qui lysent les parois cellulolytiques des cellules : exemple : cellulases de plantes, de champignons.
- 2) Comme agents d'invasion : permettent la pénétration d'un microorganisme pathogène dans une plante hôte.
- 3) Comme agents de digestion de la cellulose pour son utilisation comme source de carbone.

CHAMPIGNONS

Basidiomycètes

Irpex lacteus
Merulius lacrymans
Polyporus versicolor
Polyporus sulfureus

Ascomycètes

Chaetomium globosum
Chaetomium indicum
Neurospora crassa

Phycomycètes

Saprolegnia

Champignons imparfaits

Myrothecium verrucaria
Trichoderma viride
Aspergillus niger

EUBACTERIALES

Non sporulées

Cellvibrio fulvus
Ruminococcus
Bacteroides

Sporulées

Clostridium

MYCOBACTERIALES

Myxobactériales

Sporocytophaga
Cytophaga

Actinomycétales

Streptomyces
Cellulomonas
Micromonospora

Tableau 1 Principaux microorganismes cellulolytiques

b) Mécanisme d'action des cellulases

Ce n'est que depuis une vingtaine d'années que d'importants travaux sont poursuivis, surtout à l'étranger, en vue d'élucider le mécanisme de la cellulolyse. Cependant, malgré les efforts fournis en ce sens, le processus reste encore mal connu.

Trois grands problèmes, dont un seul est actuellement résolu dominant l'ensemble des recherches :

- Théorie oxydative ou hydrolytique de la dégradation de la cellulose,
- Multiplicité ou unicité enzymatique,
- Attaque de la cellulose en bout de chaînes ou au "hasard".

1. Théorie oxydative ou hydrolytique

Alors qu'au début de l'étude de l'action des cellulases on interprétait leur action comme une dégradation oxydative, il est maintenant prouvé que nous avons à faire à une hydrolyse de la cellulose. WOODMAN et STUART démontrèrent la présence de glucose après dégradation.

2. Multiplicité ou unicité enzymatique

Les études de Myrothecium verrucaria effectuées par WHITAKER et coll. (90, 91) sont à l'origine d'une vive controverse quant au mécanisme de l'attaque cellulolytique et au nombre des enzymes impliqués dans la dégradation. Ils réussissent en effet, à isoler une enzyme unique qui s'est révélée homogène par électrophorèse et ultrafiltration et suggèrent l'hypothèse d'une cellulase unique, responsable

de l'hydrolyse des substrats celluloses.

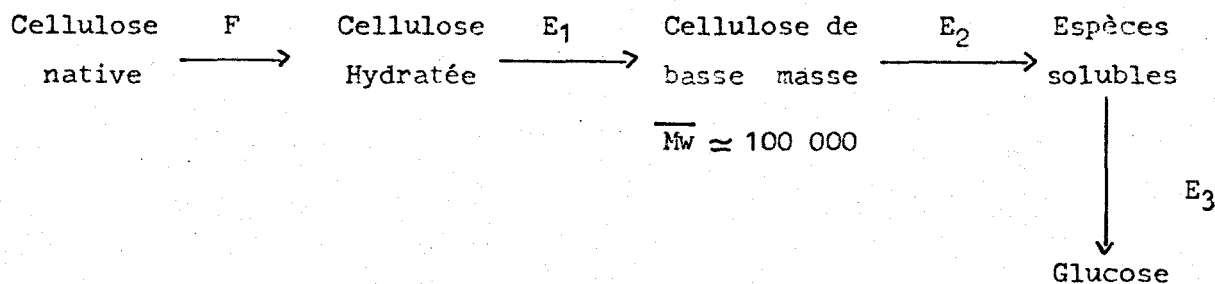
Cette théorie de l'unicité des cellulases s'oppose aux résultats de nombreux travaux qui ont abouti à vérifier la présence de plusieurs cellulases dans les filtrats de culture de ce même *Myrothecium verrucaria*. Les auteurs ont alors suggéré que cette apparente multiplicité des cellulases serait dû, en réalité à une formation de complexes entre l'enzyme unique et plusieurs polysaccharides différents.

Néanmoins, la pluralité des cellulases semble être, à l'heure actuelle bien établie. REESE (74) se base sur le fait que les possibilités d'hydrolyse par les microorganismes, de celluloses modifiées solubles (exemple : carboxyméthyl cellulose) sont plus étendues que lors de la dégradation de la cellulose native, comme le coton, pour admettre l'existence de plusieurs enzymes impliquées dans la cellulolyse comme l'indique la figure 1.

Sans adopter une telle multiplicité, la plupart des chercheurs admettent au moins la présence de deux enzymes. Selon SELBY (77) il y aurait :

- une enzyme A, labile, nécessaire à la dégradation du coton absorbé fortement par celui-ci mais désorbé par les alcalis ou une solution d'un dérivé cellulosique.

- une enzyme B stable agissant sur les dérivés de la cellulose et ne dégradant le coton que de façon limitée. MERLE (66) de son côté propose le schéma suivant :



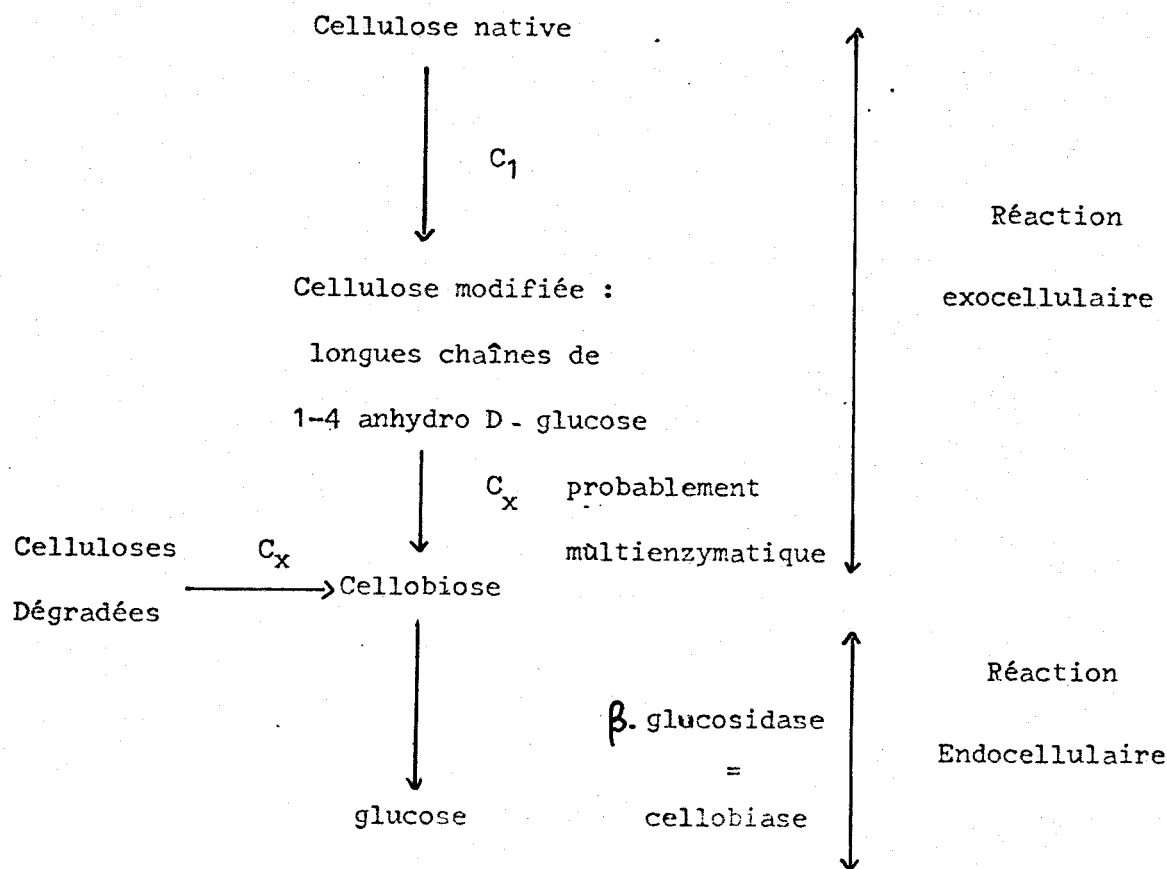


Figure 1 : Mécanisme de dégradation de la cellulose.

D'après REESE (74)



F : serait un facteur de gonflement de la cellulose et provoquerait la désorganisation des zones cristallines

E₁ : transformerait la cellulose haute masse en cellulose basse masse. E₁ serait analogue au facteur C₁ de REESE

E₂ : cette enzyme modifie les celluloses basses masses en espèces solubles

E₃ : transforme les espèces solubles en glucose

Les nombreux mécanismes de dégradation de la cellulose proposés par les auteurs montrent bien la complexité de ce sujet et les données actuelles du problème n'ont pas varié malgré les études plus poussées entreprises.

3. Attaque de la cellulose en bout de chaîne ou au hasard

Certains auteurs admettent une attaque de la cellulose en bout des chaînes moléculaires avec libération des cellobioses, tandis que WHITAKER (90) travaillant sur des cellodextrines conclut à une coupure au hasard le long de la chaîne.

D'autres auteurs comme SELBY (77) penchent pour une solution moyenne, les deux modes d'attaque ayant lieu simultanément en des régions très localisées.

D'autre part, le mode de coupure des molécules de cellulose est également sujet à controverses : selon A. S. PERLIN certaines endo-glucosanasés ne sont pas spécifiques de la liaison β 1 \rightarrow 4 mais du groupe-ment réducteur libéré, ce qu'il a pu montrer en utilisant différents substrats possédant en particulier des liaisons β 1 \rightarrow 3 et β 1 \rightarrow 4 alternées.

Ainsi ces divers problèmes restent très controversés et sont encore mal connus.

c) Importance industrielle des cellulases

Les recherches fondamentales entreprises sur les cellulases ont permis l'application de certains résultats à des domaines divers tels que la physiologie végétale, l'agronomie, la pharmacie et les industries de fermentation, d'alimentation, des textiles, du papier, etc...

Nous pouvons distinguer deux aspects dans la recherche appliquée sur la dégradation biologique de la cellulose :

- 1) la préservation des matériaux cellulosiques
- 2) utilisation en tant que source d'énergie

1. Préservation des matériaux cellulosiques

Chaque année, des pertes importantes, dues aux microorganismes cellulolytiques sont constatées, aussi bien sur la plante elle-même, que sur les matériaux cellulosiques commerciaux, tels que le bois de construction, le papier ou les textiles. Pour lutter contre cette destruction, différentes méthodes sont utilisées :

- Modification de la molécule de cellulose

Divers procédés préconisent d'enduire les matériaux cellulosiques d'une couche de cire, d'huile ou de gomme afin d'en retarder l'attaque biologique. Les peintures et les vernis ne peuvent être considérés comme protecteurs que s'ils contiennent des agents toxiques.

- Agents toxiques

Une liste très longue de composés considérés comme inhibiteurs des cellulases a été établie. Cependant, le choix des inhibiteurs reste encore empirique car il dépend du substrat et de l'état dans lequel il se trouve.

2. Utilisation des cellulases comme source d'énergie

Le Japon est un important producteur de cellulases. Celles-ci servent à différentes applications comme la "saccharification des déchets cellulosiques, la dégradation des aliments crus, l'alimentation aussi animale qu'humaine.

- "Saccharification" des déchets cellulosiques

Ce terme impropre est surtout utilisé en industrie. Il représente la transformation des résidus cellulosiques en produits solubles (cellobiose, glucose...)

La fermentation des substances naturelles, dans le but d'obtenir des solutions sucrées, des solvants, des antibiotiques ou même certains gaz, est très répandue. Les déchets de bois et résidus agricoles (pailles, cosses d'arachides, rafles de maïs...) pourraient être "saccharifiés".

La saccharification par les acides concentrés exigeant une trop grande dépense d'énergie et posant des problèmes techniques, ne peut entrer en compétition avec la dégradation par les cellulases. Aux Etats-Unis, les déchets cellulosiques (journaux) sont convertis en glucose selon le schéma représenté par la figure 2

Cependant plusieurs difficultés apparaissent :

- lors de l'hydrolyse de la cellulose, le glucose libéré est un facteur limitant et freine une dégradation poussée. Par ailleurs, une grande partie du glucose libéré est consommé par le mycelium pour assurer ses besoins en carbone.

- de plus, certains déchets tels que la sciure et les cosses de riz sont très peu dégradées. Aussi faut-il parfois associer un traitement préalable aux acides et aux alcalis.

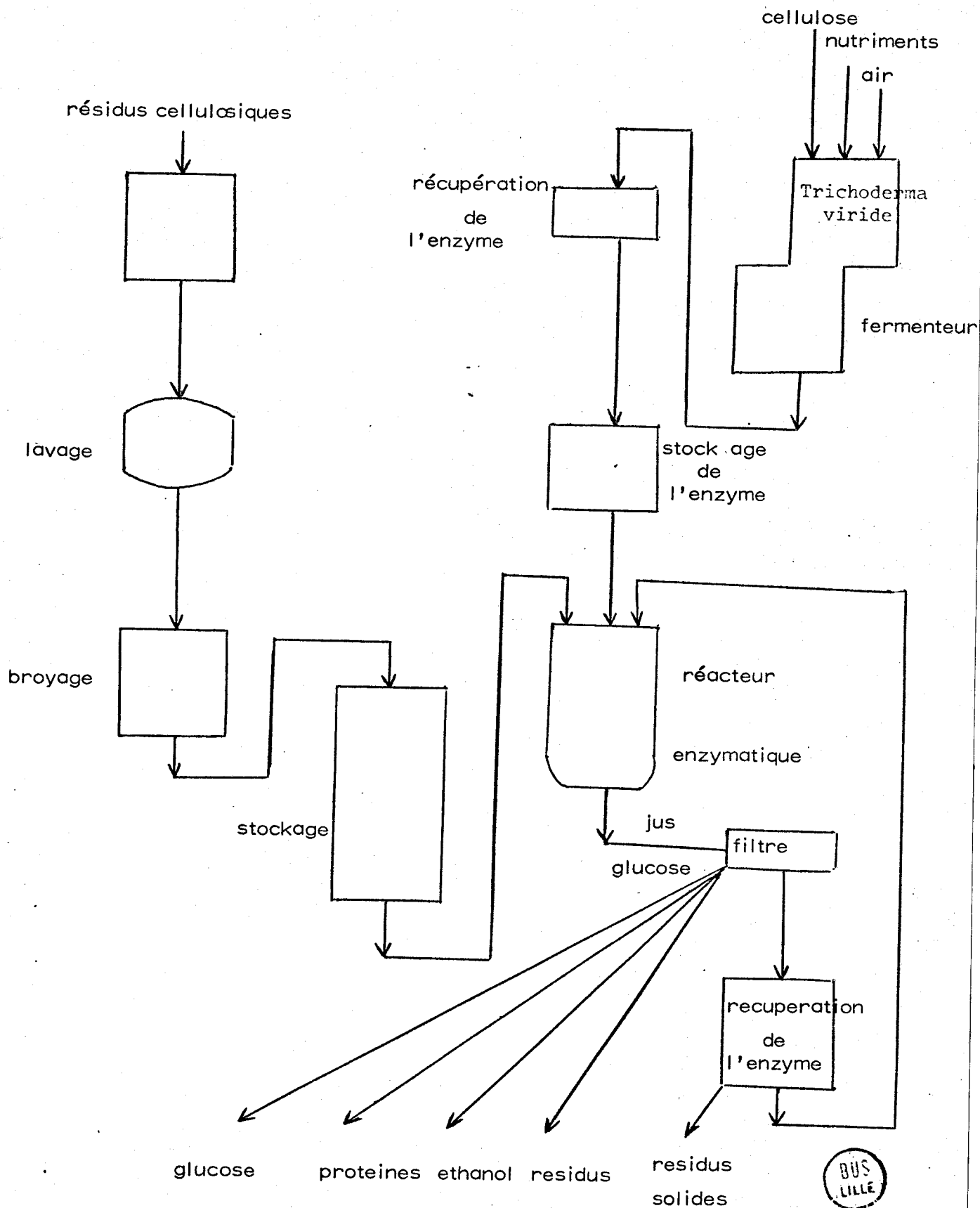


Fig.2: Conversion des déchets cellulosiques en glucose par les cellulases de *Trichoderma viride*. D'après Chemical et Engineering News. Mai 1974.

Comme l'attaque de la cellulose par les cellulases est peu significative, l'attaque directe par les microorganismes est plus généralement envisagée. Le mycelium récolté peut être utilisé comme complément dans la nourriture de la volaille, tandis que les solutions sucrées provenant de la saccharification servent de milieu de culture pour les levures.

- Dégradation des aliments crus

Les enzymes purifiés agissent sur toute sorte de plante en détruisant les parois cellulaires, provoquant ainsi un ramollissement permettant :

- . la préparation de protoplastes pouvant ainsi permettre la fusion de 2 plantes différentes incapables de s'hybrider naturellement.

- . un accroissement du taux d'extraction de certaines substances comme les protéines, l'amidon, les médicaments, les huiles, les jus de fruits et l'agar-agar à partir des algues.

- . une mise en conserve des carottes

- . un épluchage enzymatique des oranges

- Les cellulases dans la digestion animale et humaine

L'inclusion de cellulases dans la nourriture des volailles et des souris, donne un accroissement marqué du poids et une meilleure utilisation de la cellulose.

D'autre part, les cellulases digèrent la paroi des levures qui sont ensuite assimilées par les animaux.

De même chez l'homme des cellulases sous forme de plaquettes sont administrées dans les cas d'insuffisance pancréatique.

IV. L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE "IN VITRO" DU RUMEN

Nous avons vu précédemment que les aliments et en particulier la cellulose étaient dégradés par les bactéries du rumen. Cette dégradation est très intense.

Plusieurs auteurs ont essayé d'étudier l'activité cellulolytique "in vitro". HALLIWELL (37) en 1957, entreprit de déterminer les conditions optimales pour doser de façon correcte et reproductible l'hydrolyse de la cellulose par les microorganismes du rumen.

Les résultats obtenus varient suivant la technique utilisée par les auteurs. De ce fait, nous décrivons notre méthode d'étude de l'activité cellulolytique avant de commenter les différents facteurs l'influencent.

A. MATERIEL ET METHODES

1) Le prélèvement du liquide du rumen

Différentes méthodes ont été proposées pour prélever du liquide de rumen. Celui-ci est recueilli soit à partir d'animaux vivants (utilisation de fistule ou sonde stomacale) soit à partir d'animaux tués.

Nos prélèvements ont été effectués aux abattoirs de la ville de Lille. Nous avons travaillé sur le rumen de boeuf ou de vache et nous avons opéré de la façon suivante :

L'animal est tué puis dépecé. L'appareil digestif est mené par un tapis roulant jusqu'à une salle appelée "coche". Là, le rumen est vidé du liquide et des débris végétaux puis nettoyé. C'est à ce moment que nous effectuons les prélèvements.

Avant toute prise de liquide de rumen, nous devons nous assurer de deux choses. La première est que le rumen ne soit pas perforé par un coup de couteau lors du dépeçage. Ceci doit être observé avec soin. En effet, si l'anaérobiose n'est pas conservée dans le rumen, les bactéries cellulolytiques sont tuées par l'oxygène de l'air. La seconde précaution concerne le contenu de la panse. En général, les animaux ne sont pas alimentés en eau et nourriture pendant les heures précédant l'abattage. De ce fait, la phase liquide du rumen (80 à 90 % du contenu d'une panse en temps normal) risque d'être trop peu abondante et ainsi de ne pas permettre un prélèvement suffisant. Cela est vérifié en tâtant le rumen.

Quand ces deux conditions sont remplies, la paroi du rumen est entaillée sur une longueur de 4 à 5 centimètres. L'ouverture d'un bocal de conserve (1,5 à 2 litres), rempli de gaz carbonique, est placée contre l'entaille de manière à recueillir le liquide et les débris végétaux. Une fois rempli, le bocal est rapidement fermé.

Le prélèvement doit être effectué rapidement et en une seule opération de façon à éviter le plus possible tout contact avec l'oxygène de l'air. De plus, il est préférable de ne faire qu'un seul prélèvement par panse.

Cette technique utilisée pour recueillir le liquide de rumen pose le problème du site de l'échantillonnage. En effet, le rumen est partiellement cloisonné par des piliers musculaires. Ainsi le brassage interne des aliments ne permet pas d'avoir un contenu parfaitement homogène. A ce propos HUNGATE (48) note que "le mélange dû aux contractions du rumen est insuffisant pour contrarier les facteurs responsables de la stratification des ingesta et des différences mesurables dans les contenus de rumen prélevés à divers emplacements ont été démontrées". Cependant, avant tous nos prélèvements, le rumen est agité plusieurs fois. Nous pouvons espérer ainsi une homogénéisation suffisante de son contenu et obtenir ainsi des échantillons représentatifs de la flore du rumen.

Par rapport au prélèvement sur animal vivant, cette technique n'offre pas les mêmes avantages. Par fistulation ou tubage stomacal, il est possible d'opérer sur le même animal sans préjudice pour son équilibre physiologique. De plus, il est possible de modifier son alimentation ainsi que de l'abreuver avant les prélèvements ; la nature des aliments joue un rôle important sur l'évolution des flores dans le rumen. Autre avantage de la sonde stomacale, il est possible d'effectuer de nombreux prélèvements journaliers ou hebdomadaires de liquide de rumen. Aux abattoirs, par contre, deux jours par semaine sont réservés à l'abattage des bovins.

Malgré ces désavantages, la technique de prélèvement sur animal tué nous a permis d'étudier dans de bonnes conditions l'activité cellulolytique "in vitro" du rumen.

2) Dosage de l'activité cellulolytique

a - Principe

Le liquide de rumen est filtré à l'abri de l'air sur six épaisseurs de gaze chirurgicale de façon à éliminer les plus grosses particules d'ingesta.

50 milligrammes de poudre de cellulose sont introduits dans un tube de 150 x 15 mm fermant hermétiquement. On y ajoute 5 ml d'une solution tampon de bicarbonate de sodium et de sels, saturée en CO₂. Avant et après addition de ce tampon, on purge le tube d'air par un faible courant de gaz carbonique pendant une dizaine de secondes de façon à assurer une anaérobiose la plus totale possible. On ensemence alors par 2 ml du filtrat de liquide de rumen. L'incubation se fait à 37° pendant 48 heures.

b - Dosage de la cellulose résiduelle

Du fait de l'insolubilité de la cellulose dans les milieux

aqueux, le dosage de la cellulose est assez délicat. Plusieurs auteurs ont essayé de mettre au point une technique permettant d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles.

BOMAR et SCHMID (3) proposent de suivre la dégradation bactérienne de la cellulose par la production de CO_2 dans les cultures. Ces auteurs réussissent à établir une bonne corrélation entre ces deux paramètres. D'autres méthodes se basent sur la solubilité de la cellulose dans différents solvants : EDWARDS (23) propose le mélange triéthylène-glycol-HCL. Cette réaction s'effectue à 121° SOUTHGATE (84) VAN SOEST (87) utilisent de l'acide sulfurique 12 N à 140° pendant 10 minutes. MORRISON (65) préconise le mélange de bromure d'acétyl dans l'acide acétique.

Les méthodes chimiques dosant les sucres réducteurs ou les sucres totaux solubles ne peuvent être appliquées lors de l'étude de l'activité cellulolytique des bactéries du rumen. En effet, les produits de dégradation de la cellulose sont aussitôt utilisés par les microorganismes.

Le dosage de la cellulose se fait le plus couramment par gravimétrie. Plusieurs techniques ont été proposées. Parmi leur nombre, deux se sont imposées à notre choix par leur simplicité et leur relative précision. Ce sont celles de CRAMPTON et MAYNARD (18) et HALLIWELL (37).

- Méthode de CRAMPTON et MAYNARD

A une quantité de cellulose comprise entre 10 et 30 mg, on ajoute 5 ml d'acide acétique et 0,5 ml d'acide nitrique. Le mélange est mit à bouillir à reflux pendant 20 minutes. Après refroidissement, on ajoute 5 ml d'éthanol et on centrifuge 10 minutes à 3 000 g. Le culot est lavé par 5 ml de benzène chaud et on centrifuge à nouveau. Après un nouveau lavage par de l'éthanol absolu et chaud, le résidu est mis à sécher à 100° pendant 24 heures puis pesé.

Cette méthode très simple et donnant de bons résultats est cependant assez longue de réalisation et ne permet le dosage que de faibles quantités de cellulose.

- Méthode d'HALLIWELL

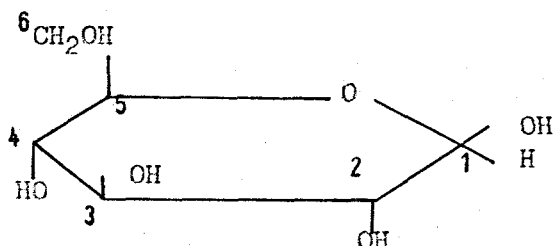
Nous avons utilisé cette technique pour doser le pouvoir cellulolytique des bactéries du rumen. Après incubation, nous dosons la cellulose résiduelle de la façon suivante :

Le contenu des tubes à essais, c'est-à-dire cellulose, tampon, bactéries est filtré sur verre fritté n° 3 (taille des pores : de 15 à 40 μ). Le résidu est lavé successivement par 5 ml d'acide chlorhydrique 3,8 N, 5 ml d'ammoniaque 0,7 N, 5 ml de Teepol XL 1 %. Un lavage par 20 ml d'eau distillée est effectué entre chaque solvant. Le résidu est alors séché à 100° pendant une nuit puis pesé.

Cette technique est très rapide car elle nécessite que peu de manipulation. Elle permet ainsi de réaliser en série un grand nombre de dosages. De plus, l'erreur de mesure commise ne dépasse pas 5 %. Les causes d'erreur sont essentiellement dues aux pesées car des tubes contenant la cellulose et le tampon sauf les microorganismes ne montrent aucune perte de poids en cellulose et ceci même après 7 jours d'incubation à 37°. De plus, en opérant dans les conditions similaires que ci-dessus, aucune croissance microbienne n'a pu être révélée par coloration de Gram.

3) Les substrats cellulosiques

La cellulose, substance blanche, fibreuse est une macromolécule non ramifiée dont les éléments sont des résidus de B. D. glucopyranose



B - D glucopyranose = glucose

Il y a élimination d'une molécule d'eau entre un groupement hydroxyle semi-acétalique du carbone 1 et un groupement hydroxyle alcoolique porté par le carbone 4. La cellule est donc un poly (1 → 4) β - D glucopyranose, de forme brute $(C_6 H_{10} O_5)_n$. Le degré de polymérisation est en moyenne voisin de 3 000. L'étude aux rayons X a montré que la cellulose possède une structure cristalline dont les mailles sont constituées par des groupes cellobiose.

La cellulose n'est jamais obtenue pure, elle contient toujours de la lignine. On l'appelle α cellulose, insoluble dans les alcalis à 8 %. Des procédés de purification ont permis d'obtenir deux autres formes : la β et γ cellulose. La β cellulose est soluble dans les alcalis mais précipite lors d'une acidification. Son degré de polymérisation est d'environ 200. C'est donc une cellulose dégradée de même que la forme γ qui est essentiellement une hémicellulose de degré de polymérisation voisin de 10. Elle est soluble lors de l'acidification.

Les études de l'activité cellulolytique des microorganismes du rumen ont montré des différences suivant la nature du substrat cellulosique.

Différentes formes de cellulose ont donc été utilisées. Ce sont :

- la poudre de cellulose Whatman CC 31 sans cendre pour chromatographie
- la cellulose précipitée
- les fibres de coton traitées ou non
- l'hydrocellulose
- papier filtre Whatman n° 3 moulu
- la cellophane

Ces substrats ont été préparés selon les techniques de HUNGATE 1942 (44), 1950 (46) et SUGDEN 1953 (86).

. La cellulose précipitée est obtenue à partir de poudre de cellulose traitée par H_3PO_4 à 90 %, 2 heures à 4° puis lavée et séchée.

. Les fibres de coton ont été purifiées de la façon suivante : extraction au Soxhlet par de l'ethanol absolu pendant 8 heures, puis par NaOH 1 % sous atmosphère d'azote (8 heures). Après lavage par de l'eau chaude puis froide et de l'acide acétique 1 %, le résidu est séché à l'air.

. A partir des fibres de coton purifiées, on prépare d'hydrocellulose. Pour cela, les fibres sont trempées dans HCl 11 N (75 volumes) pendant 48 heures à 20°. Après ce traitement, elles sont lavées, filtrées sur verre fritté n° 3 et séchées.

La cellophane, dérivé industriel de la cellulose sous forme de xanthate, est vendue dans le commerce.

B. INFLUENCE DE DIFFERENTS PARAMETRES SUR L'ACTIVITE CELLULOLYTIQUE DU RUMEN

Nous nous sommes appliqués à déterminer les paramètres influençant l'activité cellulolytique de la microflore du rumen.

Nous avons étudié la cellulolyse en fonction de la concentration en substrat ainsi que de sa nature, du tampon, du volume d'ensemencement et du temps d'incubation.

La dégradation de la cellulose est exprimée en pourcentage d'hydrolyse (cellulolyse) c'est-à-dire la différence de poids entre la cellulose initiale et la cellulose résiduelle, multipliée par un certain facteur pour obtenir un résultat en pourcentage.

1) Influence du substrat

- Concentration en cellulose

Différents essais ont été réalisés en faisant croître la concentration en poudre de cellulose Whatman. La figure (2) représente les résultats obtenus.

Pour de faibles concentrations en cellulose 20 et 40 mg, le pourcentage de dégradation est très élevé, respectivement de l'ordre de 100 % et 90 %. Ensuite, la courbe décroît de façon exponentielle pour atteindre un palier de 20 % de cellulolyse pour des concentrations supérieures à 300 mg de cellulose et ceci après 48 h d'incubation.

Les expériences suivantes seront réalisées avec 100 mg de cellulose.

- Nature de la cellulose

Suivant la nature de la cellulose, le pourcentage d'hydrolyse du substrat par les bactéries cellulolytiques du rumen varie.

Le tableau (2) résume les différents résultats obtenus après 48 h d'incubation à 39°.

Substrat cellulosique	% de cellulolyse
Fibres de coton non traitées	15
Fibres de coton traitées	32
Poudre de cellulose	72
Papier filtres Whatman	41
Hydrocellulose	59
Cellophane	65

Tableau (2) : Variation de l'activité cellulolytique en fonction de la nature de la cellulose.

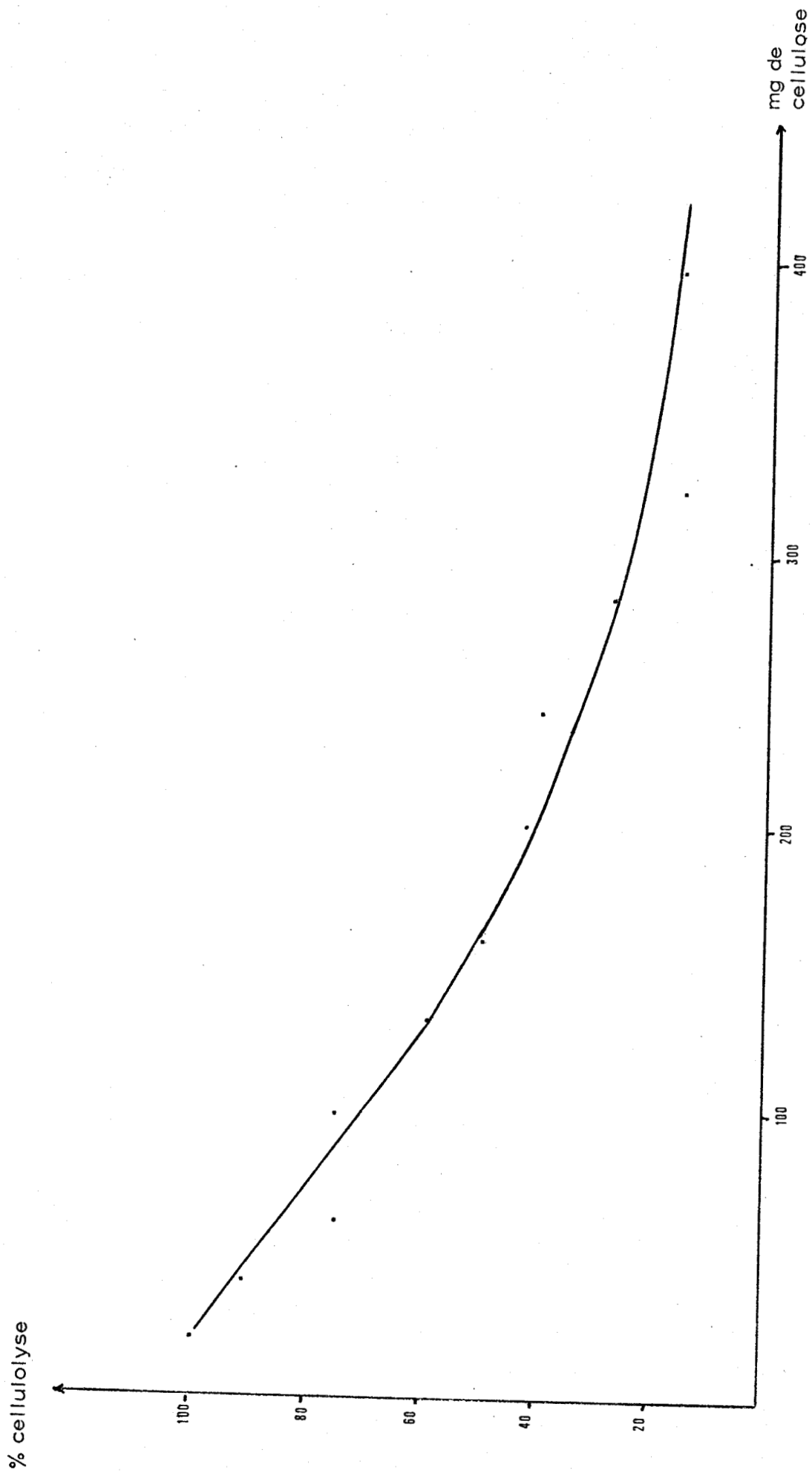


Figure 2 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CELLULOSE



Le pourcentage de cellulolyse est fonction du degré de polymérisation de la cellulose. Nous avons vu que la cellulose est un composé de la forme $(C_6 H_{10} O_5)_n$. Plus la longueur de la chaîne augmente, plus les enchaînements de résidus de cellobiose formant la maille de la cellulose ont tendance à s'associer par des liaisons du type hydrogène et Van der Waals intercaténares. De ce fait, les liaisons covalentes de la molécule ne sont plus accessibles aux enzymes et molécules d'eau capable de les couper.

Ainsi, plus la cellulose est dégradée et hydratée, (genre carboxyméthylcellulose, hydroxy ethyl cellulose...) plus le pourcentage de cellulolyse sera élevé. A l'inverse, une cellulose faiblement ou non hydratée sera beaucoup plus difficilement dégradée. C'est le cas des fibres de coton, papier filtre. Entre ces extrêmes, une cellulose peu dégradée mais fortement hydratée exemple : cellulose précipitée, cellophane..., sera moyennement hydrolysée.

De plus, une cellulose sera plus ou moins dégradée suivant la surface en contact avec les enzymes. KING (50) a montré que le pourcentage de dégradation est une fonction linéaire de la surface de contact de la cellulose. C'est ainsi qu'une poudre de cellulose de très faible granulométrie sera plus fortement dégradée que du papier filtre coupé en petits morceaux bien que la nature de la cellulose soit identique.

2) Influence du Tampon

La solution tampon joue un rôle important dans l'étude de l'activité cellulolytique des bactéries du rumen. En effet, elle doit le plus possible récréer les conditions du rumen (pH, équilibre ionique...)

Nous résumerons les travaux de HALLIWELL (37, 38) concernant la composition et nous étudierons son influence sur la cellulolyse.

- Composition du Tampon

Proposé par ELSDEN (24) en 1949, la composition du Tampon a été revue par HALLIWELL en 1957. Elle est la suivante :

NaHCO ₃	0,2 M	100 ml
KCl	0,154 M	4 ml
KH ₂ PO ₄	0,154 M	1 ml
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,154 M	1 ml
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,154 M	5 ml
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	0,11 M	3 ml

On fait barboter du gaz carbonique jusqu'à complète disparition d'un précipité de phosphate de calcium di calcique CaHPO₄, soluble dans une eau saturée en CO₂. Le pH de ce tampon est alors de 6,8, pH analogue à celui du liquide de rumen.

- Influence des constituants de ce tampon

Les travaux de HALLIWELL ont montré l'effet bénéfique ou maléfique de certains ions de la solution tampon sur la cellulolyse des bactéries du rumen.

Le tableau 3 résume les différents résultats. Nous nous apercevons que le sulfate de magnésium et le phosphate d'ammonium di ammonique sont essentiels pour l'activité cellulolytique. De même, le bicarbonate de sodium et le CO₂ ne peuvent être remplacés par un mélange de KH₂PO₄ + NaOH + azote à pH 6,8. Certains sels (KCl et CaCl₂) semblent n'avoir aucune influence sur la cellulolyse.

Cependant en multipliant par 20 la concentration du chlorure de calcium, l'activité cellulolytique est inhibée. Les ions Ca⁺⁺ à forte concentration chelateraient les enzymes mytiques mais inhiberaient aussi les bactéries.

Tableau 3 EFFET DE LA COMPOSITION DU TAMPON BICARBONATE - CO_2 -
SELS SUR LA CELLULOLYSE DES BACTERIES DU RUMEN.
D'APRES HALLIWELL

	Solubilisation de la cellulose
1 Témoïn : NaHCO_3 - CO_2 + KCl + CaCl_2 + KH_2PO_4 + MgSO_4 + $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	66 %
2 Témoïn sans KCl	66
3 Témoïn sans $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	18
4 Témoïn sans MgSO_4	20
5 NaHCO_3 + MgSO_4 + $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	60
6 NaHCO_3 + MgSO_4	16
7 NaOH + KH_2PO_4 + azote remplaçant : NaHCO_3 - CO_2	0
8 Témoïn + Na_2S 0,03 % concentration finale	66
9 Témoïn + CaCl_2 concentration x 30	0
10 Témoïn + 0,013 M acide acétique concentration finale pH 6,8	69

Méthode de dosage de la solubilisation de la cellulose

- 50 mg de poudre de cellulose
- 7 ml de Tampon
- 1 ml de liquide de rumen filtré

Incubation à 39° pendant 40 h

Dosage de la cellulose solubilisée par gravimétrie

L'addition d'un agent réducteur comme le sulfure de sodium n'est pas indispensable du moment que la solution tampon soit saturée en CO_2 .

- Influence du volume de Tampon

Nous avons étudié la variation de l'activité cellulolytique des bactéries du rumen en fonction du volume de Tampon NaHCO_3 - sels - CO_2 . La concentration en cellulose est de 100 mg par tube. Le volume d'ensemencement est de 2 ml de liquide de rumen fraîchement prélevé.

Le pourcentage de dégradation de la cellulose croit en fonction du volume de Tampon ajouté et ceci jusqu'à 5 ml. Pour cette quantité, nous avons le maximum de cellulolyse (72 %) fig. (3). Passé ce volume, le taux d'hydrolyse chute très rapidement pour être pratiquement nul lorsque la concentration en Tampon est de 20 ml. Ce résultat peut s'expliquer par le phénomène de "dilution". En effet, la cellulose insoluble se dépose dans le fond du tube, tandis que les 2 ml de liquide de rumen sont dilués dans le tampon. De plus, le rapport des volumes ensemencement tampon peut amener certains ions, comme le Ca^{++} (voir précédemment), à être des inhibiteurs de la cellulolyse.

Nous pouvons noter un faible pourcentage de dégradation lors de l'absence du tampon. Les bactéries étant en contact direct avec la cellulose peuvent la dégrader. Cependant certains sels sont indispensables aussi bien à leur survie qu'à leur activité. Ceci explique d'ailleurs la nette augmentation de la dégradation de la cellulose lorsqu'on ajoute 1 ml de Tampon.

Nous avons conservé un volume de 5 ml en Tampon NaHCO_3 - Sels - CO_2 pH 6,8 pour la suite des expériences.

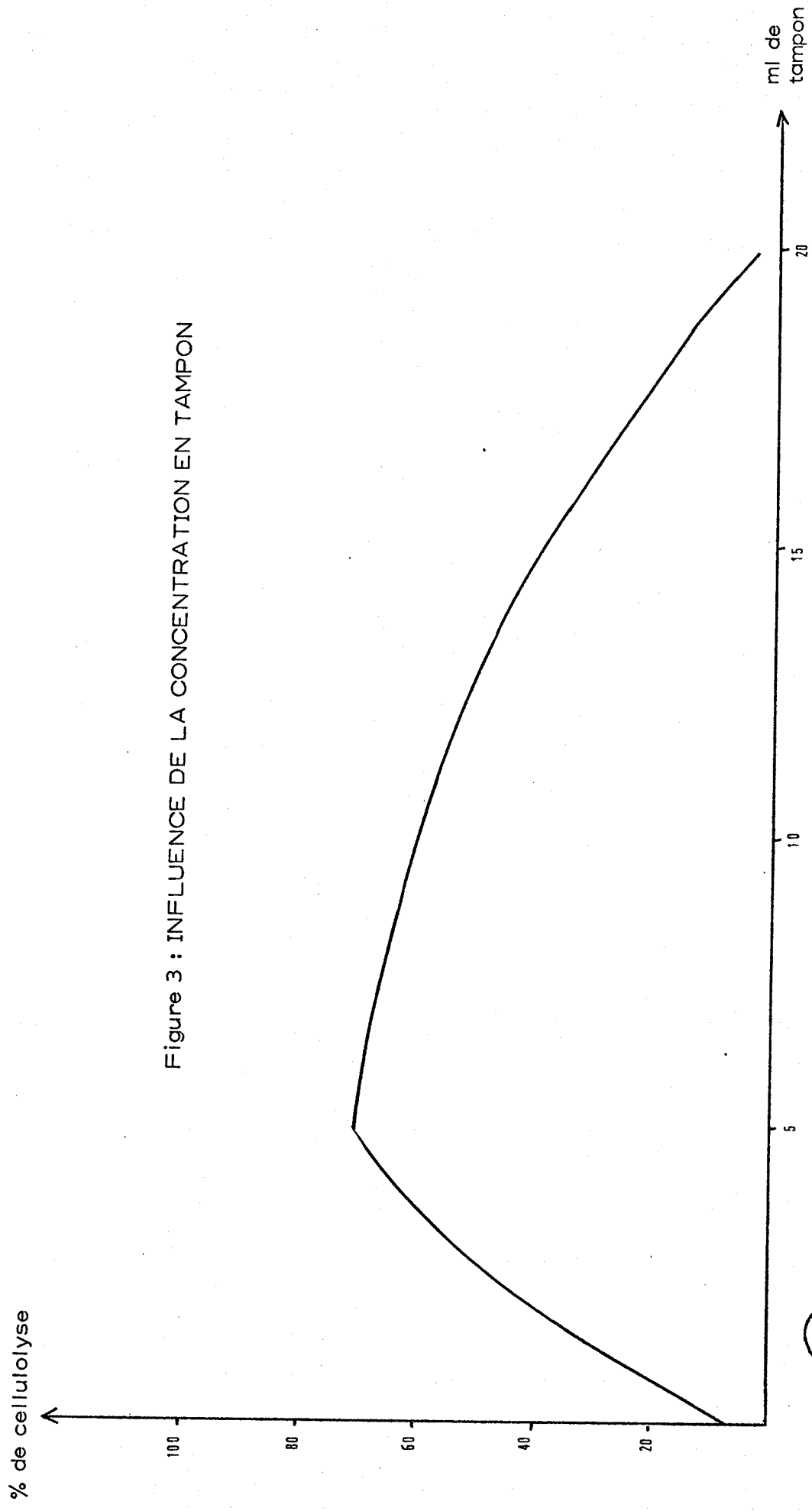


Figure 3 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN TAMPON

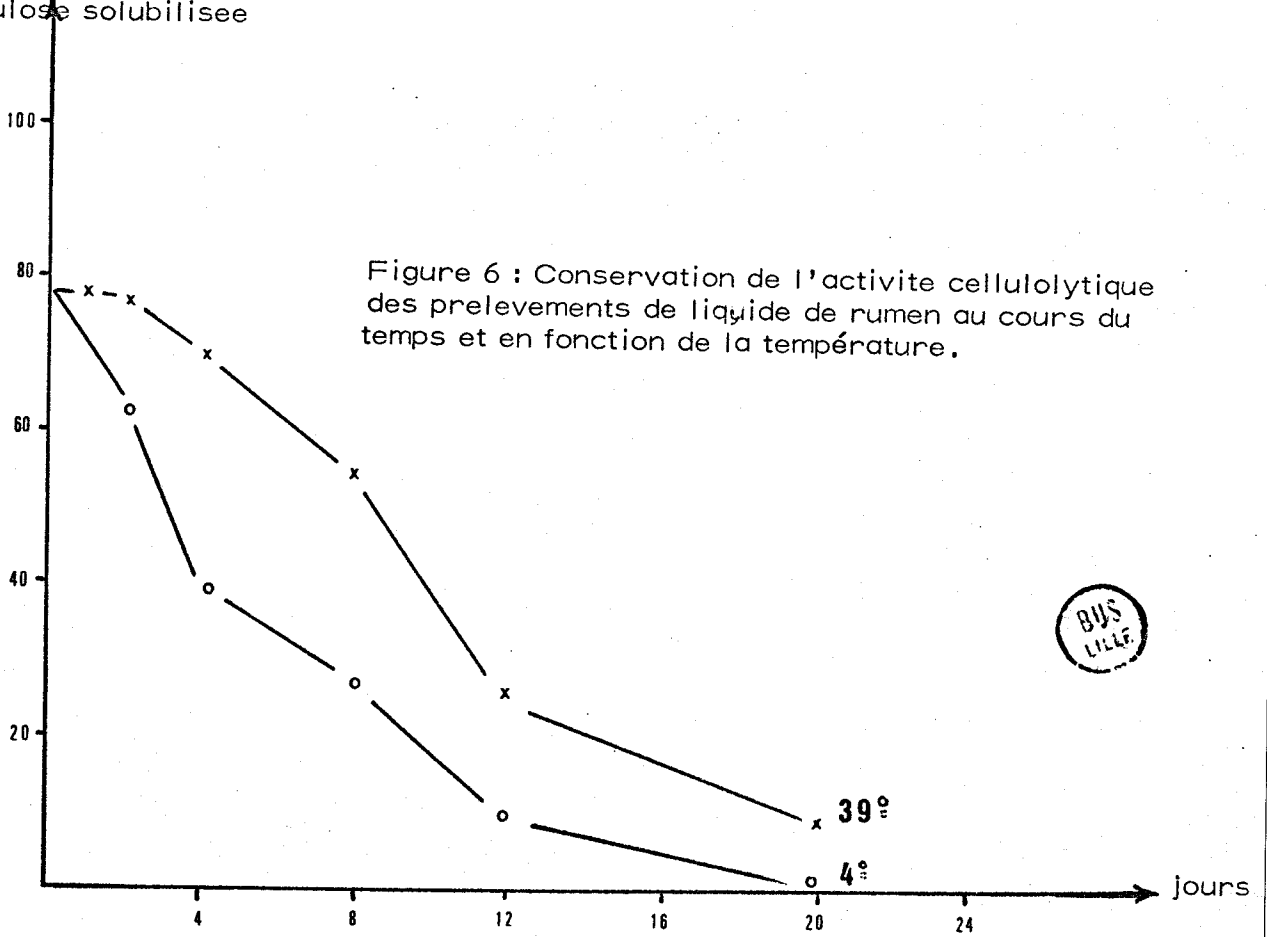
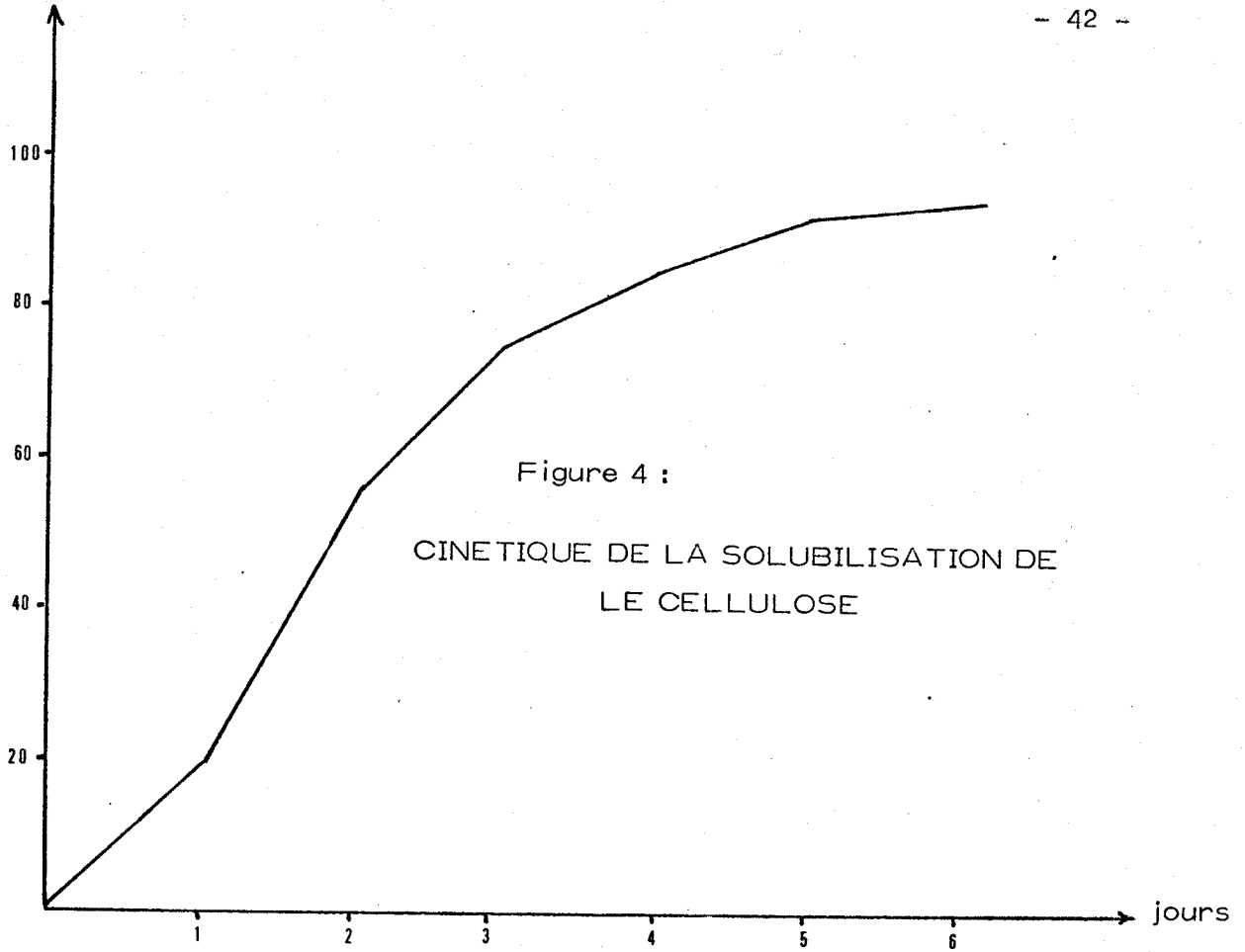


3) Influence du temps d'incubation

La courbe représentant le pourcentage de cellulolyse en fonction du temps d'incubation (fig. 4) nous montre que la vitesse de solubilisation de la cellulose varie. Pendant les premières heures, la cellulolyse est faible, environ 20 % au bout de 24 heures. Ensuite la pente de la courbe augmente rapidement traduisant une forte augmentation de la dégradation : plus de 80 % de cellulose est solubilisée au 4^e jour d'incubation. Pendant les heures suivantes la courbe tend vers une asymptote voisine des 100 %.

La faible activité cellulolytique observée pendant les premières heures semblerait due au temps d'adaptation des bactéries au substrat et de synthèse d'enzymes cellulolytiques. En effet, peu d'auteurs signalent la présence d'enzymes libres dans le liquide de rumen. De plus, le taux de croissance des bactéries anaérobies est très faible. Ce n'est qu'au bout de 2 à 3 jours que le maximum de croissance est atteint. Ces données semblent être en accord avec les résultats obtenus.

Selon HALLIWELL et BRYANT (40), seuls quelques microorganismes seraient capable de solubiliser complètement la cellulose insoluble. Parmi ceux-ci, citons Bactéroides succinogenes 8-85, Ruminococcus flavefaciens PD 1 et Ruminococcus albus D.89. Ces souches ont été isolées à partir du rumen de boeuf. D'autres espèces bactériennes par exemple : R. albus 7 et R. flavefaciens C.94 ne montrent que peu d'activité sur la poudre de cellulose et ceci malgré le temps d'incubation.



4) Influence du liquide de rumen

L'activité cellulolytique varie en fonction du contenu du liquide de rumen. Contrairement à ce que l'on croyait, la quantité et le pourcentage des différentes espèces fluctuent suivant plusieurs facteurs. Ces facteurs concernent la qualité des aliments et la période suivant l'alimentation.

De plus, l'activité cellulolytique d'un prélèvement varie dans le temps.

- Influence de l'alimentation

Le tableau 4 résume les travaux de plusieurs auteurs. Les animaux fistulés ont été soumis à des régimes alimentaires différents. Suivant la nature cellulosique de l'aliment, le pourcentage de cocci varie. Certaines espèces (Bactéroïdes, Clostridium) peuvent être inexistantes. C'est le cas d'animaux nourris de paille plus urée ou de luzerne.

- Influence de l'heure du prélèvement

La fig. 5 nous montre la variation de la population bactérienne au cours du temps. Le nombre de bactéries fluctue suivant l'eau et les aliments apportés à l'animal. Ceci serait dû à une dilution des bactéries par les ingesta (BRYANT et ROBINSON, 8).

- "Vieillissement" du liquide de rumen

Du liquide de rumen a été prélevé suivant la technique décrite précédemment. Plusieurs échantillons sont conservés à 4° et 39°. A différents moments, 2 ml sont prélevés et servent à doser l'activité cellulolytique. Les résultats obtenus sont représentés par la figure 6.

Nourriture	Rumino-coccus %	Bacteroïdes %	Butyri-vibrio %	Autres %	Auteurs
Foin + herbe	26,8	0,3	39,5	33,4	HUNGATE 1957
Luzerne	84	0	16	0	KISTNER 1962
Trèfle	29	0	67	4	GILCHRIST 1962
Paille + urée	95	0	5	0	VAN GYLSWYK 1968

Tableau 4 Influence de la nourriture sur les bactéries cellulolytiques.

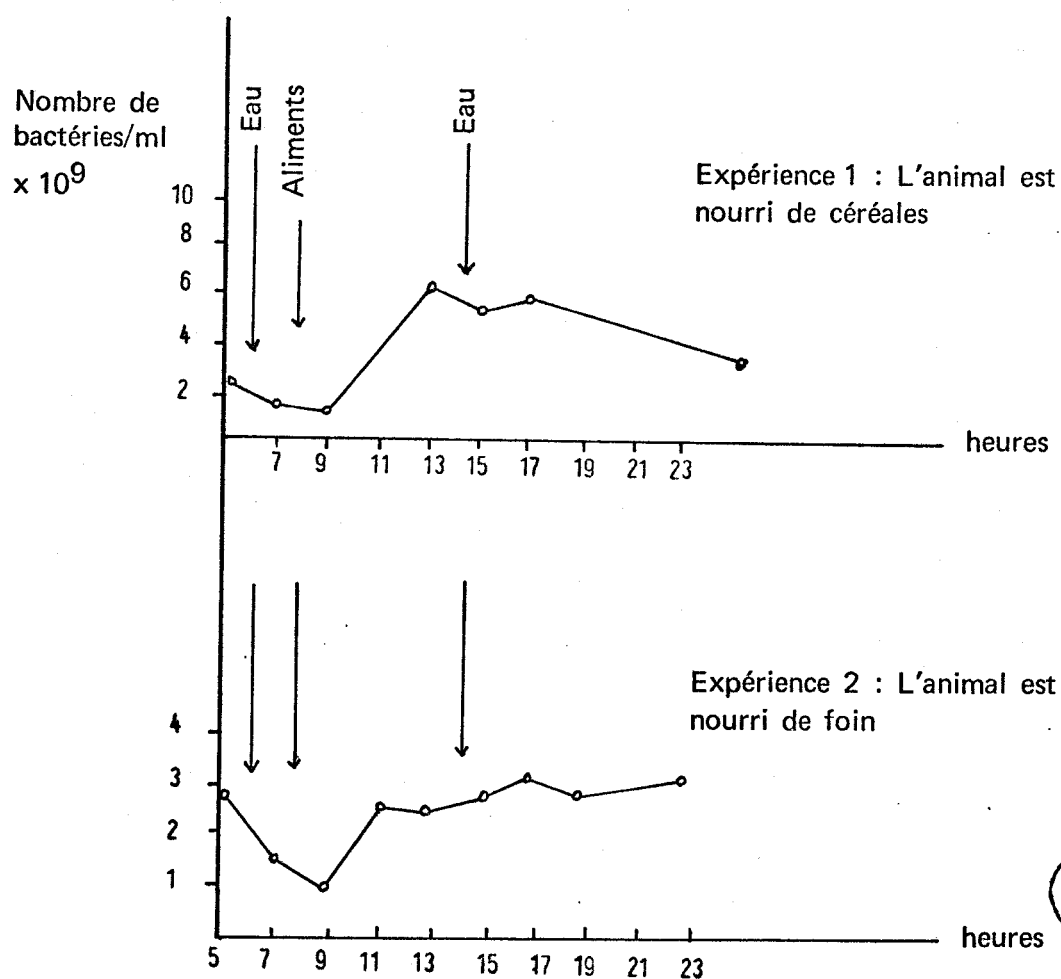


Figure 5 : Variation de la flore totale du rumen au cours du temps et en fonction de la nourriture.

d'après BRYANT et ROBINSON 1961 (8)



Nous voyons que l'activité cellulolytique du liquide du rumen ne peut être conservée à partir de prélèvement. Elle diminue de plus de 50 % au bout de 4 jours et est pratiquement nulle au 20^e jour lors de l'expérience de conservation à 4°.

Lorsque le prélèvement est gardé à 39°, la diminution de la cellulolyse par les bactéries du rumen est plus lente. Cependant, elle est voisine des 10 % le vingtième jour. Ceci n'est pas dû à un manque de substrat ni à une mauvaise anaérobiose dans le bocal de prélèvement (on observe en effet de surpression), mais plutôt à une accumulation de gaz et de métabolites toxiques pour les bactéries. Signalons que l'éructation est une phase importante de la digestion chez les ruminants, un animal ne pouvant plus éructer meurt au bout de quelques heures.

CONCLUSIONS

Nous avons vu que la microbiologie du rumen est très riche aussi bien en quantités de bactéries et de protozoaires, qu'en nombre d'espèces. Une forte proportion de bactéries sont capables de dégrader la cellulose. Parmi celles-ci, 3 souches sont couramment isolées. Ce sont *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* et *Bactéroïdes succinogenes*. La bactériologie du rumen est de ce fait très complexe. De plus ce sont les bactéries anaérobies strictes ayant donc de nombreuses exigences et vivant en symbiose aussi bien avec l'animal-hôte qu'entre elles.

Les bactéries cellulolytiques jouent un rôle important dans la digestion des aliments ingérés par l'animal. Elles permettent la dégradation de la cellulose en différents métabolites. Ceux-ci sont utilisés par les autres microorganismes qui synthétisent des composés (acides aminés, acides gras volatils, vitamines...) indispensables à la croissance de l'animal. La cellulolyse est très importante "in vivo". Des auteurs estiment que 50 % des aliments ingérés sont dégradés en 24 heures.

Nous avons essayé de doser celle-ci "in vitro". Les différentes expériences réalisées ont montré que les bactéries cellulolytiques sont actives sur différentes formes de celluloses insolubles. Pour cette étude, nous avons essayé de reproduire le plus possible les caractéristiques du rumen. Pour cela, les essais de cellulolyse se font en présence d'une solution minérale tampon de composition voisine de celle de la salive des ruminants et de même pH que le liquide de rumen. L'incubation se fait à la température de l'animal (environ 39° chez le boeuf). Les résultats obtenus ont montré l'importance de l'activité cellulolytique des bactéries "in vitro" : 100 mg de poudre de cellulose sont dégradés en 7 jours.

Il est pratiquement impossible d'établir une comparaison entre la cellulolyse "in vivo" et celle "in vitro" du fait de la différence des substrats cellulosiques ainsi que des conditions particulières d'étude. En effet, il y a une modification de la microbiologie : on observe une disparition des protozoaires lors des expériences "in vitro". De plus l'accumulation des métabolites peut inhiber la dégradation de la cellulose. Cependant, les essais de culture en continue des bactéries cellulolytiques du rumen ont montré que l'activité était conservée pendant plusieurs heures.

Des expériences menées en laboratoire sur des animaux fistulés ont montré que l'activité cellulolytique du liquide de rumen varie en fonction de plusieurs paramètres. La nature des aliments influe sur la composition de la population bactérienne : chez un animal nourri à base de luzerne, le pourcentage de Ruminococcus est supérieur à celui observé chez un animal nourri de foin. La vitesse de dégradation de la cellulose n'étant pas la même selon les espèces, nous trouverons ainsi des différences dans l'activité cellulolytique du rumen selon la période de l'année. De plus, nous avons vu que la population bactérienne fluctue suivant le moment de la journée.

Nous avons montré que l'activité cellulolytique "in vitro" est fonction de la nature du substrat ainsi que des conditions opératoires de dosage : concentration en cellulose, nature et concentration du tampon, durée d'incubation. Ceci explique les différences entre les résultats publiés par les auteurs. Cependant il est à retenir que, malgré les difficultés opératoires, l'activité cellulolytique des bactéries du rumen est considérable et mérite son étude.

2^{ème} PARTIE :

CULTURE "IN VITRO" DES MICROORGANISMES

CELLULOLYTIQUES DU RUMEN DE BOEUF

Les résultats précédents ont montré que l'activité cellulolytique du rumen est considérable. Cependant, l'extraction des enzymes cellulolytiques à partir du liquide de rumen n'est guère pensable pour plusieurs raisons. La première est d'ordre matériel. En effet, aux abattoirs malgré un abattage relativement important de ruminants, peu de panses conviennent aux conditions de prélèvement préalablement citées. De plus, d'autres problèmes se poseraient : transport des panses, délai du transport... Nous avons vu aussi qu'il existe des variations dans la population bactérienne suivant le moment de la journée.

La deuxième raison est d'ordre économique. Pour certains auteurs, les enzymes cellulolytiques ne sont pas excrétés dans le liquide de rumen mais restent fixer aux bactéries. D'autres auteurs trouvent une activité cellulolytique libre mais très faible. Ceci amène donc à casser les cellules par des méthodes physiques ou chimiques assez longues et délicates pour extraire les enzymes cellulolytiques.

Différents travaux ont montré que ces enzymes cellulolytiques étaient libérés dans le milieu de culture de bactéries du rumen. Malgré les difficultés inhérentes à la culture de bactéries anaérobies strictes, il semble plus avantageux d'étudier l'activité cellulolytique des bactéries du rumen cultivées in vitro. Pour cela, il a fallu résoudre certains problèmes comme l'anaérobiose, le choix d'un milieu pour la croissance de ces bactéries ayant de nombreuses exigences.

I. CULTURE DES BACTERIES CELLULOLYTIQUES DU RUMEN

Nous avons vu précédemment que les bactéries cellulolytiques du rumen sont tuées par l'oxygène même à très faible concentration. La culture de tels organismes pose de multiples problèmes au niveau de la verrerie (récipients fermant hermétiquement) et de aussi de composition du milieu de croissance.

Nous avons donc dû dans un premier temps tester la verrerie utilisée et déterminer les conditions de son utilisation. Dans un deuxième temps, nous avons essayé de cultiver les bactéries cellulolytiques en milieu liquide. Pour cela, nous avons sélectionné un milieu adéquat répondant aux exigences de ces microorganismes. Finalement, nous étudions l'activité cellulolytique de ces cultures en définissant certains paramètres.

a) L'anaérobiose

Nous avons utilisé des flacons de culture du type "fiolle à transfusion". Il en existe de différentes tailles : 560 ml, 330 et 150 ml. Ces récipients sont fermés par un bouchon en caoutchouc muni d'une virole de serrage.

Il s'est avéré indispensable de vérifier l'étanchéité de ces bouchons ainsi que d'étudier les conditions nécessaires pour obtenir une anaérobiose la plus totale possible dans les flacons.

1. Le gaz carbonique

La nature du gaz assurant l'anaérobiose varie selon les auteurs. Certains utilisent l'azote, d'autres le CO₂ ou l'hydrogène. Quelques expériences ont été réalisées sous atmosphère d'un mélange gazeux gaz carbonique - azote et azote-hydrogène et ceci en des proportions variables.

Pour notre part, nous nous sommes servis du CO₂ vendu dans le commerce sous forme de bouteilles. Celui-ci a été utilisé brut sans

élimination des traces d'oxygène par passage sur du cuivre à 400° ; Le taux d'oxygène présent étant inférieur à 0,1 %. Nous avons ajouté entre le détendeur de la bouteille et l'aiguille de sortie, un tube de verre rempli de coton cardé stérile. Le CO₂ est envoyé dans le flacon par l'intermédiaire d'une aiguille (Elite 150 mm 15/10) munie d'un débitmètre.

2. L'anaérobiose dans les fioles de culture

Il nous a semblé important de définir le temps nécessaire pour remplir une fiole de culture en CO₂. Le gaz carbonique est envoyé à différentes pressions dans des fioles de taille différente. Nous mesurons le pourcentage d'oxygène résiduel par l'intermédiaire d'une électrode reliée à un galvanomètre (appareil analyseur d'oxygène Fieldlab Beckman).

La figure 7 nous montre le temps nécessaire pour vider un flacon d'air et ainsi d'oxygène. Quelque soit le volume de la fiole ou le débit de CO₂ envoyé, les courbes présentent des similitudes. Dans un premier stade, le pourcentage d'oxygène résiduel décroît très rapidement et ceci pendant un laps de temps très court (moins de une minute). Le deuxième stade représente une stabilisation du taux d'oxygène présent dans la fiole.

Pour un flacon de 150 ml, il est préférable d'envoyer le CO₂ sous une faible pression (0,2 Bar débitmètre position 1) sinon il se forme des tourbillons au niveau de l'ouverture faisant pénétrer ainsi de l'air. C'est le cas pour une pression de CO₂ de 0,4 bar débitmètre position 1, le pourcentage d'oxygène résiduel se stabilise à 4,5 % et ceci malgré la durée de l'opération. Pour les flacons de 330 et 560 ml, le taux d'oxygène est négligeable au bout de 2 minutes quand le gaz carbonique est envoyé sous une pression de 0,4 bar débitmètre position 1.

Il est donc possible en réglant la pression du gaz carbonique suivant le volume du flacon, de faire régner une anaérobiose convenable dans les fioles de culture. Le taux d'oxygène résiduel est alors très faible moins de 0,3 %. Dans la panse de boeuf, l'oxygène est présent à une concentration voisine de 0,5 %.

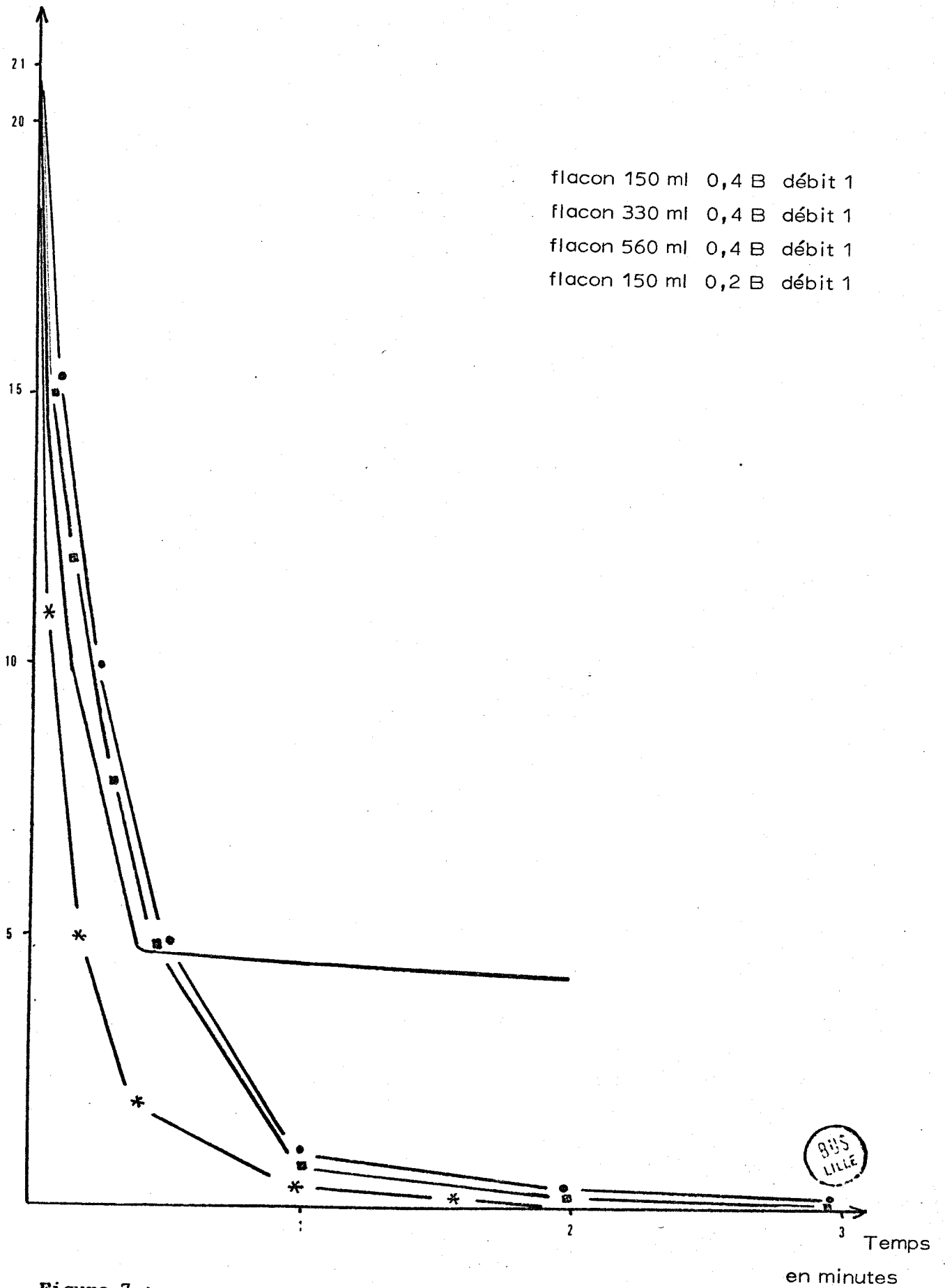


Figure 7 :

ETUDE DES CONDITIONS OPERATOIRES POUR LE REMPLISSAGE EN CO₂ DES FIOLES DE CULTURE

Il nous a semblé intéressant de faire l'opération inverse c'est-à-dire de mesurer le temps nécessaire pour remplacer le CO₂ par l'air ambiant. Pour cela des flacons 150 et 330 ml sont remplis de CO₂ envoyé à une pression convenable pendant quatre minutes, puis laissés ouverts. A différents temps, on mesure l'oxygène présent par la méthode décrite précédemment. La figure 8 rassemble les résultats obtenus.

Il faut plus de 20 minutes pour que la teneur en Oxygène atteigne le seuil des 21 %. Cependant il ne suffit que d'une minute pour avoir 1 % d'oxygène présent dans la fiole. Cela montre donc les précautions à prendre lors des cultures. Nous opérerons sous courant de gaz carbonique sitôt l'ouverture d'un flacon et ceci jusqu'à sa fermeture de façon à limiter le plus possible tout contact des bactéries avec l'air.

3. L'étanchéité des bouchons

La qualité des bouchons est indispensable pour préserver l'anaérobie pendant les cultures. Des flacons de 150 ml sont remplis de gaz carbonique puis immédiatement fermés par un bouchon en caoutchouc muni d'une virole se visant sur le goulot. Ceux-ci sont alors laissés dans une étuve à 39° pendant différents temps. Passé ce délai, le flacon est ouvert et nous mesurons le pourcentage d'oxygène présent.

Le tableau 5 nous montre les résultats obtenus. Nous nous apercevons que le pourcentage d'oxygène présent dans les flacons n'augmente pas au cours du temps. Nous pouvons donc conclure à une bonne étanchéité de ces bouchons et utiliser ce type de verrerie pour les cultures en milieu liquide des bactéries cellulolytiques du rumen.

Tableau 5

flacon ouvert après :	% d'oxygène résiduel
1 jour	0,3
2 jours	0,4
5 jours	0,4
7 jours	0,5
15 jours	0,3

% d'Oxygène

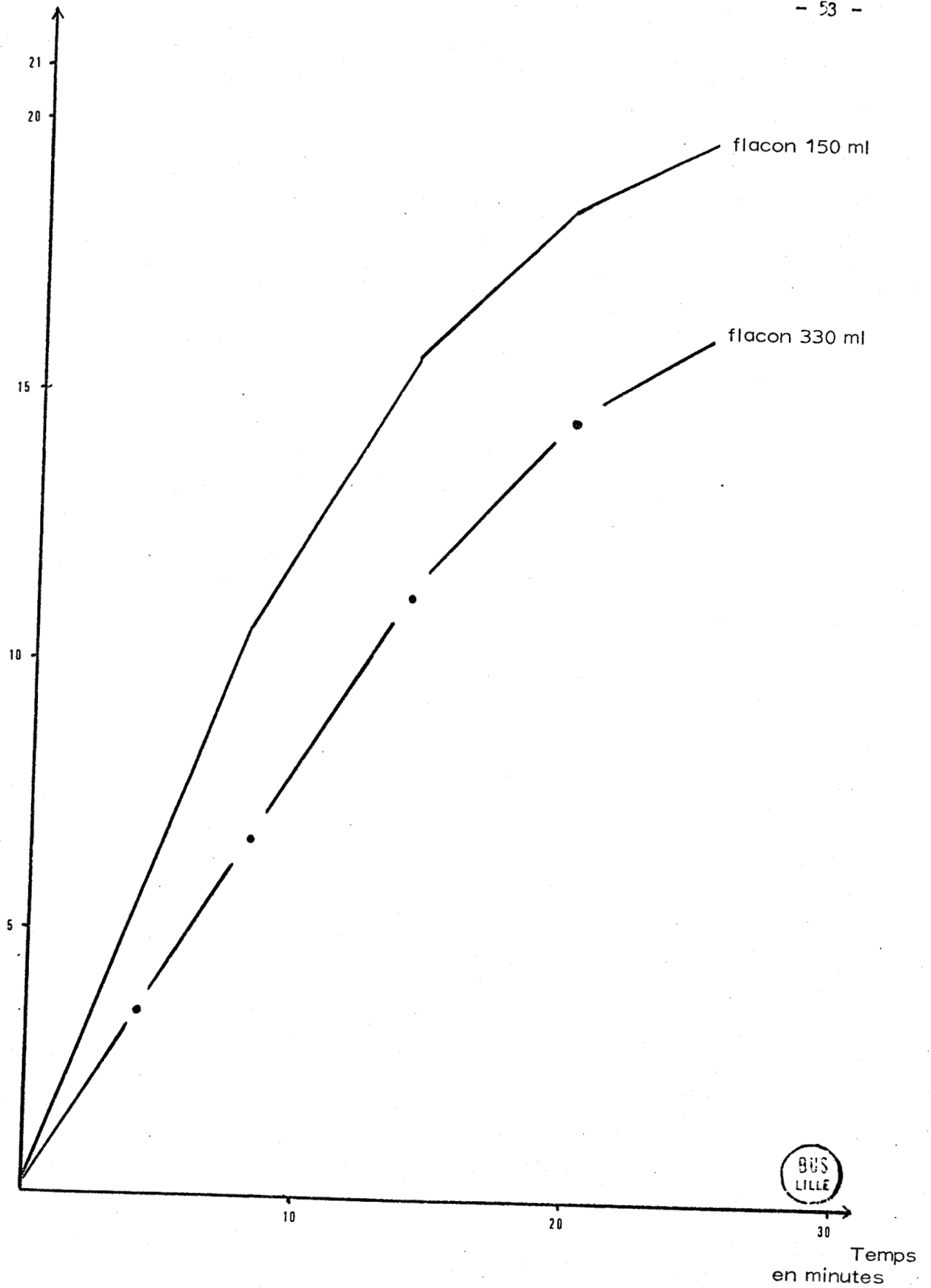


Figure 8 : MESURE DE LA "REGENERATION" EN OXYGENE

b) Le milieu de culture

1. Généralités sur le milieu de culture des bactéries anaérobies

Le potentiel d'oxydo réduction est la notion importante régissant le développement des bactéries anaérobies. Il est caractérisé par le symbole rH et traduit l'état réduit ou oxydé du milieu ambiant. L'équilibre du système réduit-oxydé est situé à une valeur rH située entre 10 et 12. Au dessous de cette valeur, le milieu est réduit, les doubles liaisons se trouvent saturées par des atomes d'hydrogène et les électrons perdent une charge positive : Fe^{+++} devient Fe^{++} . Au dessus, le milieu est oxydé. Seul le premier cas est favorable à la croissance des anaérobies.

Les rH sont obtenus par :

- . l'utilisation de milieux contenant des oxydo-réducteurs à l'état réduit soit des réducteurs
- . les cultures en profondeur
- . augmentation de la consistance des milieux
- . la culture en présence de fragments d'organes tels le foie, la cervelle, le rein...
- . l'apport d'un important volume d'une culture antérieure de la souche à cultiver

Le rH comme le pH se mesure soit par potentiométrie soit par les indicateurs colorés. Ceux-ci se décolorent sous leur forme réduite.

- Les agents réducteurs

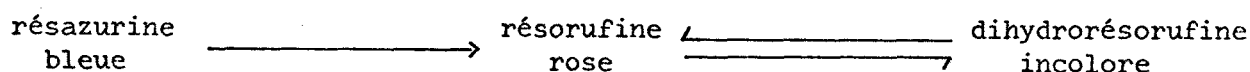
Les principaux agents réducteurs utilisés pour la culture des anaérobies sont :

- . le chlorhydrate de cystéine
- . la réductone
- . le sulfite de sodium
- . le thioglycolate de sodium

L'état réduit s'obtient en évacuant l'air dissous et ambiant soit par des procédés physiques (vide, régénération) soit par des procédés chimiques (procédé de Mac INTOSH et FILDES, pyrogallol alcalin).

- Les indicateurs d'oxydo-réduction

Parmi les indicateurs d'oxydo-réduction, la résazurine est la plus employée. C'est un produit bleu qui est réduit en deux étapes :



Elle est employée à une concentration finale de 0,0001 %.

Le bleu de méthylène, le carmin indigo, le benzylviologène ont également été utilisés comme indicateurs d'oxydo-réduction pendant ils sont généralement toxiques aux concentrations nécessaires pour donner une coloration détectable.

- La régénération des milieux

Tout milieu dont la surface est en contact avec l'atmosphère renferme de l'air dissous. Il est oxydé et ne convient plus au développement des anaérobies. La régénération consiste à chasser l'air dissous par chauffage au bain-marie bouillant pendant au moins 20 minutes. Ceci n'est possible que pour les solutions thermostables. Avant que le milieu de culture ne refroidisse, il importe de remplacer l'air encore présent dans le récipient par du gaz carbonique.

2. Sélection d'un milieu de culture pour les bactéries cellulolytiques du rumen

Les premiers essais de culture des bactéries cellulolytiques ont

longtemps étaient voués à l'échec, ces échecs étant essentiellement dus au manque de connaissance des exigences de ces microorganismes. HUNGATE (48) a proposé alors deux types de milieux : ceux simulant l'habitat et ceux d'enrichissement.

BRYANT et BURKEY (5, 1953), HUNGATE (47, 1957), BRYANT et ROBINSON (8, 1961), BRYANT (4, 1963) proposent des milieux simulant l'habitat par addition de liquide de rumen ou de certains de ses composés à une solution de sels et de carbohydrates. Parmi ceux-ci, le milieu le plus souvent utilisé est celui décrit par HUNGATE (45). BRYANT et BURKEY ont pu ainsi dénombrer la population bactérienne totale et isoler les principales espèces.

Les milieux permettant l'enrichissement en certaines catégories de bactéries ne sont généralement que des variantes du milieu de HUNGATE. En effet, lors de la recherche spécifique des bactéries amylolytiques, la source carbonée est assurée uniquement par de l'amidon (GILCHRIST et KISTNER (30, 1962) ; GIESECKE (28, 1966). Pour les microorganismes cellulolytiques, on utilise la cellulose en poudre ou tout autre forme de cellulose. RAVERDY (72, 1972) a fait l'inventaire des milieux cités dans la littérature et a établi leurs principales caractéristiques.

Nous nous sommes intéressés à la sélection d'un milieu de culture permettant la croissance des bactéries cellulolytiques du rumen ainsi que d'obtenir une activité cellulolytique "in vitro" la plus proche possible de celle du rumen étudiée précédemment. Pour cela, nous avons dû tester plusieurs milieux, choisir celui donnant les meilleurs résultats et finalement essayer de le modifier pour optimiser l'activité cellulolytique.

- Les milieux testés

La composition des milieux de culture des bactéries cellulolytiques varie suivant l'objet de l'étude : production de cellulases KING et SMITH (50), HALLIWELL (38), KHRISHNAMURTI et KITTS (56), dénombrement des bactéries [KING (51), WILSON et BRIGGS (92), KISTNER (53), BRYANT et ROBINSON (8)] ou étude physiologique [HUNGATE (46), cocci cellulolytiques ;

BRYANT et DOETSH (7) Bacteroides succinogènes ; DEHORITY (19) Rumino-coccus).

Nous avons testé quatre milieux de culture. Ce sont :

. le milieu de HUNGATE à base de sels inorganiques, de liquide de rumen ; l'agent réducteur est le chlorhydrate de cysteine et le pH est tamponné à la valeur de 6,8 par la combinaison bicarbonate de sodium - CO₂.

. le milieu d'enrichissement utilisé par KRISHNAMURTI et KITTS qualitativement semblable à celui de HUNGATE.

. le milieu d'HALLIWELL et BRYANT à base de liquide de rumen et carbonate de sodium.

. le milieu-Tampon d'HALLIWELL utilisé lors des dosages d'activité cellulolytique.

Le tableau 6 indique la composition de ces quatre milieux.

La source carbonée est partout la même : poudre de cellulose Whatman mais à des concentrations variables. Seul le milieu tampon d'HALLIWELL ne comprend pas de liquide de rumen filtré. La nature des sels est sensiblement la même et tend à reproduire la composition de la salive des ruminants (Mc DOUGALL, 62).

NaHCO ₃	9,8 g/litre
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	9,3
KCl	0,57
NaCl	0,47
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,12
CaCl ₂	0,04

Composition minérale de la salive de boeuf. D'après Mc DOUGALL (62) 1948

Produits	Milieux d'après			
	HUNGATE	HALLIWELL	KRISHNAMURTI et KITTS	HALLIWELL et BRYANT
	I	II	III	IV
Liquide de rumen	40 ml	-	20 ml	30 ml
K_2HPO_4	45 mg	-	18 mg	22,5 mg
KH_2PO_4	45 mg	20 mg	18 mg	22,5 mg
$(NH_4)_2SO_4$	90 mg	-	-	45 mg
NaCl	90 mg	-	-	45 mg
$MgSO_4$	9 mg	38 mg	30 mg	9 mg
$CaCl_2$	9 mg	48 mg	60 mg	45 mg
Cystéine - HCl	50 mg	-	-	50 mg
Na_2CO_3	-	-	-	400 mg
$NaHCO_3$	400 mg	1 680 mg	1 470 mg	-
KCl	-	45 mg	40 mg	-
$(NH_4)_2HPO_4$	-	100 mg	90 mg	-
Na_2S	-	-	20 mg	-
Extrait de levures	-	-	30 mg	-
Résazurine 0,1 %	0,1 ml	-	-	0,1 ml
Cellulose poudre	400 mg	700 mg	400 mg	200 mg
Eau	60 ml	100 ml	80 ml	70 ml
CO_2	+	+	+	+
pH	6,8	6,8	6,8	6,8



Tableau 6 : Composition des milieux testés pour un volume final de 100 ml.

Ces milieux sont autoclavés à 115° pendant 20 minutes. Juste après l'ouverture de la porte de l'autoclave, les flacons sont purgés d'air par un faible courant de gaz carbonique. Après refroidissement, on ensemence à raison de 20 % par du liquide de rumen fraîchement prélevé. L'incubation se fait en étuve à 39° sans agitation.

- Résultats

Les résultats cités ici concernent l'activité cellulolytique des milieux en fonction du temps de culture. Pour cette étude nous avons pratiqué de la façon précédemment décrite (partie I, IV, 2) c'est-à-dire : qu'à différents moments, nous prélevons 2 millilitres de culture en respectant le plus possible l'anaérobiose. Sur ceux-ci, nous dosons la cellulolyse ; le substrat est de la poudre de cellulose Whatman (100 mg) et nous opérons en milieu tampon bicarbonate - CO₂ - sels à pH 6,8 (5 ml). L'incubation se fait à 39° pendant 48 heures.

Le tableau 7 rassemble les résultats obtenus. Nous nous apercevons que le taux de cellulolyse varie de deux façons :

- . en fonction de la nature du milieu
- . et selon le temps de culture

Le taux de cellulolyse est plus élevé lorsque nous cultivons les microorganismes du rumen sur le milieu de HUNGATE. Celui-ci, faisant incorporer du liquide de rumen, semble donc reproduire au mieux les conditions écologiques existant dans le rumen. Les résultats obtenus avec les autres milieux à base de liquide de rumen (KRISHNAMURTI et KITTS, HALLIWELL et BRYANT) sont nettement inférieurs. Suivant la composition de ceux-ci (tableau 6) il semblerait que le bicarbonate de sodium soit responsable de cette faible activité cellulolytique. Si le milieu de HUNGATE contient 4 g/l, le milieu III en a 3 fois plus, tandis que dans le milieu IV, le carbonate de calcium remplace NaHCO₃. Cependant il est à noter que dans la salive des ruminants la concentration en bicarbonate est très élevée environ 10 g/litre.

Quant au milieu tampon de HALLIWELL nous observons qu'une faible activité durant toute la culture du fait de l'absence de liquide de

rumen.

Cultivés sur milieu de HUNGATE, les bactéries cellulolytiques montrent une variation de leur activité en fonction du temps de culture. Si celle-ci est faible durant les premières heures, cela est essentiellement dû à la dilution dans le milieu. Il pourrait également y avoir un temps de latence. Au bout de 48 à 72 heures, nous obtenons l'optimum de cellulolyse 45 %.

Ensuite l'activité cellulolytique diminue rapidement pour être pratiquement nulle en fin de culture.

Temps de culture	Milieu I	Milieu II	Milieu III	Milieu IV
8 heures	16,2	13,2	11,6	17,2
18 "	27,6	20,1	18,7	16,9
42 "	29,4	15,2	21,6	28,3
48 "	32,1	8,7	23,4	25,2
72 "	39,9	6,5	18,2	14,1
85 "	37,6	3,2	15,3	7,9
102 "	12,4	2,7	7,4	3,1
115 "	5,6	3,5	2,1	-

Tableau 7

- Conclusion

Nous venons de voir qu'il est possible de cultiver in vitro les bactéries cellulolytiques du rumen en conservant leur activité. Ceci n'est possible qu'en observant une anaérobiose la plus totale possible dans les fioles de culture mais aussi en utilisant un milieu dont la

composition reproduit les conditions existant dans le rumen.

Nous avons sélectionné un milieu dit d'enrichissement : c'est le milieu de HUNGATE à base de liquide de rumen, sels inorganiques et cellulose représentant en principe la seule source de carbone.

c) L'Activité cellulolytique des cultures

Avant de poursuivre toute étude sur les cultures des bactéries cellulolytiques, il nous a semblé indispensable de doser leur pouvoir de dégradation de la cellulose dans les conditions optimales. Pour cela, nous étudierons l'influence de différents paramètres susceptibles de modifier le taux de cellulolyse des cultures.

1. Matériel et méthodes

Nous avons décrit précédemment les conditions opératoires pour le dosage de l'activité cellulolytique. Nous reprenons cette technique en remplaçant les 2 ml de liquide de rumen par 2 ml d'une culture bactérienne de 72 heures.

2. Influence de différents paramètres

- Concentration en cellulose

Plusieurs tubes contenant différentes concentrations en poudre de cellulose (Whatman) et 5 ml de tampon HALLIWELL pH 6,8 sont ensemencés par 2 ml d'une culture bactérienne de 72 heures sur milieu de HUNGATE. Après 48 heures d'incubation, la cellulose résiduelle est mesurée suivant la méthode déjà décrite.

La courbe représentant la quantité de cellulose solubilisée en fonction de la quantité de substrat (figure 9) montre que la cellulolyse est pratiquement proportionnelle jusqu'à 90 mg de cellulose ; puis celle-ci atteint un palier traduisant ainsi la saturation en substrat.

Les essais suivants seront réalisés en présence de 50 mg de substrat cellulosique.

- Concentration en tampon

La composition du tampon a été décrite précédemment et nous avons vu l'influence de ses constituants sur l'activité cellulolytique in vitro du liquide de rumen.

La figure 10 représentant le pourcentage de cellulose solubilisée (cellulolyse) en fonction de la quantité du tampon ajoutée dans les tubes montre un optimum pour un volume de 5 ml. Pour de faibles concentrations en tampon, l'activité cellulolytique est assez élevée : 44 % pour 1 ml contre 60 % pour 5 ml. Ceci semble être dû à l'apport des 2 ml de culture ; les bactéries pourraient continuer à croître et digérer la cellulose. Cependant l'apport de tampon est nécessaire, en son absence le pourcentage de cellulose solubilisé est très faible (9 %).

Pour une concentration supérieure à 5 ml, le taux de cellulolyse diminue rapidement. Cependant pour des volumes de 15 à 20 ml de tampon on détecte encore une activité non négligeable : 15 à 18 %.

3. Conclusions

Cette étude nous a permis de voir l'influence de la concentration en cellulose et tampon sur l'activité cellulolytique des cultures des bactéries cellulolytiques du rumen. Pour la suite des travaux, il sera préférable de doser cette activité sur 50 mg de substrat cellulosique et en présence de 5 ml de tampon HALLIWELL.

Nous pouvons rapprocher ces résultats de ceux obtenus lors de l'étude de l'activité cellulolytique du liquide de rumen. Nous trouvons plusieurs ressemblances. L'optimum de cellulolyse est atteint dans les 2 expériences pour une concentration de 5 ml de tampon. Au dessus de ce volume, l'activité diminue rapidement.

De même l'influence du temps d'incubation est pratiquement la même ; nous notons dans les deux cas des vitesses de dégradation différentes et pratiquement toute la cellulose est solubilisée au bout de sept jours.

mg de cellulose solubilisée

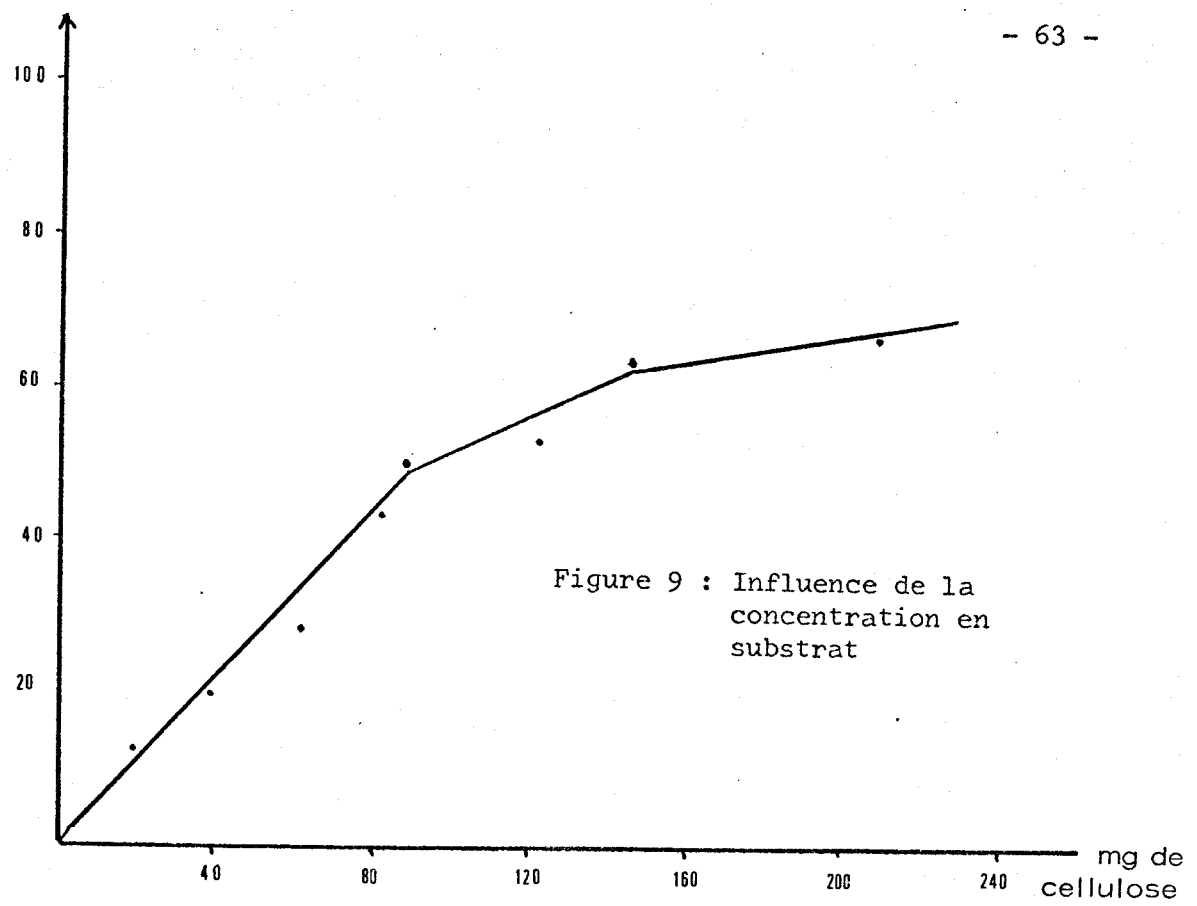


Figure 9 : Influence de la concentration en substrat

% de cellulose solubilisée

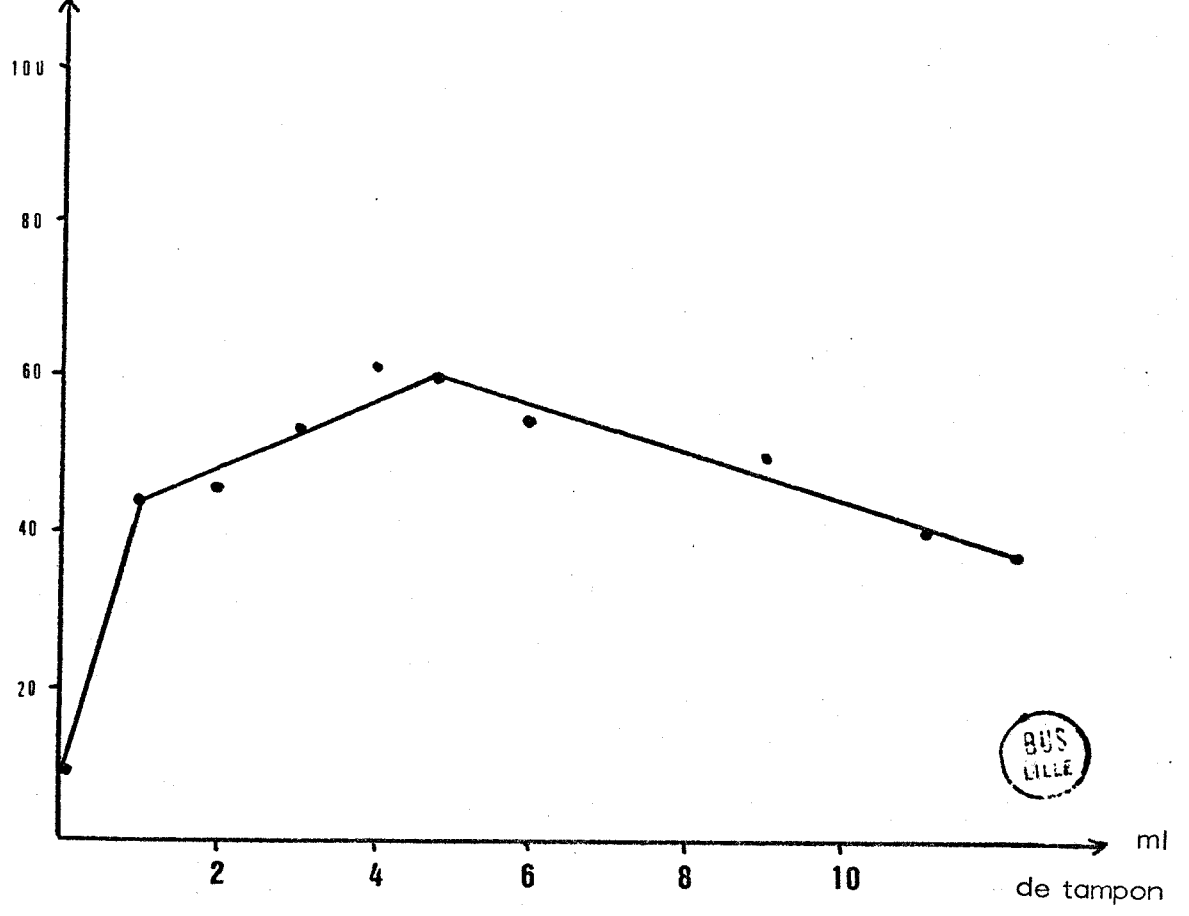


Figure 10 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN TAMPON

Une différence importante se situe au niveau de l'influence de la concentration en cellulose. Si pour le liquide de rumen nous travaillons sur 100 mg de substrat, pour l'activité cellulolytique des cultures de bactéries du rumen cette concentration est divisée par 2. Cependant il faut tenir compte de plusieurs données : lors des cultures sur milieu de HUNGATE, nous enrichissons la population bactérienne en bactéries cellulolytiques au détriment de certaines espèces. Nous avons étudié dans la première partie le phénomène de symbiose existant aussi bien entre l'animal - hôte et les bactéries elles-mêmes. Il y aurait de ce fait une influence au niveau du métabolisme des bactéries cellulolytiques et donc sur leur activité envers la cellulose.

D'autre part, nous ensemençons les milieux de culture par 20 % de liquide de rumen d'où une dilution au 1/5 de l'activité. Ce n'est qu'après 2 à 3 jours de culture que nous obtenons un taux de dégradation sensiblement supérieur à celui du liquide de rumen fraîchement prélevé. Ce délai correspond au temps nécessaire pour obtenir l'optimum de croissance des bactéries anaérobies.

Les travaux de nombreux auteurs (WARNER 1956, 88 ; RUFENER et NELSON 1963, 76 ; SLYTER et NELSON 1964, 82 ; HOBSON 1965, 42 ; SLYTER, BRYANT et WOLIN 1966, 83) ont montré qu'il est possible de cultiver les bactéries du rumen in vitro tout en conservant les différentes activités métaboliques. Nous avons vu, pour notre part, que la culture des microorganismes cellulolytiques est également réalisable par l'utilisation d'un milieu adéquat. Celui proposé par HUNGATE satisfait les nombreuses exigences nécessaires à leur croissance.

Les travaux précédents ont mis en évidence l'influence de la composition du milieu de culture sur la cellulolyse. Il nous a semblé intéressant d'essayer d'optimiser celle-ci ; nos travaux se sont prolongés dans deux directions : nous étudierons l'influence de certains constituants du

milieu de culture de HUNGATE soit au niveau de leur concentration soit au niveau de la forme sous laquelle ils y sont apportés, puis nous tenterons d'établir les différents paramètres affectant la culture des bactéries cellulolytiques du rumen.

II. ESSAIS D'OPTIMISATION DE LA CELLULOLYSE : Modifications du milieu de culture

Cette première voie de recherches pour optimiser la cellulolyse lors des cultures de bactéries cellulolytiques du rumen *in vitro* concerne la composition du milieu de culture. En effet, HUNGATE a proposé ce milieu il y a plus de quinze ans. Depuis, de nombreux travaux ont permis de mieux connaître les différentes exigences des espèces. De plus le milieu de HUNGATE est non spécifique des bactéries cellulolytiques ; il a été conçu pour la numération de la population bactérienne totale. La source carbonée était un mélange de glucose et de cellobiose ; le milieu gélifié s'appelle alors Rumen Glucose-Cellobiose-Agar (R.G.C.A.). Comme la plupart des enzymes cellulolytiques sont des enzymes inductibles le mélange de sucres est remplacé par de la poudre de cellulose. Nous avons vu dans un chapitre précédent que la cellulose n'est jamais obtenue pure d'où le milieu proposé par HUNGATE permet en plus la croissance d'autres microorganismes que ceux cellulolytiques.

Il serait également intéressant de remplacer le liquide de rumen entrant dans la composition du milieu par un produit facilement disponible, de façon à supprimer les variations de qualités du liquide de rumen.

Les essais de modification du milieu de HUNGATE ont porté sur trois points :

- Remplacement de la source carbonée ou azotée
- Addition au milieu de différents composés
- Essai de substitution du liquide de rumen

a) Influence de la source carbonée ou azotée

Chez de nombreux champignons (REESE, 75 ; LEVINSON, 58 ; HUSAIN, 49) et bactéries (YAMANE, 93 ; NISIZAWA, 68) les enzymes responsables de la cellulolyse, les cellulases, sont des enzymes inductibles c'est-à-dire que la nature de la source carbonée joue un rôle important au niveau de leur production. Nous avons réalisé différents essais en modifiant la source carbonée en la remplaçant par un autre sucre ou un mélange.

D'autre part, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'influence de la source azotée sur la croissance des bactéries. Nous avons donc essayé de modifier la forme sous laquelle sont apportés les ions NH_4^+ ainsi que de les remplacer.

1. Matériel et Méthode

Les essais sont réalisés dans des fioles à transfusion contenant 40 ml de milieu de base dont la composition est donnée plus loin. Différents sucres ou composés azotés sont ajoutés. Après dissolution, on fait buller du gaz carbonique jusqu'à complète décoloration de l'indicateur d'anaérobiose, la résazurine et on ferme hermétiquement les fioles à l'aide d'un bouchon de caoutchouc muni d'une virole. On stérilise à 105° pendant 15 minutes et on laisse le milieu refroidir jusque $50-60^\circ$. A nouveau, on fait passer un courant de CO_2 pendant 1 à 2 minutes. Le milieu est alors prêt à êtreensemencé par 10 ml de liquide de rumen fraîchement prélevé selon la technique décrite précédemment.

Après 3 jours de culture à 39° , 2 ml sont prélevés et servent à déterminer l'activité cellulolytique. Rappelons les conditions de dosage : nous opérons sur 50 mg de poudre de cellulose en présence de 5 ml de tampon bicarbonate - CO_2 - sels pH 6,8 - la cellulose résiduelle après 48 h d'incubation est mesurée par gravimétrie.

La composition du milieu de base varie selon le type de l'expérience. Ainsi pour l'étude de l'influence de la nature de la source carbonée, le milieu de base est :

Pour 100 ml 15 ml solution I (K_2HPO_4 à 0,3 %)
 15 ml solution II¹
 0,1 ml résazurine à 0,1 %
 40 ml de liquide de rumen
 2 ml cystéine à 3 %
 8 ml bicarbonate de sodium à 6 %
 20 ml d'eau

Pour l'étude de l'influence de la nature de la source azotée, il a été le suivant :

Pour 100 ml 15 ml solution I (K_2HPO_4 à 0,3 %)
 15 ml solution II¹ modifiée sans sulfate d'ammonium
 0,1 ml résazurine à 0,1 %
 40 ml de liquide de rumen
 2 ml cystéine à 3 %
 8 ml $NaHCO_3$ à 6 %
 20 ml d'eau

1 solution II : KH_2PO_4 0,3 %
 $(NH_4)_2 SO_4$ 0,6 %
 NaCl 0,6 %
 $MgSO_4$ 0,06 %
 $CaCl_2$ 0,06 %

2. Influence de la source carbonée

Nous avons remplacé la cellulose utilisée par HUNGATE dans son milieu d'enrichissement en bactéries cellulolytique par des monosaccharides, disaccharides... et même par des mélange de sucres.

- Résultats

Les figures 11 a, b, c, rassemblent les différents essais réalisés ainsi que le pourcentage de cellulolyse obtenu.

. Influence de différents sucres

Nous nous apercevons, dans la première série d'expérience que le pourcentage de cellulolyse varie selon la nature du sucre. Parmi les neuf sucres testés, seul le lactose jouerait le même rôle d'inducteur des enzymes cellulolytiques que la cellulose (respectivement 59 et 65 % de cellulolyse). A l'inverse, le glucose et le cellobiose ($\text{glc} \xrightarrow{\beta 1-4} \text{glc}$) semblent être des inhibiteurs de la production de cellulase et ceci à concentration moyenne 0,5 % (20 et 8,5 % de cellulolyse). Le fait de repasser sur milieu cellulosé lors du dosage de l'activité cellulolytique semblerait ne pouvoir lever cette inhibition dans un délai de 48 heures (durée de l'expérience). Ces résultats sont retrouvés lorsqu'on additionne en plus de la cellulose l'un de ces deux sucres (essais 10 et 11).

Les autres sucres testés (saccharose, maltose, dextrine...) ne permettent d'obtenir que des taux de cellulolyse relativement faibles. La carboxy methyl cellulose soluble ne semble pas être le substrat idéal du fait de sa nature de cellulose modifiée. De ce fait, elle ne pourrait induire tous les enzymes intervenant dans la dégradation d'une cellulose vraie insoluble (poudre de cellulose par exemple).

. Effet du lactose sur la culture des bactéries cellulolytiques

Nous venons de voir que pratiquement seul le lactose peut remplacer la cellulose comme source carbonée pour la culture des bactéries cellulolytiques. Nous nous sommes intéressés à l'influence de la concentration en lactose ; le tableau 9 et la courbe (fig. 11, b) rassemblent les résultats de cellulolyse obtenus par des cultures de 72 h sur ce sucre.

Nous voyons que la courbe présente un maximum pour une concentration en lactose comprise entre 0,1 % et 0,3 %. Au dessus de cette valeur, le lactose semble être un inhibiteur de l'activité cellulolytique des bactéries du rumen.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence du mélange cellulose lactose et ceci à différentes concentrations (tableau 9 essais n° 18 à 21). Nous constatons que le taux de dégradation de cellulose

Essai n°	Source carbonée	Concentration	% de cellulolyse
1	glucose	0,5	20
2	cellobiose	"	8,5
3	lactose	"	59
4	Maltose	"	25
5	Saccharose	"	42
6	Dextrine	0,75	52
7	Cellulose	"	65
8	C.M.C.	"	49
9	Amidon	0,1	29
10	glucose + cellulose	0,1 0,5	59
11	cellobiose + cellulose	0,1 0,5	55
12	glucose + cellobiose	0,2 0,2	15

Tableau 8 : Etude de l'influence de la source carbonée sur l'activité cellulolytique des cultures de bactéries du rumen .



augmente pour une concentration en lactose de 0,25 %. Si on augmente cette valeur la cellulolyse diminue malgré la présence de cellulose.

- Conclusions

L'étude de l'influence de la nature de la source carbonée a montré que selon le sucre utilisé dans le milieu de culture, l'activité cellulolytique observée après 72 H de culture varie considérablement. Il semble évident que pour cultiver des microorganismes cellulolytiques il est préférable d'utiliser comme substrat carboné la cellulose. Cependant, divers travaux sur les champignons ont mis en évidence l'influence d'autres sucres sur la production de cellulase par exemple : cellobiose, lactose, sophorose (MANDELS et REESE, 60 ; NISIZAWA et SUZUKI, 68). Cette influence est bénéfique suivant la concentration à laquelle le sucre est utilisé. Si le glucose est un represseur de la synthèse de cellulase chez Trichoderma viride (NISIZAWA et SUZUKI) même à dose très faible, d'autres sucres peuvent jouer le même rôle.

FUSEE et LEATHERWOOD (1972, 26) ont montré que lorsque la concentration en cellobiose augmente, la croissance de deux bactéries cellulolytiques du rumen : Ruminococcus albus et Ruminococcus flavefaciens, est plus élevée ; cependant la production de cellulase diminue. D'après ces auteurs, il n'y aurait aucune inhibition par le cellobiose ajouté soit au milieu d'essai enzymatique soit au milieu de culture contenant de faibles concentrations de carboxy methyl cellulose. Il y aurait en fait, une diminution de l'activité spécifique c'est-à-dire de l'activité enzymatique en fonction de la croissance.

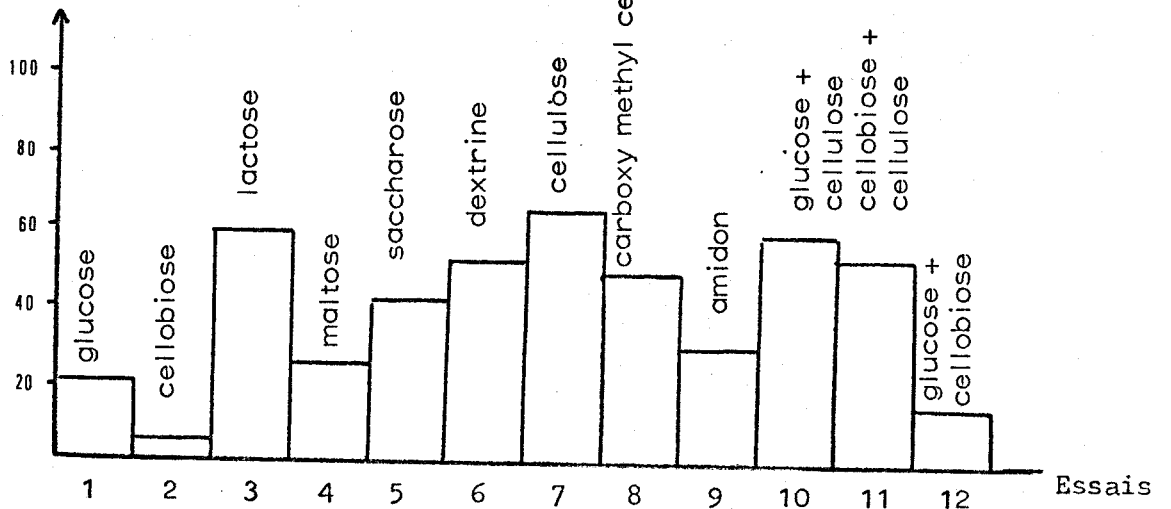
Les différentes expériences réalisées nous ont donc permis de montrer l'influence de la nature de la source carbonée sur la cellulolyse. Certains sucres comme le glucose, cellobiose sont des "inhibiteurs" de la synthèse des enzymes cellulolytiques et ceci à la concentration de 0,5 %. D'autres comme le lactose, la dextrine semblent être des "activateurs". Cependant leur rôle exact au niveau de la synthèse des cellulases est difficile à définir. Deux faits peuvent se produire lors de la culture : soit que les sucres sont difficilement assimilables par les bactéries,

Essais n°	Source carbonée	concentration	% de cellulolyse
13	lactose	0,1 %	66
14	"	0,2	70
15	"	0,3	71
16	"	0,5	65
17	"	1	51
18	cellulose	0,75	70
19	lactose + cellulose	0,25 0,5	75
20	lactose + cellulose	0,25 0,75	77
21	lactose + cellulose	0,5 0,75	68

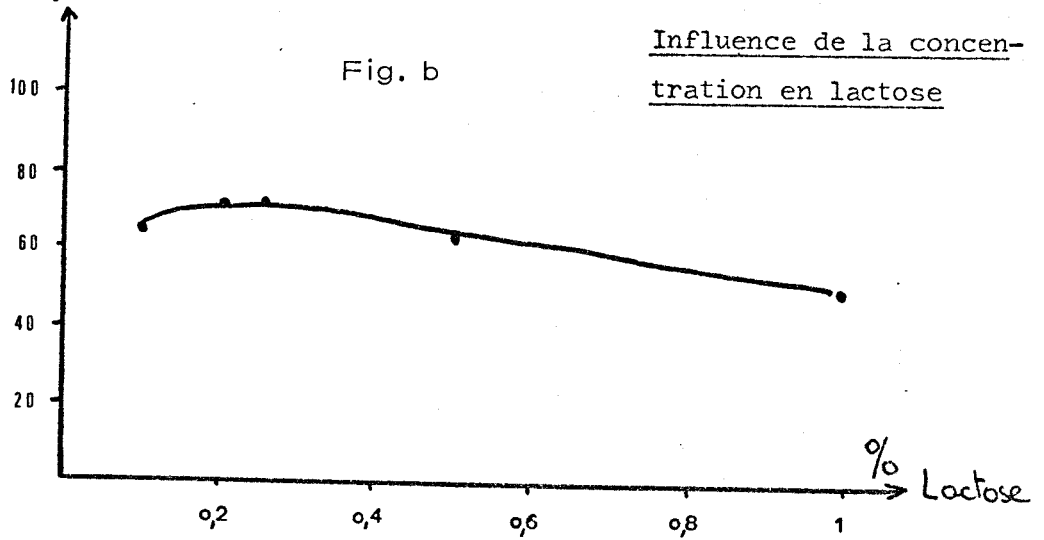
Tableau 9 : Influence de la concentration en lactose et du mélange lactose - cellulose sur la cellulolyse observée après 3 jours de culture.



% de cellulolyse



% de cellulolyse



% de cellulolyse

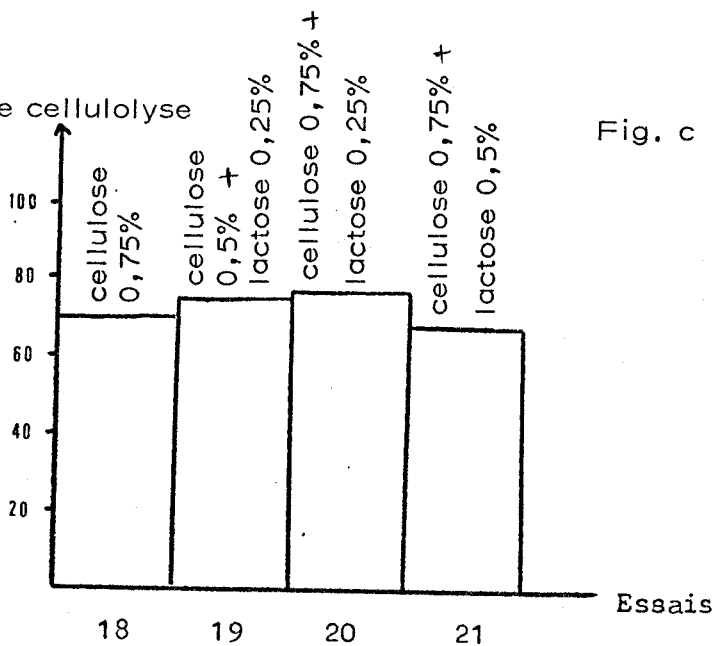


Figure 11 : INFLUENCE DE LA NATURE DE LA SOURCE CARBONÉE

d'où une croissance faible et par conséquent la production enzymes est peu élevée, soit que les sucres sont assimilées mais inhibent d'une façon ou d'une autre la synthèse de cellulases malgré un taux de croissance élevé. Ce dernier cas s'applique essentiellement au glucose : effet glucose (EPPS et GALE, 25 ; MONOD, 64) ou répression catabolite (NEIDHARDT, 67). C'est pourquoi nous parlerons d'inhibiteurs et activateurs sous toutes réserves

3. Influence de la source azotée

Nous avons dans un premier temps apporté au milieu de culture les ions NH_4^+ sous une autre forme que sulfate tout en respectant la concentration initiale. Puis, au vu des résultats, nous avons étudié l'influence de la concentration en sulfate d'ammonium. Enfin, des tentatives ont été réalisées pour lui substituer d'autres sources azotées.

- Résultats

Les tableaux (10-11-12) rassemblent les différents résultats obtenus.

. Remplacement des ions sulfate

Nous voyons dans cette première série d'expériences que la forme sous laquelle sont apportés les ions NH_4^+ influence la cellulolyse. Il semble préférable d'incorporer du sulfate d'ammonium ou du phosphate d'ammonium dans le milieu de HUNGATE pour conserver une activité cellulolytique élevée.

Le bicarbonate d'ammonium, seul, diminue assez fortement la cellulolyse (environ 50 %). On peut rapprocher ce résultat de celui observé lors de la sélection des milieux de culture. Nous avons vu que le bicarbonate pourrait influencer négativement l'activité de cellulolyse à des doses supérieures à 4 g/litre.

. Influence de la concentration en sulfate d'ammonium

Nous avons fait varier la concentration en sulfate d'ammonium de 0,09 % à 1 %. L'activité cellulolytique observée après 3 jours de culture montre l'influence de la concentration en $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. L'optimum de cellulolyse est atteint pour une valeur de 0,5 %. Au dessus, nous notons une diminution du pourcentage de cellulolyse. Ceci peut être expliciter de deux façons : la première est que le sulfate d'ammonium est généralement pour les bactéries un facteur de croissance et un facteur limitant, à partir d'une certaine concentration il pourrait être inhibiteur. La deuxième concerne le pH des cultures. Nous avons constaté dans cette étude une variation de pH assez importante lors d'une concentration en sulfate d'ammonium de 1 % ; ceci pourrait être dû aux ions SO_4^{--} .

. Influence de la nature de la source azotée

Nous avons remplacé dans le milieu de culture, le sulfate d'ammonium par 3 composés organiques ou inorganiques. Ce sont le nitrate de potassium, l'urée et le glutathion formé de 3 résidus d'acides aminés glycocolle - cystéine - acide glutamique.

Les résultats obtenus (tableau 12) montrent que ces composés ne permettent pas d'améliorer la cellulolyse et qu'il est préférable de conserver comme source d'azote le sulfate d'ammonium à la concentration de 0,09 %.

- Conclusions

Nous venons de voir l'influence de la nature de la source azotée ainsi que de la concentration en sulfate d'ammonium sur le taux de cellulolyse observé après 3 jours de culture. Les résultats obtenus ont montré qu'il est préférable d'incorporer au milieu de culture du sulfate d'ammonium jusqu'à une certaine concentration.

L'optimum de cellulolyse est obtenu pour 0,5 % de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Cependant la différence d'activité est relativement peu élevée entre cette concentration et celle du témoin (0,09 %).

Essais n°	Addition de :	Quantité ajoutée mg/ml	% de cellulolyse
Témoin	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,9	60
2	$\text{NH}_4 \text{HCO}_3$	14	32
3	$\text{CH}_3 \text{COONH}_4$	13,7	49
4	$\text{NH}_4 \text{Cl}$	9,5	52
5	$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	11,7	58

Tableau 10 : Remplacement du sulfate d'ammonium

Essais n°	Concentration en $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	% de cellulolyse	pH final de culture
Témoin	0,09 %	52	6,75
7	0,05 -	46	6,75
8	0,1 -	55	6,75
9	0,5 -	58	6,6
10	1 -	51	6,3

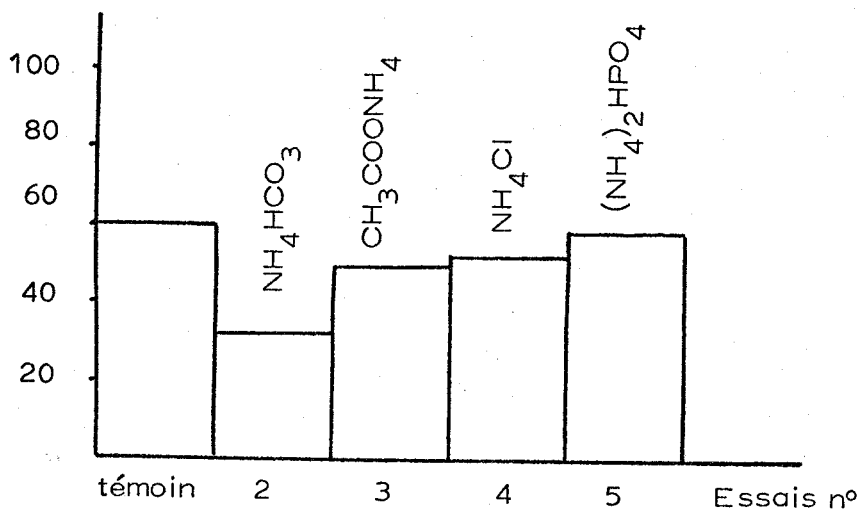
Tableau 11 : Influence de la concentration en $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$

Essais n°	Source azotée	Quantité ajoutée mg/ml	% de cellulolyse
Témoin	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	0,9	52
12	Glutathion	0,5	36
13	KNO_3	0,5	27
14	urée	0,5	47

Tableau 12 : Influence de la nature de la source azotée

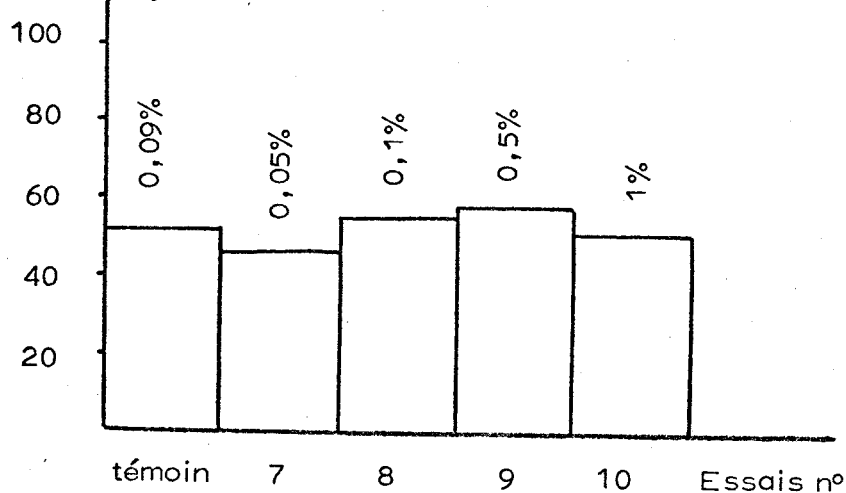


% de cellulolyse



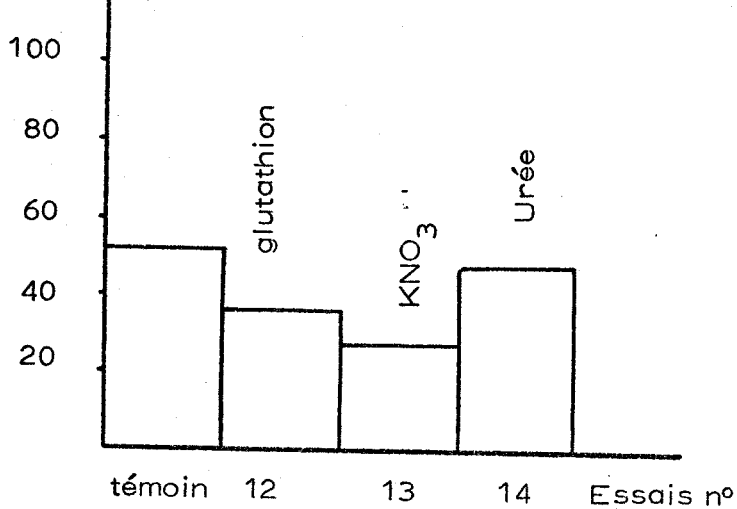
REMPLACEMENT DU $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

% de cellulolyse



INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

% de cellulolyse



INFLUENCE DE LA SOURCE AZOTEE

Nous avons vu également l'importance de la forme sous laquelle les ions NH_4^+ sont apportés dans le milieu : l'activité cellulolytique varie selon la nature du sel d'ammonium. Finalement, le glutathion, l'urée ou le nitrate de potassium ne permettent pas d'obtenir un taux de cellulolyse aussi élevé que celui du témoin c'est-à-dire le milieu de HUNGATE non modifié.

Comme dans le cas de l'étude de l'influence de la source carbonée, il est difficile de dire à quel niveau se fait l'action "inhibitrice" de certains composés azotés. La composition du milieu de culture ne permet pas en effet, de mesurer la croissance par mesure de densité optique ni par mesure du DNA bactérien. On ne sait donc pas si cette action se situe au niveau de la croissance bactérienne ou au niveau de la production d'enzymes cellulolytiques. Remarquons seulement que le sulfate d'ammonium, facteur de croissance ainsi que facteur limitant chez de nombreuses bactéries, permet d'obtenir le taux le plus élevé de cellulolyse pour des cultures de 72 heures.

b) Addition de différents produits au milieu de HUNGATE

Suivant les résultats précédents, nous avons essayé d'optimiser l'activité cellulolytique des cultures de bactéries du rumen en additionnant différents produits au milieu de croissance.

1. Matériel et Méthodes

Dans des flacons de culture de 150 ml, contenant 40 ml du milieu de HUNGATE cellulosé à 0,75 %, nous ajoutons différents composés : extrait de levures, peptones, acides aminés, vitamines acides gras volatils... Après stérilisation à 105° pendant 10 minutes les essais sont ensemencés par 10 ml de liquide de rumen fraîchement prélevé. L'anaérobiose a été réalisée suivant les conditions précédemment décrites.

Les produits ajoutés sont :

- Extrait de levures : DIFCO. Autolysat de levures fraîches
- Hydrolysate de caséine GIRARD - MOUNIER - VITRIUM hydrolyse enzymatique de la caséine du lait
- Peptone ST BIO-KAR Polypeptone trypsique. La polypeptone est un mélange de Trypticase et de Thiotone : peptone pepsique de viande
- Corn Steep : produit atomisé du liquide de macération de maïs
- Trypticase DIFCO : peptone trypsique de caséine
- Casamino-acids DIFCO : hydrolyse acide de caséine purifiée contenant 10 % d'azote total et 14 % de NaCl contenant tous les acides aminés sauf le Tryptophane
- Mélange 1 d'acides aminés (AA₁) :

Alanine	Glycocolle	Valine	Proline
Arginine	Histidine	Cysine	Sérine
Aspartique	Leucine	Methionine	Thréonine
Glutamique	Isoleucine	Phenyl alanine	Tryptophane

Chaque acide aminé est ajouté à la concentration de 0,1 %.

- Mélange 2 d'acides (AA₂)

Valine	Leucine	Isoleucine
Proline	Alanine	Methionine

Chaque acide aminé est ajouté à la concentration de 0,1 %.

- Mélange d'acides gras volatils (Volatil Fatty Acids : V.F.A.)

VFA ₁	CH ₃ COOH	133 mg
	ac isovalérique	6,6 mg
	ac valérique	8 mg
	eau qsp	100 ml
VFA ₂	CH ₃ COOH	17 ml
	ac propionique	6 ml
	ac butyrique	4 ml
	ac isobutyrique	1 ml
	ac valérique	1 ml
	ac isovalérique	1 ml

0,31 ml de ce mélange est dilué dans 100 ml d'eau.

- Vitamine H : biotine à 0,2 % dans l'eau.

2. Résultats et conclusions

Le tableau 13 et la figure 12 rassemblent les résultats obtenus.

Nous voyons que la plupart des composés ajoutés au milieu de culture semblent favoriser l'activité cellulolytique des cultures. Cette augmentation de la cellulolyse est cependant relativement faible 10 à 20 % environ. Le Corn Steep semble être l'un des meilleurs "activateur" de l'activité des bactéries cellulolytiques.

Le produit Casamino-acids et le mélange 1 d'acides aminés diminuent de façon appréciable le taux de cellulolyse. Il est à noter la similitude au point de vue qualitatif de ces deux composés : la présence d'acides aminés. Il est possible qu'en présence de liquide de rumen, certains amino-acides inhibent soit la croissance des bactéries, soit la production d'enzymes.

Il est très difficile dans ces conditions d'explicitier les résultats obtenus. Nous n'avons pas tenté d'approfondir ce sujet mais plutôt étudier l'influence de tel ou tel produit sur l'activité cellulolytique des cultures par l'intermédiaire du milieu de croissance.

c) Essais de substitution du liquide de rumen

Avant de commencer cette étude, nous pouvions nous poser trois questions : la première est : pourquoi avoir incorporé du liquide de rumen dans les milieux de culture ? Ensuite nous nous sommes demandés pourquoi essayer de substituer ce composant ? La troisième question est par quel composé ou mélange de composés pouvons-nous remplacer le liquide de rumen ? Voyons les réponses et argumentations.

Les microorganismes du rumen requièrent de nombreuses substances pour leur croissance ; ces exigences sont telles qu'en l'absence d'un composé, leur développement est pratiquement nul. Ces facteurs de croissance sont évidemment présents dans le liquide de rumen. DOETSCH (21)

Essais n°	Addition de :	Concentration	% de cellulolyse
Témoin 1	-	-	69,8
2	Extrait de levures	2 %	80,5
3	Hydrolysat de caséine	2 %	62,6
4	Peptone ST	2 %	75
5	Corn Steep	2 %	86,2
6	Trypticase	2 %	81,3
7	Casamino-acids	2 %	55,1
8	AA ₁	0,2 ml	60
9	AA ₂	0,2 ml	69,8
10	VFA ₁	0,1 ml	73,4
11	VFA ₂	0,1 ml	75,7
12	vitamine H	0,1 ml	82,6

Tableau 13 : Addition de divers composés au Milieu de HUNGATE



% de solubilisation

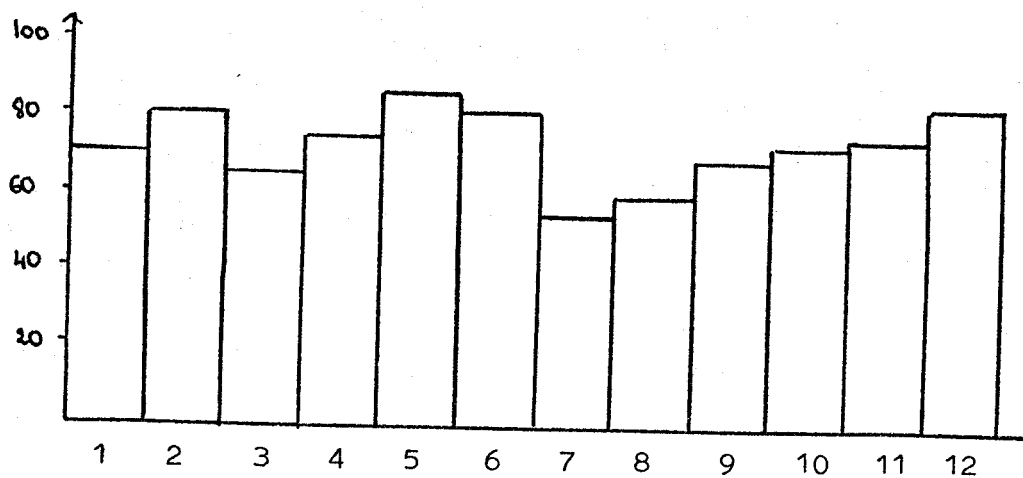


Figure 12 a
liquide de rumen
[] = 1

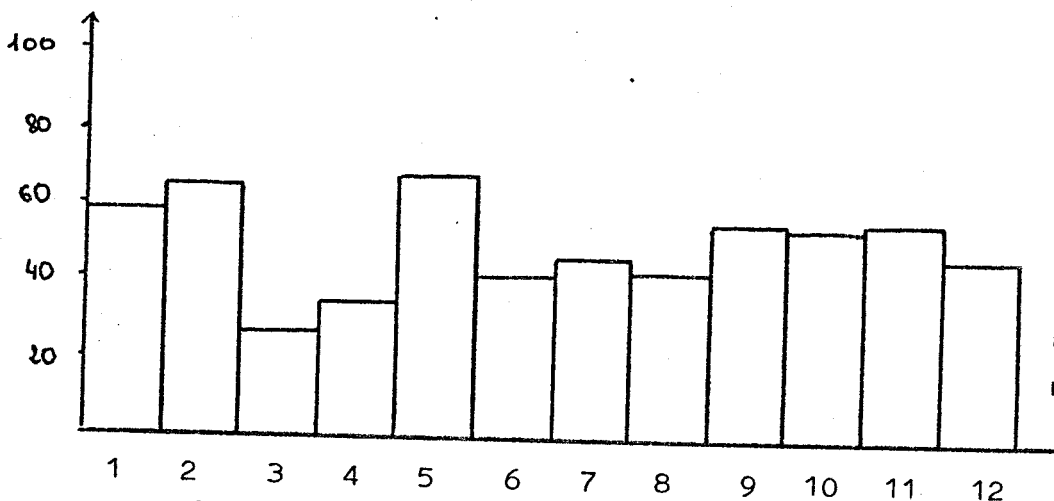


Figure 12 b
liquide de rumen
[] = 0,5

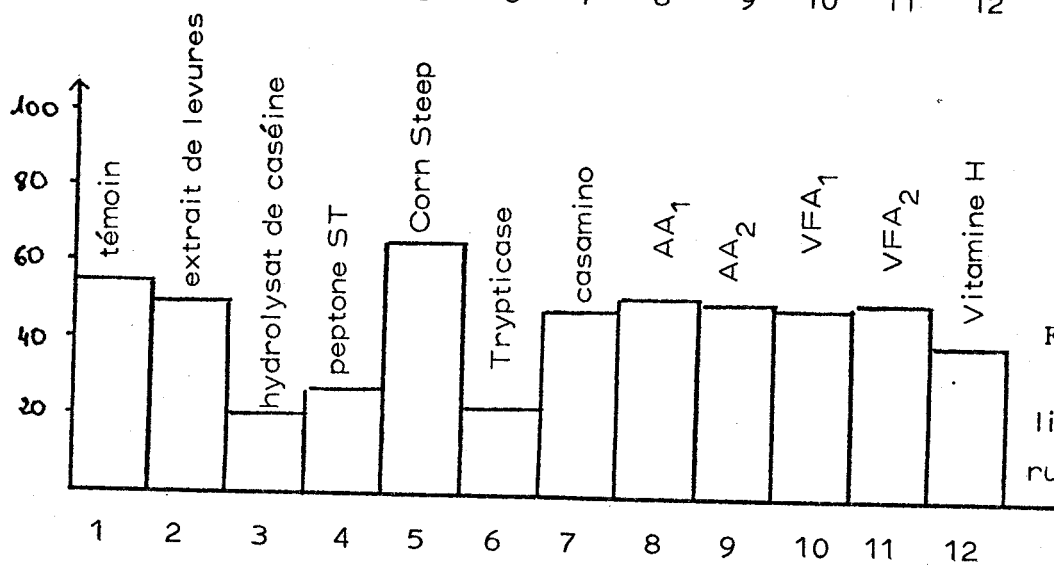


Figure 12 c
liquide de rumen [] = 0,25

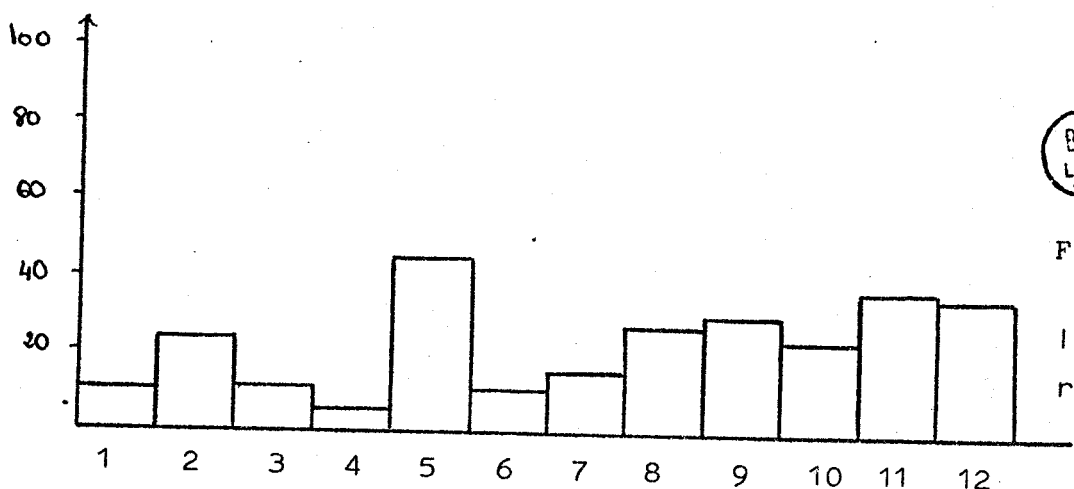


Figure 12 d
liquide de rumen
[] = 0

a montré que le taux de respiration de suspensions lavées de bactéries du rumen augmente considérablement quand on ajoute à ce substrat du liquide de rumen filtré. D'autres auteurs BURROUGHS (1950-1951, 12-13) HUNGATE (1950, 46), HUHTANEN (1952, 43), Mc NEILL (1954, 63) ont également montré que des facteurs présents dans le liquide de rumen et jusqu'alors non identifiés stimulaient l'activité cellulolytique des microorganismes du rumen. Ces résultats expliquent donc pourquoi leur auteurs incorporent du liquide de rumen filtré à leur milieu. Cette incorporation se fait d'ailleurs à des concentrations différentes : MANN (1968, 61) introduit 10 % de liquide de rumen, BRYANT et ROBINSON (1961, 8) 20 % HUNGATE (1957, 47) et KISTNER (1960, 53) 30 %, BRYANT et BURKEY (1953, 5) 40 %.

Nous avons essayé de substituer à cette incorporation de liquide de rumen un autre composé. En effet, nous avons vu dans la première partie les variations de la population bactérienne du rumen selon le moment de la journée ainsi qu'en fonction de l'époque de l'année. Ceci suggère donc une variabilité de la qualité du liquide de rumen d'où une influence au niveau des milieux de culture. De plus la manipulation de ce constituant est très délicate. RAVERDY (72) a montré l'influence de la manipulation du liquide de rumen sur la croissance des bactéries. Ainsi un milieu au liquide de rumen filtré en aérobiose n'autorise qu'une faible croissance malgré une régénération au bain-marie bouillant. De plus, le pourcentage d'incorporation est trop élevé ; pour une étude en fermenteur de 20 litres, il faudrait 8 litres de liquide de rumen soit dans les conditions de prélèvement le contenu d'une panse de boeuf.

Depuis quelques années, des progrès importants ont été accomplis dans la physiologie des bactéries du rumen. C'est ainsi que différents travaux ont permis de démontrer l'importance de certaines vitamines du groupe B, des purines et de l'uracile (BENTLEY, JOHNSON 1954, 2) des acides gras volatils de l'urée et de l'ammoniac ainsi que de certains acides aminés tels que la valine, leucine, isoleucine, proline, alanine et méthionine (BRYANT et ROBINSON 1961, 8) pour l'activité cellulolytique des microorganismes du rumen.

Récemment on a pu montrer que certains ions comme le sodium (CADWELL et HUDSON 1974, 14) ainsi que des antibiotiques : pénicilline, streptomycine (SLAVCHEV 1972, 81) agissaient dans le même sens que les composés cités précédemment.

Nous avons donc essayé de substituer le liquide de rumen incorporé dans le milieu de HUNGATE par un produit peu coûteux et facilement disponible.

Cette étude s'est déroulée en trois étapes. Tout d'abord nous avons réalisé des essais de culture en diminuant le pourcentage de liquide de rumen incorporé au milieu de HUNGATE. Puis à partir des résultats obtenus, nous avons cherché à déterminer les concentrations optima des différents produits ajoutés. Finalement, nous avons essayé de réunir toutes ces données pour proposer une formule de milieu favorable à la croissance des bactéries cellulolytiques tout en conservant leur activité.

1. Dilution du liquide de rumen incorporé

Les conditions de culture ainsi que la nature et concentration des différents produits additionnés au milieu de HUNGATE ont été décrites précédemment.

Nous avons effectué quatre séries d'expériences en modifiant la concentration en liquide de rumen : concentrations 1, 0,5, 0,25 et 0 c'est-à-dire 40, 20, 10 et 0 ml de liquide de rumen pour 100 ml volume final de milieu de base.

La figure 12 a, b, c, d (page 81) et le tableau 14 montrent les résultats obtenus : le pourcentage de cellulolyse des cultures de 72 heures.

Nous constatons que plus la concentration en liquide de rumen diminue, plus l'activité cellulolytique décroît. En son absence, nous notons que la plupart des produits ajoutés sont favorables au taux de dégradation de la cellulose. Seule la peptone ST n'agit pas dans le

même sens. Le Corn Steep, le mélange 2 d'acides gras volatils et la vitamine H (biotine) semblent être les meilleurs substituants du liquide de rumen.

Nous poursuivrons donc cette étude en se basant sur ces trois composés.

2. Substitution du liquide de rumen

- Le Corn Steep

Nous avons étudié l'influence de la concentration en Corn Steep sur les cultures des bactéries cellulolytiques du rumen.

Le maximum de cellulolyse est obtenu lorsque le milieu de culture contient 2 % de Corn Steep. Au delà de cette valeur, l'activité cellulolytique diminue très rapidement pour être pratiquement nulle : 2 % de cellulolyse pour une concentration de 5 % en Corn Steep. Figure 13.

Ceci montre bien les exigences strictes des bactéries du rumen. Le corn steep contient des vitamines, des facteurs de croissance ; à partir d'une certaine dose, ceux-ci inhibent le développement des microorganismes. Il faut donc mesurer avec soin la quantité de ce produit ajouté au milieu de culture.

- Les acides gras volatils

Nous avons donné précédemment la composition du mélange acides gras volatils 2. Les différents essais ont montré que la concentration optimale est de 0,1 ml. Au dessus de cette valeur, l'activité cellulolytique des cultures est pratiquement conservée.

Dans le rumen, le pourcentage d'acides gras volatils est régulé par les phénomènes d'absorption. Le mélange 2 représente grosso modo cette donnée.

Essais n° :	Produits ajoutés :	Liquide de rumen			
		[] = 1	[] = 0,5	[] = 0,25	[] = 0
1	Témoin	69,8	58,5	54	10
2	Extrait de levures	80,5	65	50	24
3	Hydrolysate de caseine	62,6	27,2	20,2	12
4	Peptone S T	75	35,4	27,4	5,5
5	Corn Steep	86,2	67,3	65	42,6
6	Trypticase	81,3	42	23	11,2
7	Casamino acids	55,1	47,3	48	16,4
8	AA 1	60	43,1	52	28
9	AA 2	69,8	56,2	51,8	31
10	VFA 1	73,4	55,2	49,3	24,3
11	VFA 2	75,7	56,1	51	38,4
12	Vitamine H	82,6	47,1	40	36,2

Tableau 14 : Pourcentage de cellulolyse des bactéries du rumen cultivées 3 jours sur milieu de HUNGATE modifié



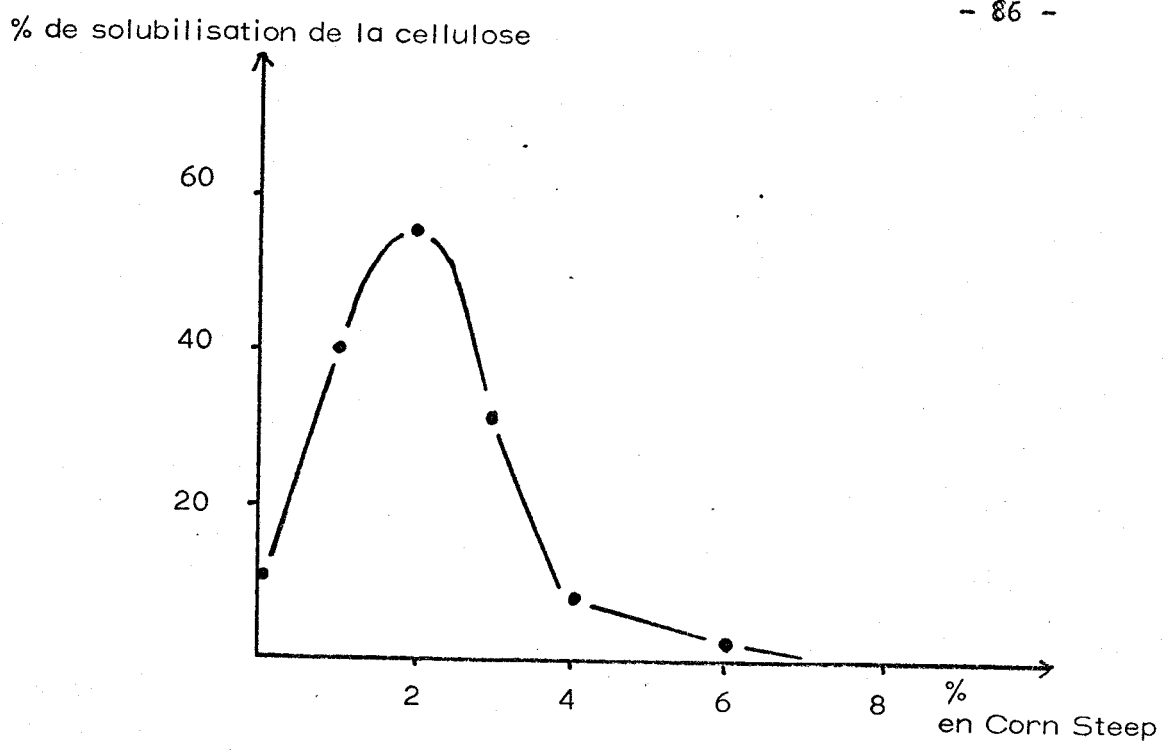


Figure 13 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CORN STEEP

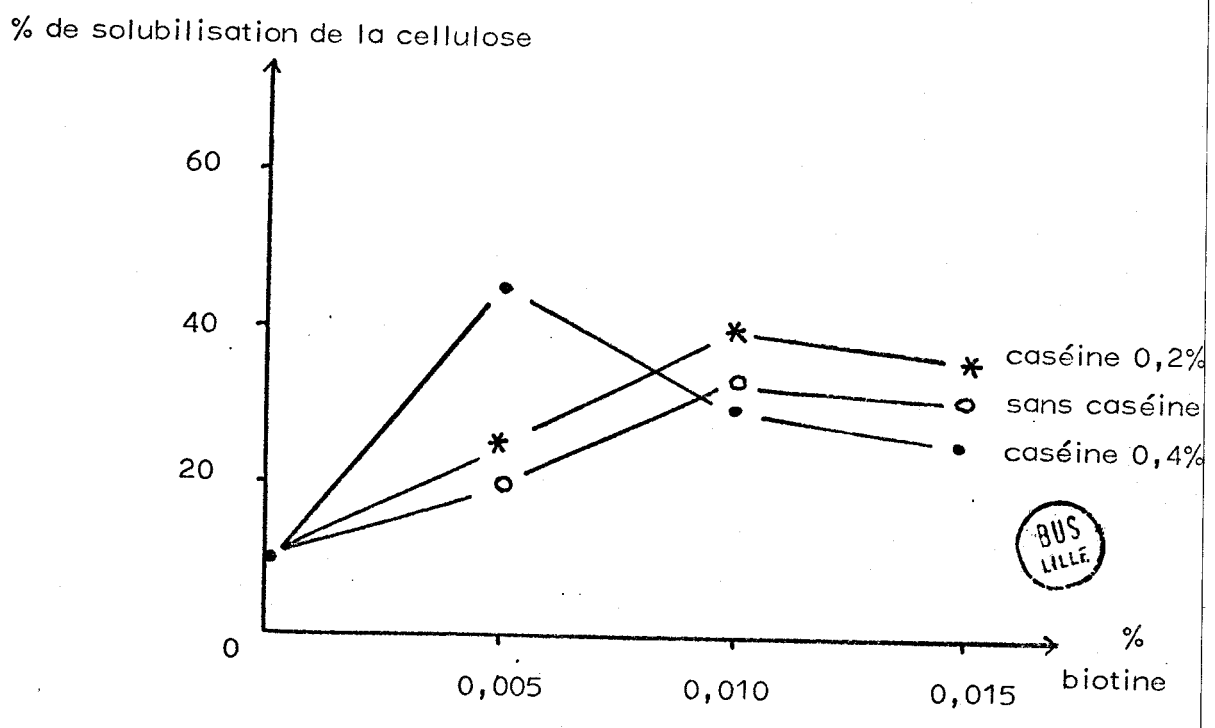


Figure 14: INFLUENCE DE LA VITAMINE H AVEC OU SANS CASEINE

- La biotine

Nous avons étudié l'influence de la caséine sur l'activité cellulolytique des cultures des bactéries du rumen. Cette étude a été faite en présence ou non d'hydrolysate de caséine dans la composition du milieu de croissance.

La figure 14 nous montre les résultats obtenus c'est-à-dire le pourcentage de dégradation de la cellulose obtenu à partir de cultures de 3 jours.

Les essais réalisés en l'absence de caséine hydrolysée montrent que l'optimum de cellulolyse est obtenue pour une concentration de 0,01 % de biotine. Par rapport au témoin c'est-à-dire milieu de base sans liquide de rumen, le pourcentage de dégradation est multiplié par environ trois fois et demi.

Les mêmes expériences réalisées cette fois en présence d'hydrolysate de caséine à des concentrations variables 0,2 % et 0,4 % montrent une optimisation de la cellulolyse ; par rapport aux expériences avec biotine seule. Il semble donc avec un effet synergique de ces deux facteurs sur la croissance des bactéries cellulolytiques.

3. Mélange de ces différents substituants

A la lumière des résultats précédents nous avons donc proposé une composition de milieu de culture des bactéries cellulolytiques du rumen. A partir de ce nouveau milieu de base, nous essaierons de l'améliorer en étudiant l'influence de certains composés.

- Le nouveau milieu

Nous avons conservé la composition en sels du milieu de HUNGATE. Précédemment, nous avons vu que la solution minérale reproduit la composition de la salive et que la proportion de bicarbonate de sodium comprise dans le milieu n'inhibe pas la croissance des bactéries.

L'agent réducteur est le chlorhydrate de cystéine à la concentration de 0,05 %. Au dessus de cette valeur, ce produit est généralement considéré comme toxique.

Nous remplaçons le liquide de rumen par un mélange de Corn Steep et d'acides gras volatils. Nous éliminerons la biotine ainsi que l'hydrolysate de caséine car dans certains cas nous avons observé une diminution de l'activité cellulolytique des cultures. Le corn steep est employé à la concentration de 2 % et la solution d'acides gras volatils à 1 % (volume/volume). La principale source carbonée est de la poudre de cellulose (Whatman) à raison de 0,75 %.

- Addition de différents produits

Les études bibliographiques menées sur les exigences des bactéries cellulolytiques du rumen ont permis de mettre en évidence l'influence de deux composés : un antibiotique la pénicilline et une vitamine : la cyanocobalamine ou vitamine B 12.

. Influence des antibiotiques

Nous avons élargi le champ de cette étude en travaillant sur plusieurs antibiotiques : la pénicilline, l'oxytétracycline ou terramycine et la chlortétracycline ou auréomycine. Ceux-ci ont été ajoutés à différentes concentrations au nouveau milieu à base de corn steep et d'acides gras volatils. Après ensemencement par du liquide de rumen frais et incubation pendant trois jours, nous avons dosé l'activité cellulolytique.

Pour la pénicilline, la courbe (figure 15) montre un maximum de dégradation pour une concentration finale de 6 μ g par millilitre. Passé cette valeur, l'activité cellulolytique décroît rapidement ; l'antibiotique retrouverait son rôle d'inhibiteur de la croissance des bactéries.

Nous retrouvons sensiblement les mêmes résultats avec les deux autres antibiotiques. Pour l'oxytétracycline, l'optimum de dégradation est obtenu pour une concentration finale de 5 μ g par millilitre contre

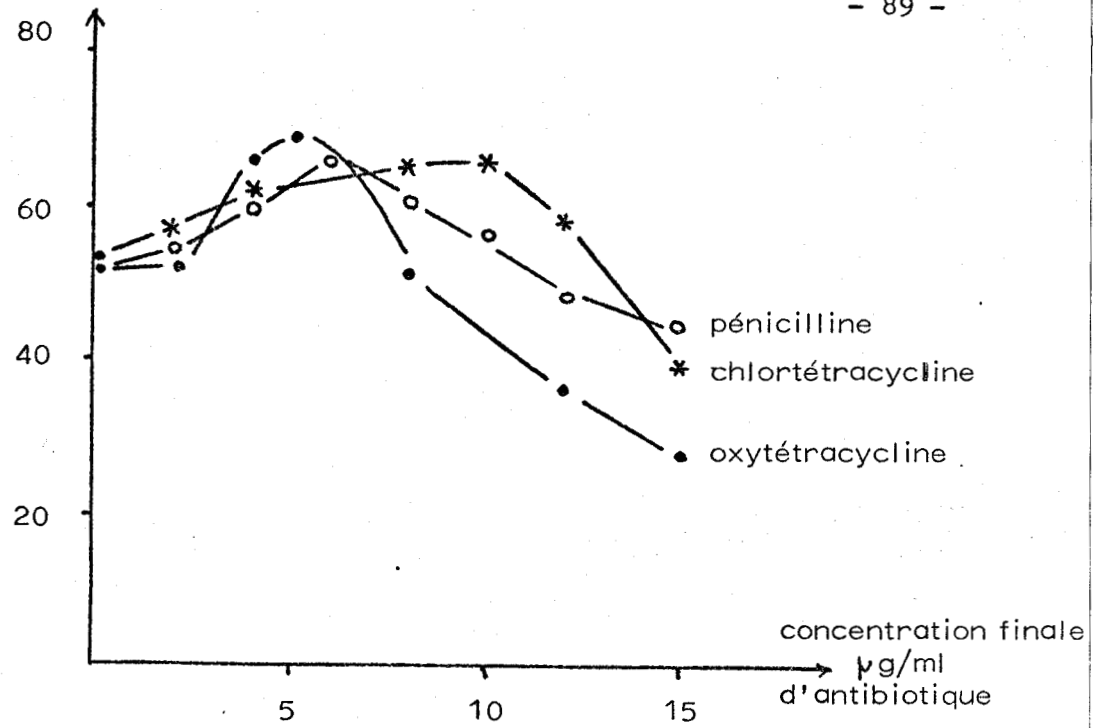


figure 15 : INFLUENCE DES ANTIBIOTIQUES INCORPORES AU MILIEU DE CULTURE

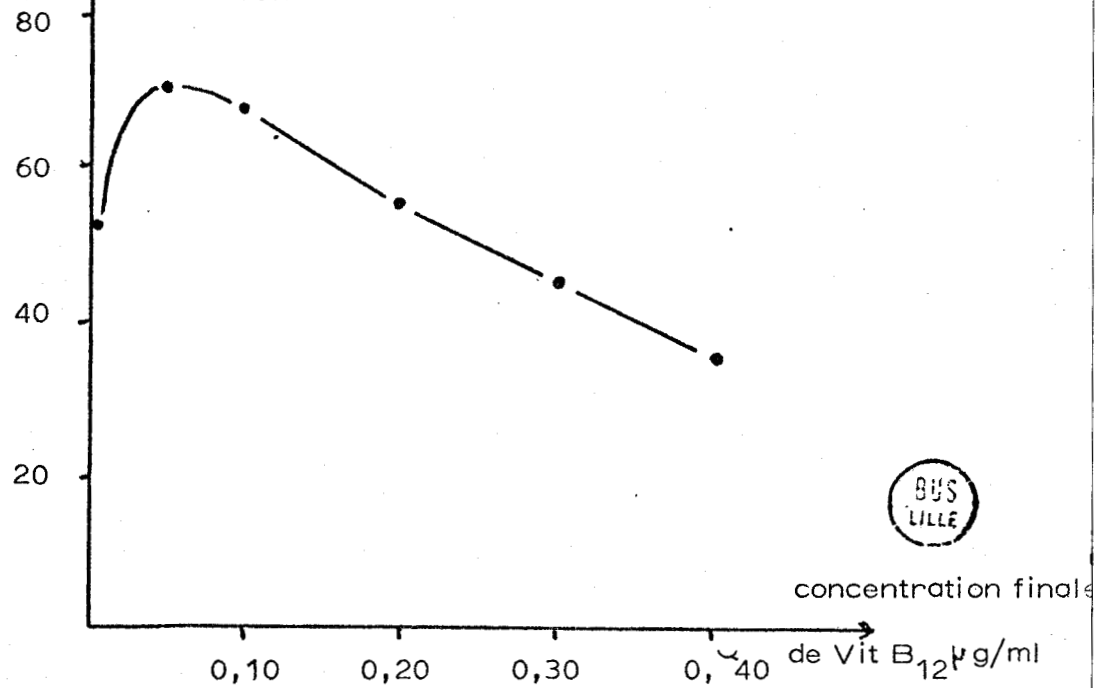


Figure 16 : INFLUENCE DE L'ADDITION DE VITAMINE B₁₂ AU MILIEU DE CULTURE

10 μ g/ml pour la chlortétracycline.

L'addition de ces antibiotiques au milieu de culture permet donc d'améliorer l'activité cellulolytique cependant ce résultat est relativement faible environ + 18 % pour la pénicilline et l'oxytétracycline et + 16 % pour l'auréomycine par rapport au témoin.

. Influence de la cyanocobalamine (vitamine B₁₂)

Plusieurs auteurs (HALL, CHENG et BURROWS, 36 ; SCOTT et DEHORITY, 78) ont mis en évidence les besoins en vitamines du groupe B des bactéries cellulolytiques du rumen. Parmi celles-ci la vitamine B₁₂ semble être la plus nécessaire. Nous avons donc étudié l'influence de son incorporation au milieu à base de corn steep et d'acides gras volatils.

La figure 16 montre les résultats obtenus en fonction de la quantité de vitamine ajoutée.

L'optimum de cellulolyse est obtenu par une concentration de 0,05 μ g par millilitre de milieu de culture. Passé cette valeur, l'activité cellulolytique diminue. Cet effet "inhibiteur" de la cyanocobalamine montre bien également les exigences très strictes des bactéries du rumen.

L'amélioration du pouvoir de dégradation de la cellulose par les cultures est dans ce cas-ci assez sensible ; elle est comprise entre 25 et 30 % par rapport au milieu de base sans vitamine.

d) Conclusion

Au terme de ces études, nous avons vu qu'il est possible de cultiver les bactéries cellulolytiques du rumen. Nous avons également noté l'importance de la composition du milieu de culture. Différents essais ont permis de sélectionner un milieu permettant la croissance de ces bactéries tout en conservant leur activité envers la cellulose. Ce milieu est celui proposé par HUNGATE à base de liquide de rumen filtré et stérilisé. Cependant cette incorporation présente un inconvénient notable :

la variation de la qualité de ce produit en fonction du temps de prélèvement ; celle-ci varie selon le moment de la journée ainsi que suivant le moment de l'année. Ceci entraîne des modifications de l'activité cellulolytique des cultures. De plus, le liquide de rumen nécessite de nombreuses précautions de manipulation.

Devant ceci, nous avons essayé de modifier le milieu de HUNGATE. Dans un premier temps, nos recherches ont porté sur l'influence de la nature de la source azotée et carbonée. Nous avons vu le rôle d'"activateur" du lactose sur la synthèse des enzymes cellulolytiques ; cependant la cellulose semble être le meilleur inducteur. Le sulfate d'ammonium présente un optimum d'activité pour une concentration voisine de 0,1 % et peut être remplacé par du phosphate d'ammonium di ammonique.

Nos efforts se sont concentrés sur le problème de la substitution du liquide de rumen au milieu de HUNGATE. Nous avons tout d'abord, essayé de diminuer le taux de cette incorporation puis poursuivre cette étude en remplaçant le liquide de rumen par un produit peu coûteux et facilement disponible.

Les résultats des différentes expériences ont montré que cette substitution est possible. Ainsi le Corn Steep, produit atomisé du liquide de macération de maïs, associé à des composés divers (acides gras volatils, vitamine B₁₂) permet la croissance des microorganismes cellulolytiques du rumen de boeuf ainsi que d'accroître l'activité cellulolytique des cultures.

Ces résultats ont été obtenus en mesurant l'activité cellulolytique de cultures de bactéries de rumen après 3 jours d'incubation à 39°. Ainsi, il nous est difficile de savoir à quel niveau agissent ces produits si c'est sur la production des enzymes cellulolytiques ou sur la croissance des bactéries. De ce fait, il s'avère nécessaire d'étudier de plus près l'évolution de la microflore lors d'une culture sur le nouveau milieu. Nous aborderons ce problème dans le chapitre suivant où nous essayerons de nous placer dans des conditions de production semi-industrielle c'est-à-dire au niveau des fermenteurs.

III. ESSAIS DE CULTURE DES BACTERIES CELLULOLYTIQUES AU NIVEAU SEMI INDUSTRIEL

Notre but de travail concerne la production d'enzymes capables de dégrader la cellulose de façon à produire des sources carbonées, sucres plus facilement assimilables par les organismes. Cependant, il semble évident que cette production d'enzymes doit pouvoir être applicable à un échelon supérieur qu'au stade laboratoire. C'est pourquoi, nous avons étudié la culture des bactéries cellulolytiques en fermenteurs pilotes.

a) La préculture

Nous avons opéré en fermenteurs pilotes de 20 litres contenant 10 litres de milieu. L'ensemencement étant réalisé à raison de 10 % du volume final, nous avons cherché à ensemer par l'intermédiaire d'une préculture plutôt que directement à partir du liquide de rumen.

Des études ont été effectuées de façon à déterminer l'importance du volume de préculture à apporter ainsi que l'âge de la préculture.

1. Importance du volume de préculture

Ces essais ont été réalisés en fioles à transfusion de 150 ml. Le milieu de culture composé des solutions minérales, cellulose 0,75 % corn steep 2 %, vitamine B₁₂ 0,05 µg/ml, cystéine, ac gras volatils, est réparti à raison de 90 ml par flacon. Après stérilisation et bullage de gaz carbonique, 10 ml de liquide de rumen fraîchement prélevés servent à ensemer le milieu. Après 48 heures d'incubation à 39°, les précultures sont introduites à différentes concentrations dans une fiole de 560 ml contenant du milieu de culture de même composition. A divers moments, 2 ml de la culture sont prélevés et servent à mesurer l'activité cellulolytique suivant la Technique d'Halliwel c'est-à-dire un mélange de 50 mg de cellulose 5 ml de Tampon CO₂-sels-NaHCO₃ et 2 ml de culture bactérienne sont mis à incuber à 39°. Après ce délai, on dose par gravimétrie la cellulose résiduelle.

La figure 17 montre les résultats obtenus. La première remarque que nous pouvons faire concerne le taux de cellulolyse des cultures. Le maximum est d'environ 85 à 90 % de solubilisation de la cellulose ce qui montre que l'ensemencement d'un milieu de culture peut être effectué à partir d'une préculture sans perte de l'activité des bactéries cellulolytiques. La deuxième constatation est la suivante : le taux de cellulolyse ne varie que légèrement suivant le volume d'ensemencement excepté dans le cas où 1 % de préculture sert à ensemercer. De plus nous voyons que pour des concentrations élevées en préculture 20 %, 50 % nous obtenons sensiblement la même activité cellulolytique au cours du temps.

Le maximum de cellulolyse est atteint vers la 40^{ème} heure sauf pour le cas de 50 %. Ce maximum est conservé pendant plusieurs jours de culture environ 4 jours puis le pourcentage de solubilisation de la cellulose diminue rapidement.

Au vu de ces résultats, il semble donc préférable d'ensemencer les milieux de culture par une préculture à raison de 10 % ; la préculture étant elle-même ensemencée par 10 % de liquide de rumen fraîchement prélevé ce qui fait en fait de compte 1 % de liquide de rumen dans un milieu de culture. A ce taux, la variation de la qualité du liquide est négligeable exception faite de la qualité en germes cellulolytiques.

2. Influence de l'âge de la préculture

Les expériences ont été réalisées de la même façon que précédemment : 90 ml de milieu nouveau (sels minéraux de HUNGATE, corn steep, Vitamine B₁₂, acides gras volatils, cellulose, cysteine) sont ensemencés par 10 ml de liquide de rumen. A différents temps, ces précultures vont servir à ensemercer 900 ml de milieu contenus dans des fioles. Nous observerons également l'activité cellulolytique des cultures au cours du temps.

Nous nous apercevons (figure 18) que l'activité cellulolytique est conservée et est pratiquement la même quelque soit la durée d'incubation de la préculture 1, 2 ou 3 jours. Par rapport au Témoin c'est-à-dire 900 ml de milieu ensemencés directement par 100 ml de liquide de rumen, la préculture d'un jour donne les meilleurs résultats. Bien que la cellulolyse soit

% de solubilisation de la cellulose

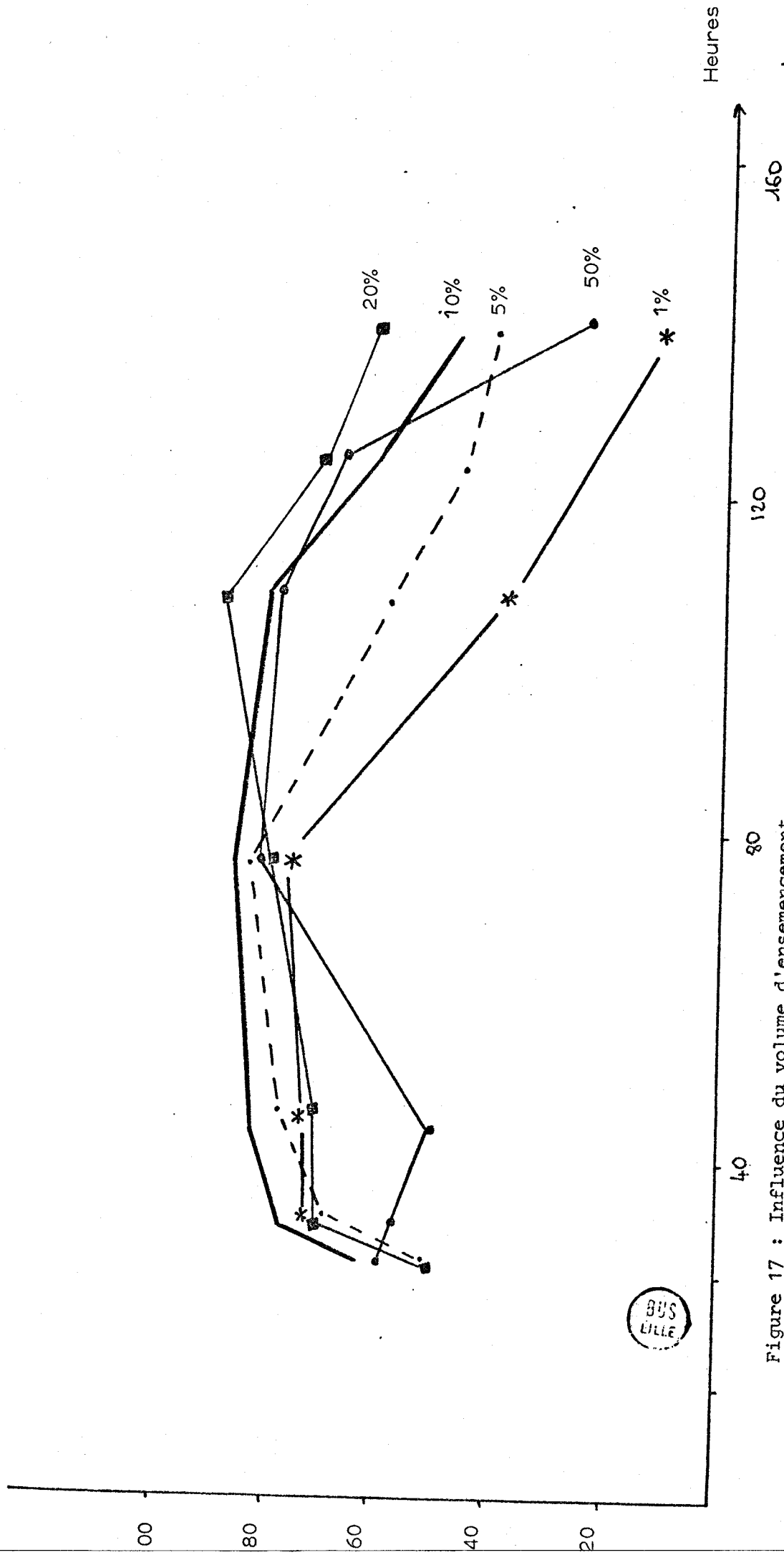


Figure 17 : Influence du volume d'ensemencement

faible au départ, phénomène de dilution, temps de croissance insuffisant, celle-ci augmente très rapidement : 10 % à la 24ème heure, 74 et 80 % à 44 et 48 heures. Puis cette activité est conservée pendant une cinquantaine d'heures pour décroître assez rapidement 20 % au bout de 160 heures. Pour les culturesensemencées à partir des précultures 2 jours et 3 jours, l'activité démarre très vite pour atteindre 50 % après 24 heures. Ceci semblerait être dû à ce que les bactéries anaérobies peuvent croître plus longtemps avant d'opérer la dilution par ensemencement dans le milieu neuf. De plus, il se pourrait également que le temps de latence dû à l'adaptation sur le milieu soit diminué.

En conclusion, il est préférable d'ensemencer les milieux à partir d'une préculture âgée d'un jour.

b) Etude en fermenteur

1. Le matériel et l'anaérobiose

Cette étude a été menée en fermenteur pilote (Biolafitte) de 20 litres. Neuf litres de milieu (tableau 15) y ont été introduits après stérilisation de la cuve vide pendant 2 heures à 121°. La stérilisation du milieu s'effectue à 105° pendant une heure.

Au début des essais, l'anaérobiose était assurée par un bullage de gaz carbonique dans le milieu soumis à une faible agitation. De plus, pour éviter tout contact avec l'oxygène de l'air un léger courant d'azote était envoyé à la surface du liquide. Cependant les traces d'oxygène présentes dans le CO₂ du fait de l'agitation ne permettent pas de cultiver les bactéries anaérobies du rumen. De ce fait, nous avons supprimé tout bullage et pour assurer l'anaérobiose nous ajoutons de l'huile de paraffine. Celle-ci de densité plus faible forme une couche supérieure isolant ainsi le milieu de l'air ambiant.

L'ensemencement a été effectué à partir d'une préculture âgée d'un jour et ayant été inoculée par 10 % de liquide de rumen.

1350 ml de K_2HPO_4 à 0,3 %

1350 ml de la solution :

KH_2PO_4 0,3 %

$(NH_4)_2SO_4$ 0,6 -

NaCl 0,6 -

$MgSO_4$ 0,06 -

$CaCl_2$ 0,06 -

9,0 ml de resazurine à 0,1 %

150 ml cystéine 3 %

600 ml $NaHCO_3$ 6 %

90 g poudre de cellulose Whatman

180 g de Corn Steep atomisé

90 ml du mélange 2 d'acides gras volatils au 1/10

5460 ml d'eau distillée

Après passage de gaz carbonique, le pH est ajusté à 6,8 par de la soude 10 N.

Stérilisation 1 H à 105°

On ajoute 45 milligrammes de Vitamine B_{12} .

Tableau 15 : Composition du milieu de culture



% de solubilisation de la cellulose

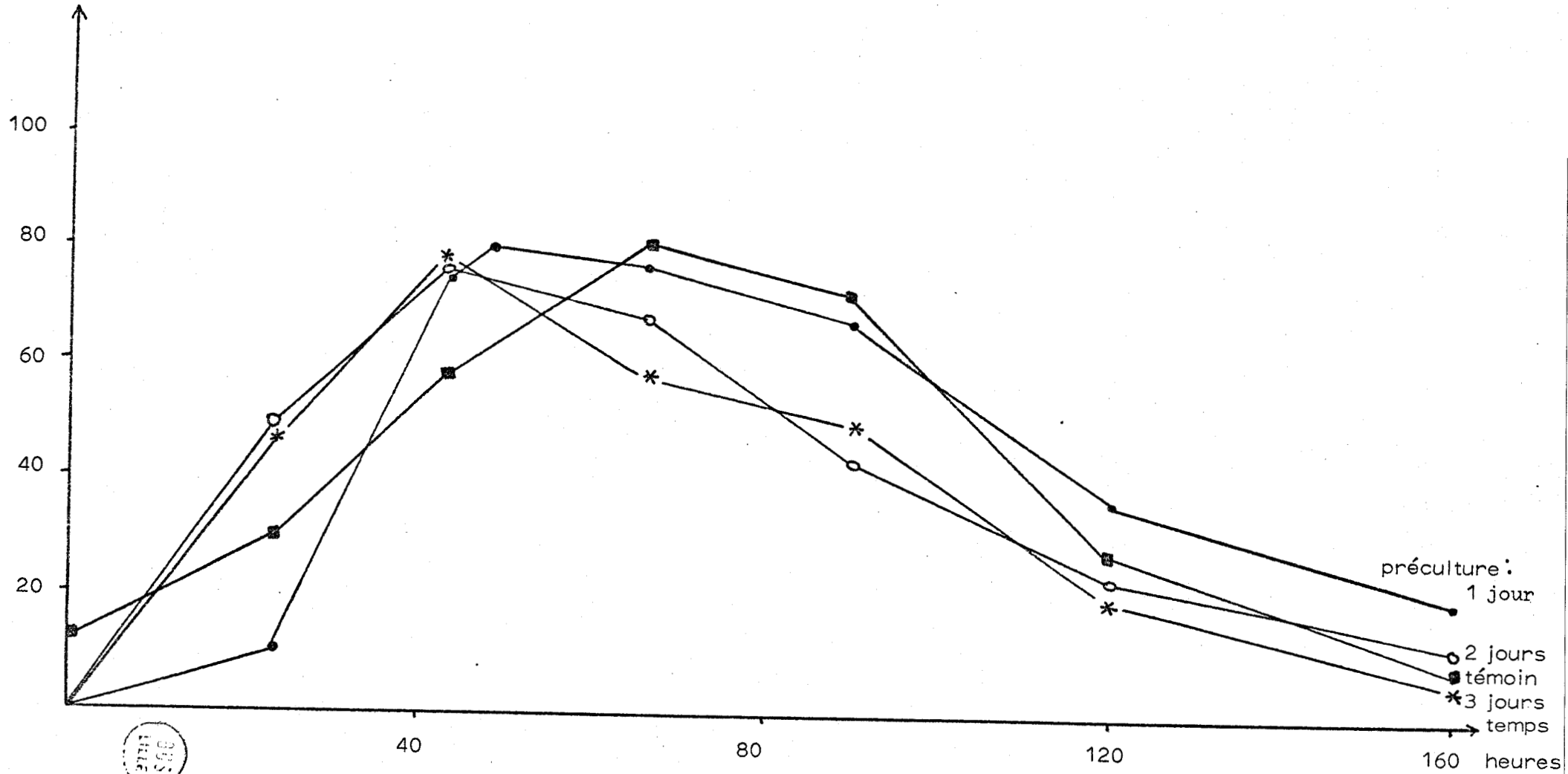


Figure 18 : INFLUENCE DE L'AGE DE LA PRECULTURE

Différents dosages ont été effectués : dosage des sucres réducteurs, des sucres totaux solubles, de l'activité cellulolytique ainsi que de l'activité cellulasique présente dans le surnageant des cultures. Cependant, auparavant nous étudierons l'évolution de la microflore.

2. La microflore des cultures

Pour évaluer l'évolution de la microflore dans les cultures, nous avons dû effectuer des comptages de bactéries. En effet, les méthodes classiques, la mesure de densité optique, la méthode des poids secs de culture, le taux de DNA... pour estimer le nombre de microorganismes ne sont pas applicables à notre cas.

Ces comptages sont généralement effectués par hémocytomètre ou par chambre de comptage Petroff-Hauser (WARNER, 88), par observation microscopique directe ou par étalement sur milieu gélosé.

Ces deux premières techniques ne peuvent nous intéresser du fait que seules les bactéries vivantes doivent être comptées. Ainsi nous avons suivi l'évolution de la microflore par numération sur boîtes de Pétri.

- Matériel et Méthodes d'étude

Le milieu gélosé est de même composition que le milieu de culture liquide excepté l'addition d'agar (DIFCO) à la concentration de 20‰. Les bactéries cellulolytiques du rumen étant anaérobies strictes, elles ne peuvent être cultivées que dans des milieux pré-réduits. Les milieux sont stérilisés par autoclavage et avant refroidissement, on chasse l'air contenu dans les flacons par un courant de gaz carbonique. Les numérations sont effectuées sur boîtes de Petri. Une fois le milieu reparti, 15 à 20 ml par boîte, celles-ci sont mises dans une jarre d'anaérobiose de façon à laisser solidifier la gélose, à l'abri de l'air.

Les dilutions sont faites dans une solution de composition suivante :

0,05 % chlorhydrate cystéine

0,3 % Na_2CO_3

0,0001 % résazurine

eau distillée

On répartit 9 ml de cette solution par tube. Après stérilisation, on fait passer un courant de gaz carbonique de façon à chasser l'air et à ajuster le pH à 6,8.

0,1 ml de chaque dilution est étalé à la surface de la gélose. Puis la boîte de Petri est mise dans une jarre d'anaérobiose à atmosphère de CO_2 . Ces opérations doivent être exécutées avec célérité de façon à limiter au plus possible le contact avec l'oxygène de l'air.

Le temps d'incubation est de 2 à 3 jours à 37°.

- Evolution du nombre de bactéries



Nous avons ainsi suivi l'évolution du nombre de bactéries au cours des cultures en fermenteur. La figure 19 représente les résultats obtenus. Nous voyons que celle-ci montre trois stades dans l'évolution :

- une phase de croissance entre le 1^o et 3^{ème} jour suivi par
- une phase stationnaire durant une cinquantaine d'heures puis
- une phase de déclin

L'activité cellulolytique est en étroite corrélation avec le nombre de bactéries vivantes. Nous avons étudié la relation entre le nombre de microorganismes et l'activité cellulolytique durant les phases de croissance et de déclin (figure 20). Nous nous apercevons que ces relations peuvent être traduites par des droites de pente différente : une pente faible pendant la première phase et une pente plus forte pour le déclin. Cette dernière observation peut s'expliquer par la présence d'enzymes cellulolytiques synthétisés et libérés dans le milieu à partir des bactéries "mortes" mais ayant encore leurs cellulases actives.

- Evolution des espèces

D'après certains auteurs (HUNGATE, 45 ; GIESECKE, 28) le nombre d'espèces de bactéries cellulolytiques présents dans le liquide de rumen est évalué à 8 dont 7 sont fréquemment rencontrées. Nous avons essayé de suivre l'évolution au niveau des espèces lors des cultures. Pour cela nous avons adopté la même technique que précédemment c'est-à-dire par numération sur boîte de Pétri. Chaque colonie bien isolée est repiquée sur milieu gélosé incliné. Ainsi quatre espèces bactériennes ont pu être mises en évidence. Le tableau 16 rassemble les différentes propriétés biochimiques des souches.

Cependant, les trois autres souches couramment rencontrées dans le rumen des bovins, peuvent également être présentes dans les cultures mais ce serait alors à des concentrations très inférieurs par rapport aux autres souches et de ce fait, ne sont pas isolées.

La mesure de l'activité cellulolytique de culture de 3 jours montre un faible pouvoir cellulolytique des bactéries. Il y aurait donc un effet de synergie lors de l'association de ces souches sur la dégradation de la cellulose.

Souches	Activité Cellulolytique
A	17 %
B	22 %
C	13 %
D	15 %

Souche	Aspect	Culture sur Rosenow			Mobilité	Production d'acide sur (a)			
		Fermentation du glucose	Pouvoir réducteur	Production de gaz		Glucose	Xylose	Cellobiose	Lactose
A	Colonie jaunâtre de 3 à 4 mm de diamètre Coccis généralement par 2 Gram positif	+	-	- +	+	5,3	5,8	5,3	5,5
B	Colonie d'aspect transparent Bâtonnets gram négatif	+	+	- +	+	5,2	5,4	5,25	6,75
C	Colonie blanche Coccis par 2 ou formant de courtes chaînettes gram+	+	-	+	+	5,95	6,2	5,8	5,8
D	Colonie de forme lentillaire en profondeur Forme bacillaire - Spores Gram+	+	-	-	-	5,5	6,05	6,2	5,3

(a) pH des cultures après 72 heures



Tableau 16 : Propriétés des principales souches isolées

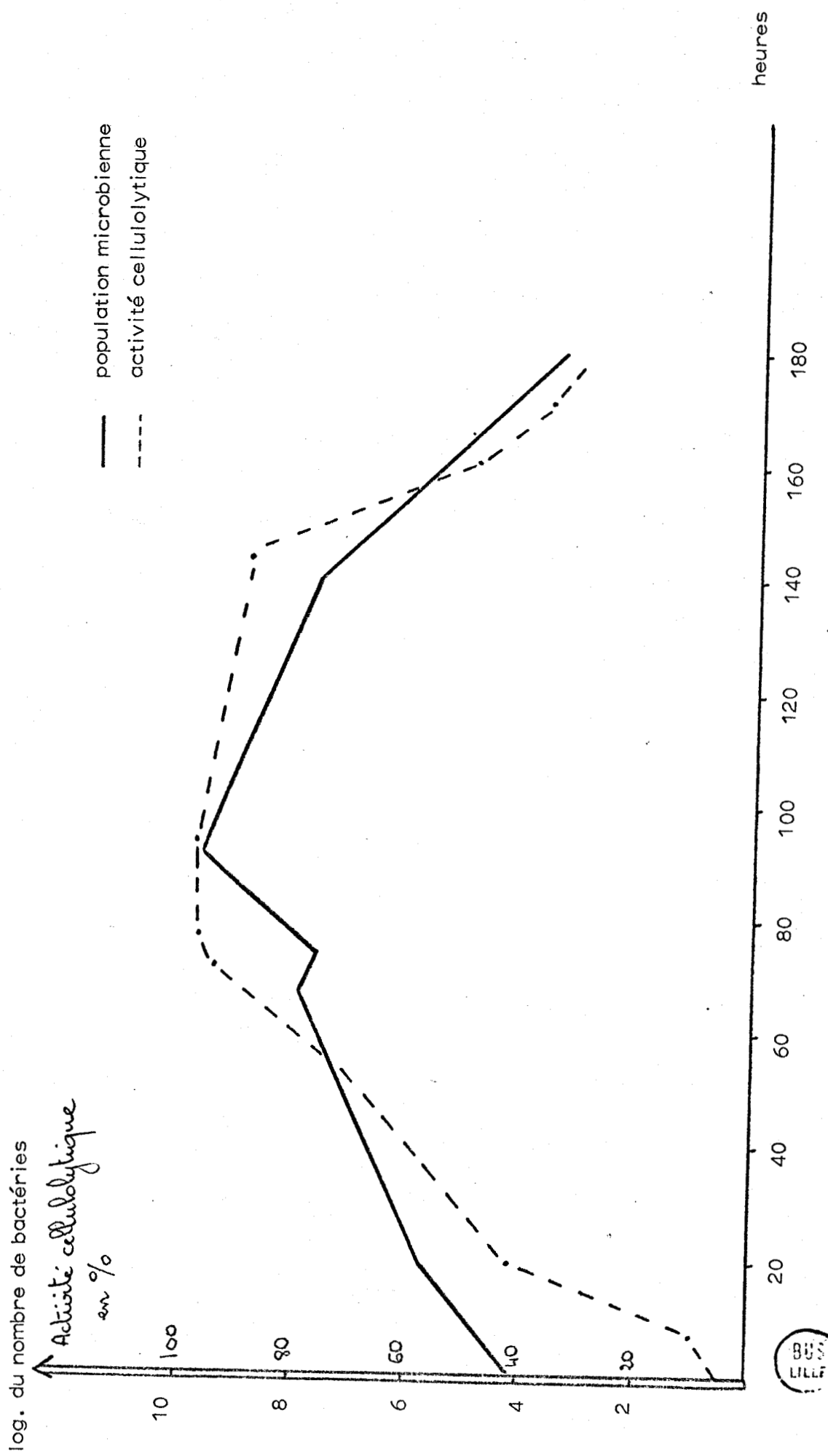


Figure 19 : EVOLUTION DE LA POPULATION MICROBIENNE



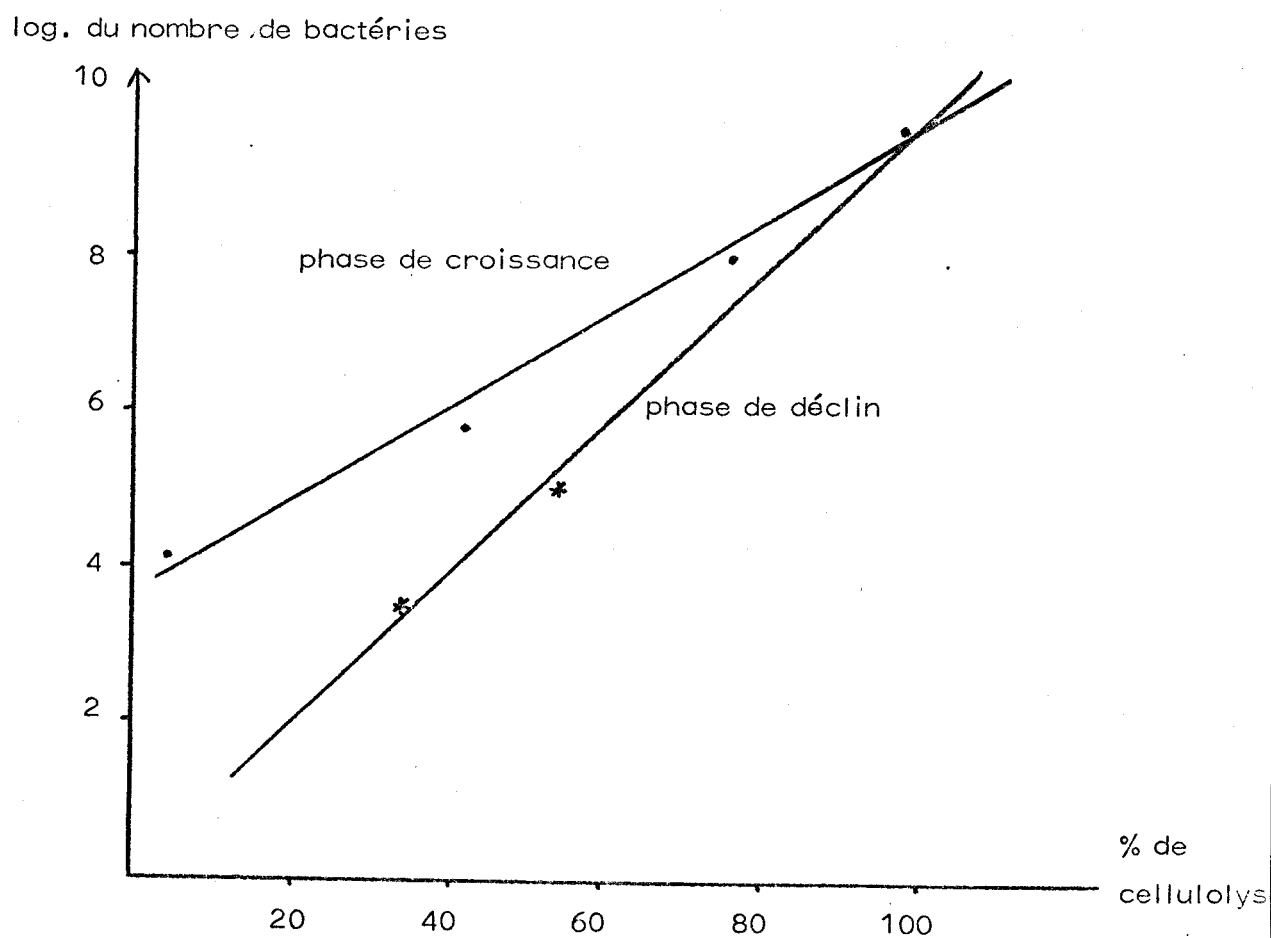


Figure 20 : RELATION ENTRE LE NOMBRE DE BACTERIES VIVANTES ET LE POURCENTAGE DE CELLULOLYSE



Les souches A et C cocci gram⁺ peuvent être assimilées à des Ruminococcus tandis que la souche B vraisemblablement à Bacteroides succinogenes et la souche D de forme clostridiale à Clostridium lockheadi bien que certains caractères biochimiques ne correspondent pas totalement.

3. L'activité des cultures en fermenteur envers la cellulose

Nous avons dosé deux sortes d'activités : l'activité cellulolytique des cultures et l'activité cellulasique des filtrats de culture.

- L'activité cellulolytique

Nous avons repris la méthode précédemment exposée : 2 ml de culture sont prélevés du fermenteur en respectant l'anaérobiose et la stérilité et servent à mesurer l'activité cellulolytique. Pour cela le substrat est de la poudre de cellulose Whatman 50 mg. Cette étude est réalisée en présence de 5 ml d'un tampon $\text{CO}_2\text{-NaHCO}_3$ -sels minéraux. L'incubation dure 48 heures à 37°.

La figure 21 montre l'activité des cultures au cours du temps. Les résultats observés sont analogues à ceux obtenus lors des précédentes expériences. Il semblerait qu'une légère agitation dans le milieu de culture permette une croissance plus rapide et plus élevée optimisant ainsi l'activité cellulolytique : environ 100 % de dégradation au 3^e jour de culture.

De même que précédemment après une stabilisation de la cellulolyse, celle-ci décroît rapidement. Ceci est en rapport avec l'évolution de la microflore.

- L'activité cellulasique

Nous appelons activité cellulasique, la dégradation de substrats cellulosiques par les surnageants de milieux de culture. Ces derniers sont

centrifugés 15 minutes à 10 000 g ; les surnageants colorés en jaune servent à mesurer le pouvoir de dégradation de la cellulose.

Pour ce dosage, nous avons adopté la technique de KRISHNAMURTI et KITTS (56) : A 0,2 ml de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ à 3 % on ajoute 1 ml de surnageant, 1 ml d'une solution de carboxyméthyl cellulose C.M.C. (TOUZART et MATIGNON, Paris) à 1 % ou 10 mg de poudre de cellulose (Whatman), et 1,8 ml de Tampon acétate 0,1 M pH 5,5. L'incubation se fait à 37° pendant une heure sans agitation.

Les sucres réducteurs ont été déterminés par addition de 1 ml d'une solution d'acide dinitrosalicylique à 2 ml de la solution essai (GASCOIGNE et GASCOIGNE, 27). Les tubes sont mis à bouillir pendant 5 minutes puis après refroidissement, l'absorbance est lue à 540 m . La quantité de sucres réducteurs libérés est mesurée par rapport au glucose.

La figure 21 montre que l'activité cellulasique sur carboxyméthyl cellulose ou poudre de cellulose est en relation directe avec l'activité cellulolytique. De plus, suivant la nature de la cellulose, le taux de dégradation par les enzymes cellulolytiques est variable. Ainsi la C.M.C, cellulose dégradée est plus facilement attaquée par les cellulases que la cellulose native (environ 3 fois plus).

Différents auteurs (LEATHERWOOD, 57 ; HALLIWELL, 39 ; OKADA, 70) ont montré que les cellulases sont en général absorbés sur les substrats cellulosiques insolubles. De ce fait, dans le surnageant des cultures nous ne dosons que l'activité cellulasique des enzymes libres ou libérées du fait de la dégradation de la source carbonée. En général, après 3 à 4 jours de culture la cellulose dans le milieu de culture est pratiquement dégradée à 100 % d'où la libération d'enzymes cellulolytiques.

- Evolution du pH

L'évolution du pH ne donne que peu de renseignements sur la culture. Le pH reste stable à 6,8 pendant plusieurs heures puis diminue jusque 5,8 et reste alors constant.

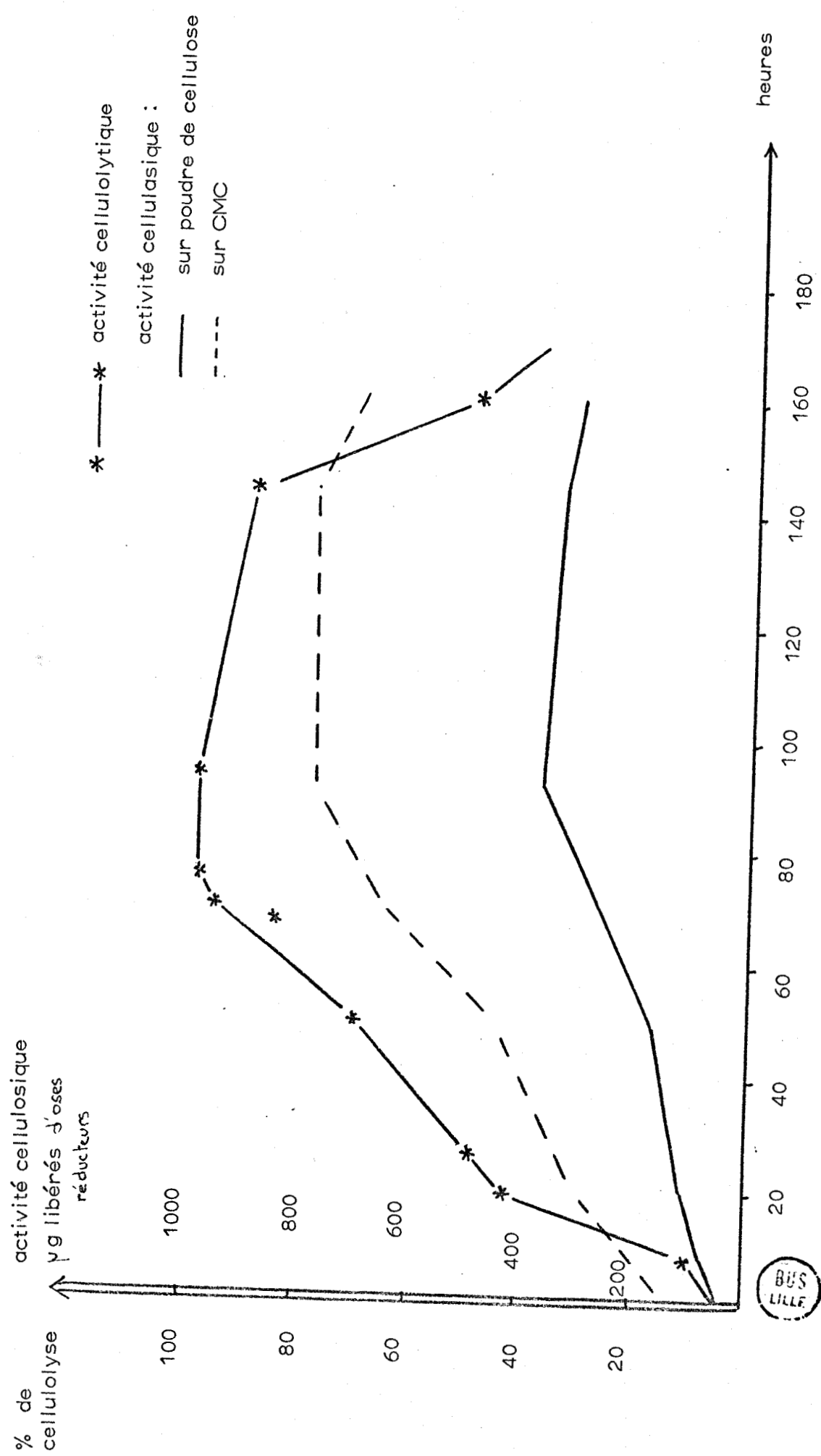


Figure 21 : ACTIVITE CELLULOLYTIQUE ET CELLULASIQUE DES CULTURES



- Dosage des sucres solubles

Le dosage des sucres réducteurs ou sucres totaux solubles montre que leur taux est très faible dans le milieu de culture (environ 150 µg par millilitre). Les oses libérés lors de l'attaque de la cellulose sont immédiatement utilisés par les microorganismes cellulolytiques du rumen.

c) Conclusions

Dans l'étude qui précède, nous avons pu mettre en évidence plusieurs faits importants concernant la culture des microorganismes cellulolytiques du rumen lors de conditions opératoires semi-industrielles.

Nous avons vu l'influence du volume d'ensemencement ainsi que celle de l'âge des précultures. Les différents résultats ont montré qu'il est préférable d'ensemencer les fermenteurs par 10 % de préculture incubée d'un jour à 37°.

L'étude de l'évolution de la microflore a permis de relier celle-ci à l'activité cellulolytique. De plus, quelques isollements de germes coccis, batonnets, forme clostridiale, ont montré l'effet synergique de ceux-ci sur la dégradation de la cellulose.

La recherche des cellulases a mis en évidence la présence d'enzymes cellulolytiques dans le surnageant des cultures. Celles-ci ont une activité aussi bien sur la poudre de cellulose que sur une cellulose modifiée la carboxyméthylcellulose. L'hypothèse d'une absorption des cellulases sur le substrat a pu être a priori, écartée du fait de la complète disparition de la cellulose du milieu de culture. Cette dernière observation pourrait être liée à la diminution de l'activité cellulolytique des cultures après 5 jours d'incubation.

3^{ème} PARTIE :

LES ENZYMES CELLULOLYTIQUES DES CULTURES

DE BACTERIES DU RUMEN

Nous avons vu dans les chapitres précédents que le liquide de rumen possède un fort pouvoir de dégradation de la cellulose ; cette activité est due aux microorganismes bactéries et protozoaires présents en grand nombre et espèce dans le rumen des bovins.

Nos travaux ont également montré la possibilité de faire croître ces microorganismes in vitro en milieu liquide tout en conservant leur activité cellulolytique.

Nous aborderons dans cette troisième partie, l'étude des enzymes responsables de la dégradation de la cellulose c'est-à-dire les cellulases. Dans un premier temps, nous examinerons les conditions d'obtention de celles-ci à partir des cultures en milieu liquide des bactéries du rumen. Puis dans un deuxième temps, nous déterminerons les différents paramètres d'activité (pH, température, Km...). Finalement, nous prolongerons ces travaux par un début de fractionnement de ces enzymes non pas dans le but d'une caractérisation poussée mais plutôt pour une "purification" de la solution enzymatique de façon à obtenir l'activité spécifique maximum.

I. OBTENTION DES CELLULASES A PARTIR DES CULTURES DE BACTERIES DU RUMEN

Après avoir étudié dans les chapitres précédents, l'activité cellulolytique du liquide de rumen et des cultures de bactéries du rumen, nous avons essayé de localiser celle-ci. En effet, les cellulases synthétisées par des bactéries resteraient accrochées à la membrane, contrairement à ce qui se passe chez les champignons imparfaits (Trichoderma viride, Myrothecium verrucaria).

Les dosages d'activité cellulolytique sur les filtrats de culture libres de cellules ont montré une faible dégradation de la cellulose. Il semblerait donc bien qu'une partie des cellulases restent liées aux bactéries. C'est ce que nous essayerons de déterminer.

a) Localisation de l'activité cellulolytique

1. Méthode

Deux millilitres d'une culture de 72 heures de bactéries cellulolytiques du rumen sont centrifugés en anaérobiose 10 minutes à 10 000 g. L'anaérobiose est assurée de la façon suivante :

2 ml d'huile de vaseline stérile sont introduits dans un tube à hémolyse. Les 2 ml de culture sont prélevés par une seringue et déposés au fond du tube ; l'huile, de densité plus faible, forme une couche supérieure protégeant ainsi les bactéries de l'air.

Après centrifugation, le surnageant est recueilli et sert à mesurer l'activité cellulolytique selon la technique de HALLIWELL exposée précédemment.

Quant au culot, il est remis en suspension par addition d'environ 1,8 ml de Tampon $\text{NaHCO}_3 - \text{CO}_2$ - sels pH 6,8 puis sert également à mesurer l'activité cellulolytique.

Rappelons cette méthode de dosage : A 50 mg de poudre de cellulose et 5 ml du tampon pH 6,8 on ajoute le surnageant ou le culot. L'incubation se fait à 39° pendant 48 heures. Passé ce délai, on mesure la cellulose résiduelle par gravimétrie.

2. Résultats et conclusion

En opérant de cette façon, nous avons obtenu les résultats suivants :
Tableau 17.

	Pourcentage de solubilisation	Pourcentage relatif
Témoin : 2 ml de culture	95	100 %
Culot	85,6	90,1 %
Surnageant	12,2	12,8 %
Surnageant + 1 goutte de Toluène	11,7	12,2 %

Tableau 17

Ceci montre donc que l'activité cellulolytique totale peut être répartie en deux fractions :

- le culot représentant 90 % de la cellulolyse
- le surnageant, c'est-à-dire les cellulases libres dégradant 10 % de la cellulose

Les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats sont de deux ordres :

- les cellulases libérées dans le milieu de culture sont capables de dégrader la cellulose insoluble. Cela signifie que les différents facteurs enzymatiques (C_1 et C_x pour REESE) sont présents dans le surnageant.

- le Tampon de HALLIWELL permet le développement des bactéries anaérobies du rumen donc il y a synthèse de cellulases durant le temps d'incubation. En effet, si le culot représente les 90 % de l'activité totale, on devrait trouver une forte concentration de glucose dans l'essai. Or ce n'est pas le cas ; celui-ci est utilisé comme source de carbone par les bactéries cellulolytiques permettant ainsi leur croissance. De plus, dans le cas où il y a peu de cellulases accrochées aux membranes des bactéries, leur synthèse serait très rapide mais ne permettant pas de reconstituer l'activité totale. Ceci peut être dû à des vitesses de synthèse des facteurs C_1 et C_x différentes.

Nous avons alors essayé de voir la proportion de cellulases liées et de cellulases libres dans un jus de culture en appliquant la même méthode que précédemment sauf que le temps d'incubation est ramené à 4 heures à 39°.

Les différents essais ont montré alors que le surnageant ne dégradait que 40 % contre 60 % pour le culot.

Ces résultats montrent donc bien que l'activité cellulolytique est pour une part présente dans le filtrat des cultures de bactéries du rumen mais surtout liée aux bactéries.

De ce fait, nous avons essayé, dans le but d'optimiser la production de cellulases libres, de lyser par différentes méthodes les bactéries de façon à libérer les cellulases attachées aux membranes. Ces méthodes ont été physiques, chimiques ou enzymatiques.

b) Libération des cellulases liées

1. Méthode physique

Les jus de culture de bactéries du rumen sur milieu de HUNGATE modifié sont centrifugés 15 minutes à 10 000 g. Le culot est remis en suspension dans du tampon acétate 0,1 M pH 5,5. Les cellules sont alors sonniquées à 6 kilocycles pendant 30 minutes (M.S.E.) puis centrifugées à nouveau.

Nous dosons l'activité enzymatique du surnageant envers la carboxyméthylcellulose CMC à 1 %. Les sucres réducteurs libérés lors de l'incubation (1 heure à 37°) sont dosés par la méthode de GASCOIGNE (27).

Les résultats ont montré un accroissement de l'activité cellulasique (+ 30 %) pour les essais sonniqués par rapport au Témoin (jus de culture non traité).

Nous n'avons pas approfondi cette étude du fait de l'impossibilité de son application industrielle.

Cependant, les résultats obtenus par cette méthode nous permettrons d'établir une comparaison avec ceux donnés par les techniques chimiques ou enzymatiques de lyse des cellules.

2. Méthode chimique

Nous avons testé différents solvants organiques. Comme cette méthode présente le plus de rentabilité au point de vue coût de l'opération, nous essayerons de définir certains paramètres (Temps d'action, concentration) influençant l'action de ces composés. Les études entreprises ont été réalisées en présence de Toluène, chloroforme, butanol, acétone, acétate d'éthyle.

A 10 ml de jus de culture contenus dans des tubes de 16 à vis, nous ajoutons le solvant organique. Les tubes sont agités pendant une heure à 30°. Après centrifugation, nous dosons l'activité cellulasique présente dans le surnageant envers la carboxyméthylcellulose.

Le tableau 18 rassemble les différentes expériences réalisées ainsi que les résultats obtenus c'est-à-dire, la libération de sucres réducteurs.

Les conclusions que nous pouvons en tirer sont les suivantes :

- seul le chloroforme inhibe l'activité cellulasique à n'importe quelle concentration

- le butanol et l'acétate d'éthyle n'augmente que très faiblement l'activité cellulasique. Cette augmentation est d'ailleurs constante quelque soit la quantité de butanol ajoutée.

- le meilleur solvant pour détacher les cellulases liées aux membranes des bactéries semble être le toluène. C'est pourquoi nous étudierons les conditions d'utilisation du toluène.

TABLEAU 18

Solvants	Addition de :			
	0,05 ml	0,1 ml	0,2 ml	0,5 ml
Toluène	425 μ g + 15	450 μ g + 21	375 μ g + 1	300 μ g - 20
Chloroforme	325 - 13	275 - 27	225 - 40	210 - 45
Butanol	400 + 7	400 + 7	400 + 7	400 + 7
Acétone	-	370 0	410 + 10	370 0
Acétate d'éthyle	400 + 7	400 + 7	410 + 10	400 + 7
Témoin	370 μ g			

Tableau 18 : Influence de différents solvants organiques sur la libération des cellulases liées aux membranes des bactéries.

Le nombre situé en bas et à droite de chaque case représente l'augmentation ou la diminution de l'activité cellulasique par rapport au témoin.

Les meilleures conditions d'utilisation du toluène sont données par les courbes 22 a et b. La courbe 22 a représente l'influence de la concentration en toluène sur l'activité cellulasique des surnageants. Nous notons que la courbe passe par un maximum pour une addition de toluène comprise entre 0,05 ml et 0,1 ml. Pour des valeurs supérieures, la courbe décroît montrant ainsi l'inhibition des cellulases pour des fortes concentrations en toluène.

Quant à la courbe 22 b représentant l'influence du temps d'action du toluène sur la libération des cellulases, nous voyons que celui-ci doit être compris entre 1 heure et une heure et demie. Passé ce délai, le toluène pourrait également diminuer l'activité des enzymes.

3. Méthode enzymatique

Des essais de lyse des membranes de bactéries du rumen ont été entrepris avec du lysozyme (EC 3.2.1.17) de blanc d'oeuf (SIGMA, St LOUIS USA).

Nous avons étudié les conditions d'utilisation de cette enzyme :
concentration en lysozyme, temps d'action.

Suivant les bactéries gram⁺ ou gram⁻, les conditions opératoires sont différentes. Cependant dans notre population bactérienne nous avons les deux catégories de bactéries. Nous nous sommes donc attachés à utiliser les conditions opératoires pour lyser des bactéries gram⁻ c'est-à-dire en travaillant dans un tampon Tris-HCl 0,025 M, pH 8,0 contenant 5mM EDTA et 0,32 M de saccharose. Les essais ont été réalisés à la température de 30°.

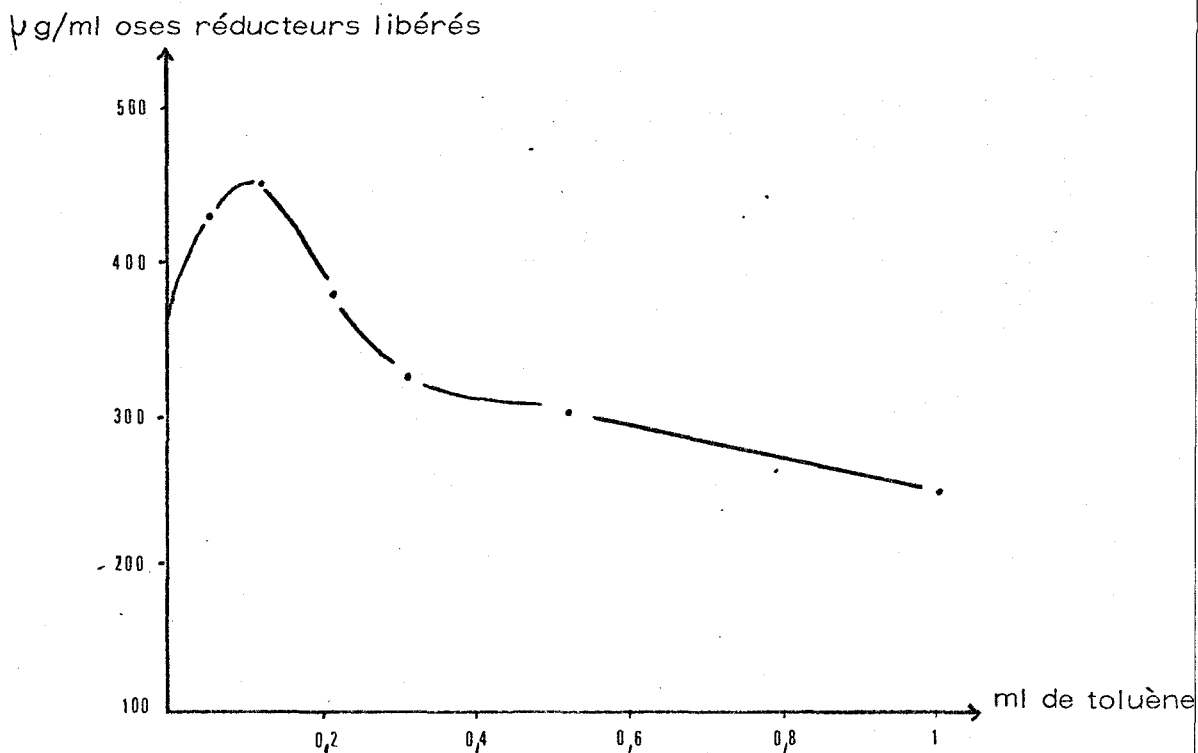


Figure 22a Influence de la concentration en toluène - 10 ml de jus de culture + toluène - agitation 1 heure à 30° - dosage à partir du surnageant de l'activité CMC asique.

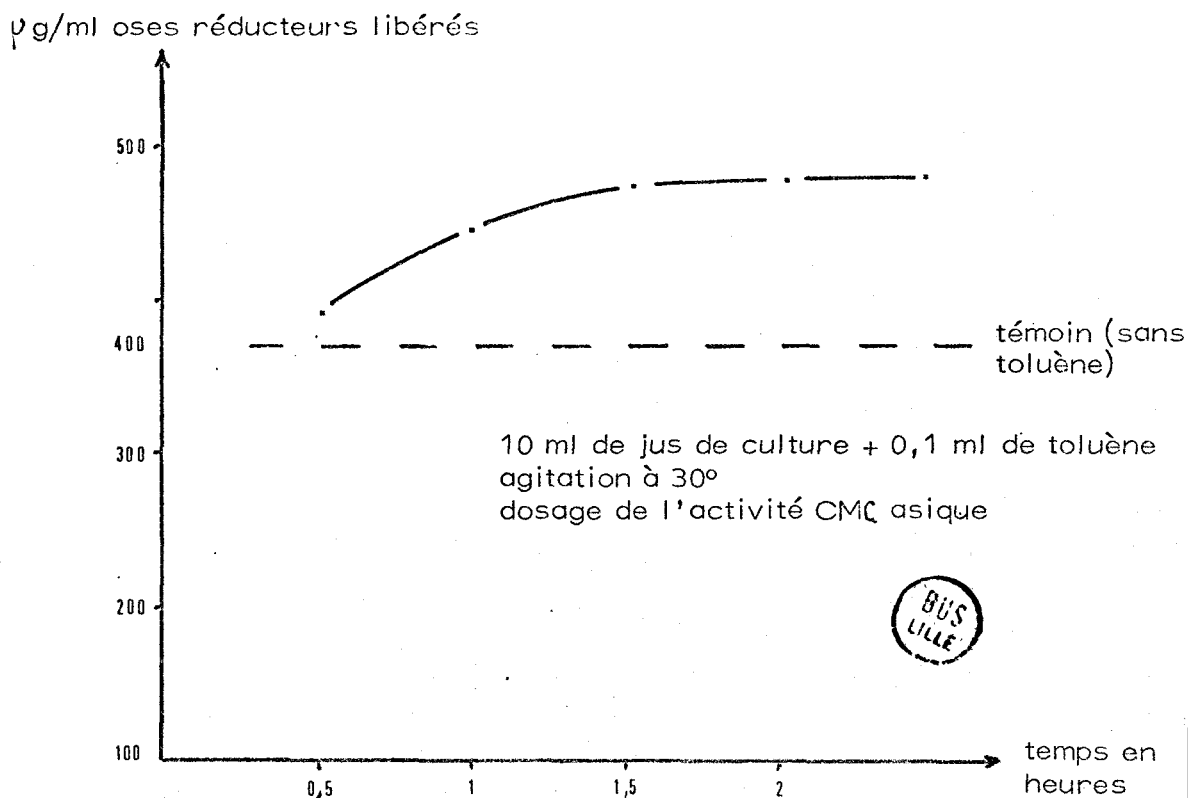


Figure 22 b Influence du temps d'action du toluène sur les bactéries



- Influence de la concentration en enzyme

Comme précédemment, 10 ml de jus de culture sont contenus dans un tube de 16 à vis, on ajoute un certain volume de solution enzymatique. La durée d'incubation est 1 heure.

La courbe 23 représente les résultats obtenus. Nous voyons que le maximum de dégradation de la carboxyméthylcellulose, en relation avec le taux de cellulase présentes dans les surnageants, est obtenu pour 400 μ g de lysozyme par millilitre. Puis la courbe montre un palier pour des concentrations supérieures.

- Influence du temps d'action

Nous avons répété ces expériences en faisant agir 400 μ g de lysozyme par ml de jus de culture. Nous avons fait varier la durée d'incubation à 30°. La réaction est arrêtée en plongeant les tubes dans un bain de glace. Après centrifugation, comme précédemment, 1 ml sert à tester l'activité cellulasique envers la carboxyméthylcellulose.

La figure 24 montre que la courbe passe par un maximum pour une durée d'incubation de une heure. Pour des temps plus longs, le lysozyme semble détruire les cellulases (forte diminution de l'activité cellulasique). Cette enzyme pourrait hydrolysée certaines liaisons glycosidiques de la partie glycanne des cellulases qui seraient d'après WHITAKER (90) des glycoprotéines.

c) Conclusion

Après les études faites sur les conditions d'obtention de cellulases libres, il semble que le toluène a une meilleure action sur les cellulases liées aux membranes des bactéries. Les résultats obtenus par les différentes méthodes (physiques, chimiques ou enzymatiques) ont montré que l'activité cellulasique des surnageants de culture peut être augmentée de :

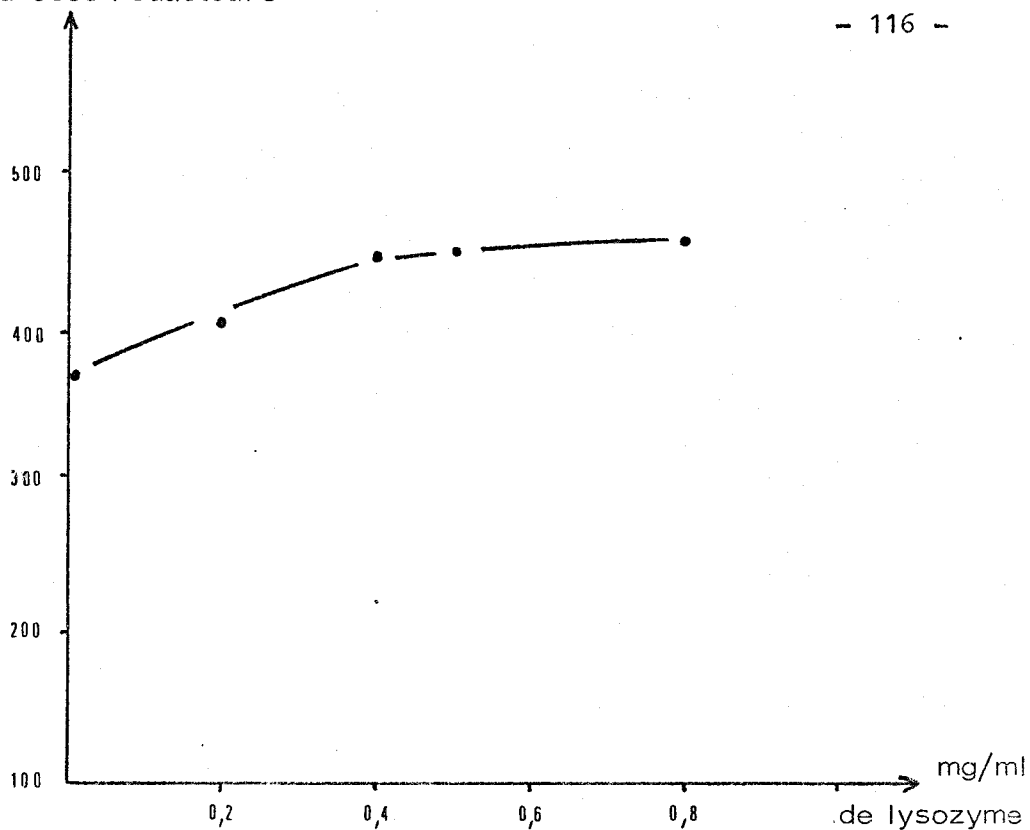


Figure 23 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN LYSOZYME

10 ml de jus de culture + toluène - agitation 1 heure à 30°
dosage à partir du surnageant de l'activité CMC asique

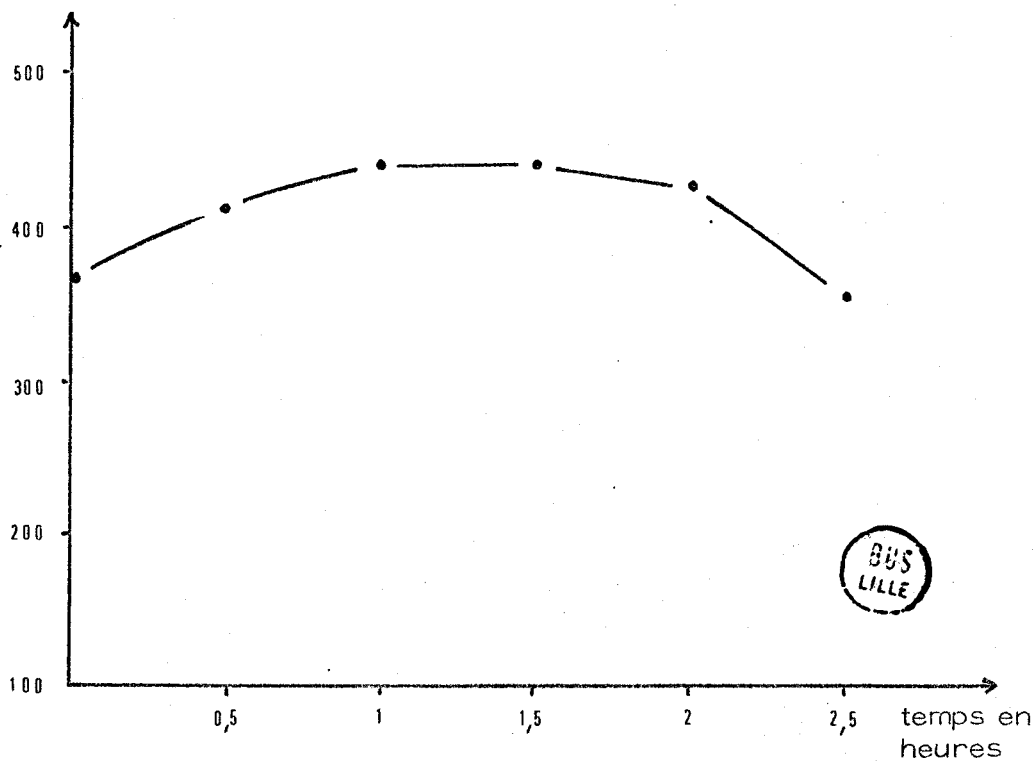


Figure 24 INFLUENCE DU TEMPS D'ACTION DU LYSOZYME

- 30 % dans le cas d'une sonnication des cellules
- 21 % si on utilise le toluène à raison de 1 % pendant une heure
- 18 % pour une lyse par le lysozyme à 400 μ g par ml. Conditions d'utilisation : Tampon Tris-HCl, pH 8, 0,025 M en présence d'EDTA et de saccharose.

Cependant, par rapport à l'activité cellulolytique notée dans le culot de cultures centrifugées, ces résultats sont assez décevants. On n'arrive au maximum, à retrouver que 50 % de l'activité totale (40 % pour les surnageants et 60 % pour les culots). Il pourrait y avoir une libération de composés inhibiteurs dans le cas d'une lyse trop poussée des cellules (sonnication) et les procédés chimiques ou enzymatiques ne permettraient pas une libération complète des cellulases liées quelque soit la quantité de solvant ou d'enzyme ajoutée.

II . CARACTERISTIQUES DES CELLULASES DE BACTERIES DU RUMEN

a) Historique

Si le nombre de publications concernant les microorganismes du rumen est considérable, très peu d'études ont été faites sur l'activité cellulolytique in vitro des bactéries et sur leurs cellulases. Seuls quelques travaux ont décrit les enzymes libérées dans le liquide de rumen des bovins ou les enzymes synthétisées à partir de culture pure (Rumino-coccus, Bactéroïdes). Cela provient des nombreuses contradictions relevées entre les résultats des différents auteurs. Contradiction au niveau de la présence ou non d'enzymes libres dans le liquide de rumen, au niveau des propriétés des enzymes.

KRISHNAMURTI et KITTS (56) ont montré l'existence d'une activité cellulastique dans le surnageant du liquide de rumen. Ces résultats ont été conformés par GILL et KING (31). Cependant, au contraire, HALLIWELL (37) n'a jamais détecté d'activité et pense à la labilité du système enzymatique. Des essais de stabilisation ont été réalisés en présence de

gelatine mais n'ont pas donnés les résultats espérés. De plus, pour confirmer cette hypothèse, HUNGATE (48) affirme que les cellulases du rumen sont fortement attachées au substrat cellulosique et sont incapables de diffuser jusqu'à ce que la cellulose ait été digérée.

CASON et THOMAS (15) ont montré que l'activité cellulasique dans les prélèvements de liquide de rumen chez les bovins effectués 6 heures après ingestion d'aliments est beaucoup plus élevée que celle trouvée dans les prélèvements collectés après 24 heures.

Cette observation permet de penser que le taux de cette activité présente dans le surnageant du liquide de rumen est variable dans le temps en fonction du substrat cellulosique (nature des aliments ingérés) présence ou absence d'inhibiteurs ou activateurs et certainement d'autres facteurs.

Ces contradictions se retrouvent d'ailleurs au niveau des résultats concernant les caractéristiques des cellulases :

- le pH optimum pour leur activité est pour plusieurs auteurs (CONCHIE, 16 ; KING, 51 ; KITTS et UNDERKOFER, 55 ; STANLEY et KESLER, 85) compris entre 5,4 et 6 ; seuls GILL et KING (31) trouve un optimum d'activité à pH 6,5.

- l'activité cellulasique varie suivant la nature de la cellulose. Cependant, elle est aussi dépendante de la façon dont les enzymes ont été obtenues. HALLIWELL (38) a montré que les extraits obtenus par le butanol ont une meilleure activité sur la carboxyméthylcellulose. Par contre, les extraits enzymatiques obtenus par l'alumine sont plus actifs sur la cellulose insoluble.

- selon LEATHERWOOD, certaines cellulases bactériennes (*Ruminococcus*) sont inhibées par l'oxygène. Cependant, la plupart des auteurs ne prennent aucune précaution d'anaérobiose lors du dosage des activités cellulosiques.

Tous ces faits, nous entraînent donc à définir nos conditions d'étude des caractéristiques des cellulases, isolées dans le surnageant des milieux de culture de bactéries du rumen.

b) Caractéristiques des cellulases

1. Méthodologie

Différentes méthodes ont été proposées pour mesurer l'activité cellulosique ; le tableau 19 rassemble les principales. Parmi celles-ci, nous avons utilisé la carboxyméthyl cellulose, CMC, comme substrat cellulosique. Les dosages ont été effectués de la façon suivante :

A 1 ml de surnageant de culture, on ajoute 1,8 ml de Tampon acétate 0,1 M pH 5,5, 0,2 ml de $MgCl_2$ à 3 % et 1 ml de CMC à 1 %.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour suivre la dégradation de la CMC :

Après un certain temps d'incubation, on peut mesurer la variation de la viscosité ou mesurer les groupements réducteurs libérés.

Nous avons choisi cette dernière technique. Pour cela, après un temps d'incubation suffisant (en général une heure) à la température de 37°, nous dosons les fonctions réductrices apparues dans l'essai par la méthode au dinitrosalicylate (GASCOIGNE et GASCOIGNE). Pour cela, nous ajoutons 1 ml de solution de dinitrosalicylate. Les tubes sont mis dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes. Après refroidissement, la lecture de densité optique se fait à 540 m . Tous ces essais ont été réalisés en atmosphère normale.

Substrats	Détermination de	Références
A. Insolubles		
Coton	Cellulose résiduelle par gravimétrie ou calorimétrie	HALLIWELL SELBY
& Cellulose	Groupements réducteurs	GRIMES
Hydrocellulose	Turbidité cellulose résiduelle	NORKRANS
Cellulose précipitée	Diminution du degré de polymérisation	WALSETH
	Groupements réducteurs	WHITAKER GILLIGAN et REESE
B. Solubles		
Carboxymethylcellulose	Diminution de la viscosité	REESE
	Groupements réducteurs	TOYAMA et SHIBATA HANSTEIN
Ethyhydroxyethyl cellulose	Diminution de la viscosité	LYR
B 1-4-oligoglucosides	Groupements réducteurs et séparation par chromatographie	WHITAKER



Tableau 19 : Différents substrats et méthodes utilisés pour l'étude de la dégradation de la cellulose.

2. Résultats

- pH

Nous avons étudié l'influence du pH sur l'activité cellulosique présente dans les surnageants de culture de bactéries du rumen. Le tampon acétate a été utilisé pour des pH compris entre 4 et 5,5 et le tampon Tris-maléate entre 5,5 et 8.

La figure 25 montre que le maximum d'activité est obtenu à pH 5,5 avec la carboxyméthylcellulose comme substrat. A pH élevé (pH 8) on conserve encore l'activité.

Les essais suivants seront effectués dans le tampon acétate pH 5,5.

- Température

Plusieurs essais ont été mis à incuber à des températures différentes 20°, 28°, 37°, 44°, 55°. Nous voyons (figure 26) que la courbe passe par un maximum pour la température de 37°. Cela correspond à la température de croissance des bactéries du rumen et à celle de l'animal-hôte (bovins). L'activité cellulasique est faiblement conservée à des températures élevées d'incubation et est nulle à 60°.

- Influence de la concentration du substrat

Nous avons étudié la variation de l'activité cellulasique selon la quantité de substrat cellulosique ajoutée à l'essai. Nous avons utilisé la CMC. Nous notons (figure 27) que pour des faibles concentrations de CMC, la courbe de l'activité est linéaire puis à partir d'une certaine concentration 10 mg nous atteignons un palier indiquant une saturation en substrat

μ g/ml oses réducteurs libérés

- 122 -

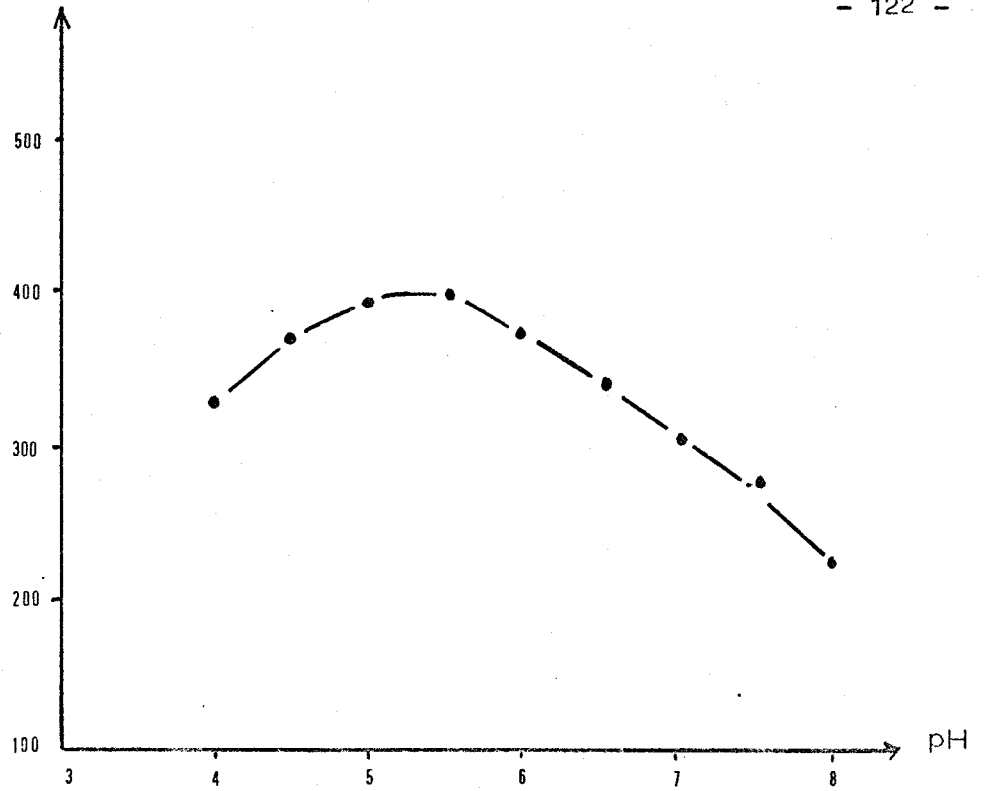


Figure 25 INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITE CELLULOSIQUE

μ g/ml oses réducteurs libérés

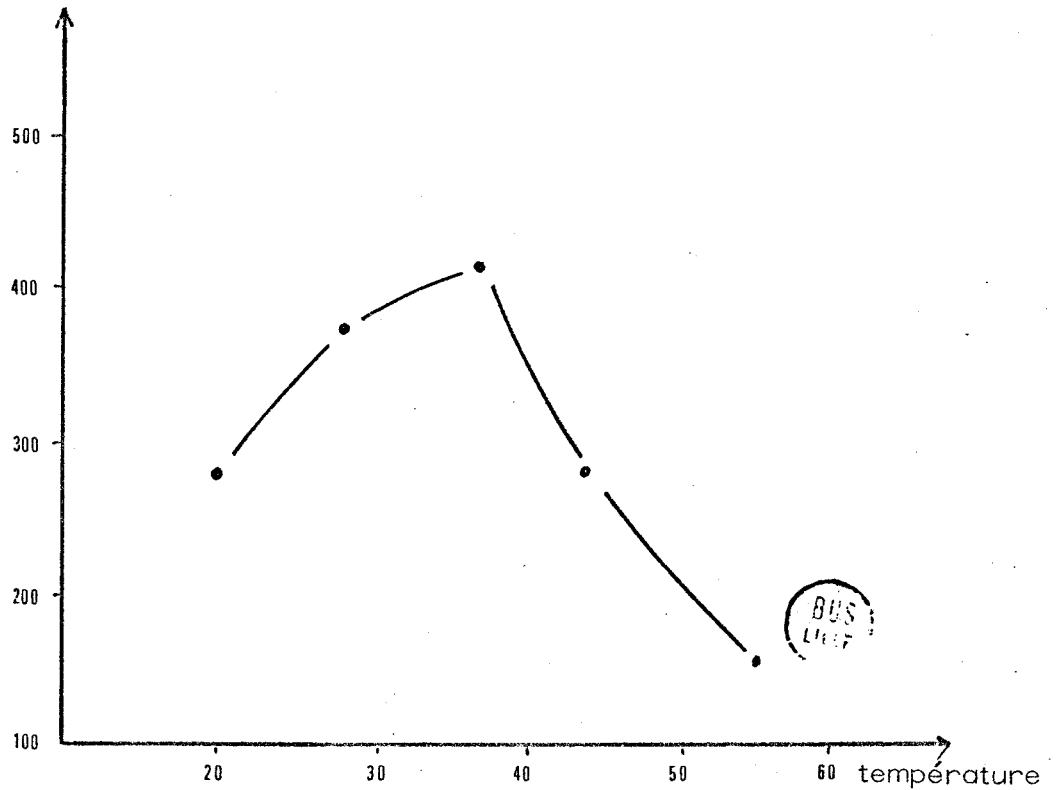


Figure 26 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE SUR L'ACTIVITE CELLULASIQUE

- Influence de la concentration en enzyme

Nous avons opéré de la façon suivante :

Surnageant de culture	1 ml	0,8 ml	0,5 ml	0,25 ml	0,1 ml
eau	0	0,2	0,5	0,75	0,9
CMC 1 %	1	1	1	1	1
MgCl ₂	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Tampon acétate	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8

Incubation 1 heure à 37°

La figure 28 montre les résultats obtenus. Nous voyons que la courbe est, dans sa première partie, une droite de pente élevée. Lorsqu'on augmente la concentration en surnageant c'est-à-dire enzyme, l'activité atteint un palier traduisant ainsi le taux maximum de dégradation de la carboxyméthylcellulose.

Ce taux peut être limité par la libération de sucres réducteurs essentiellement du glucose : (observé par chromatographie sur papier Whatman 1, système solvant de Partridje) : effet rétro-inhibiteur. Mais il se pourrait aussi que la présence d'inhibiteurs limite le taux de dégradation de la CMC.

- Cinétique d'action

La période d'incubation a été prolongée plusieurs jours. Les

$\mu\text{g/ml}$ oses réducteurs libérés

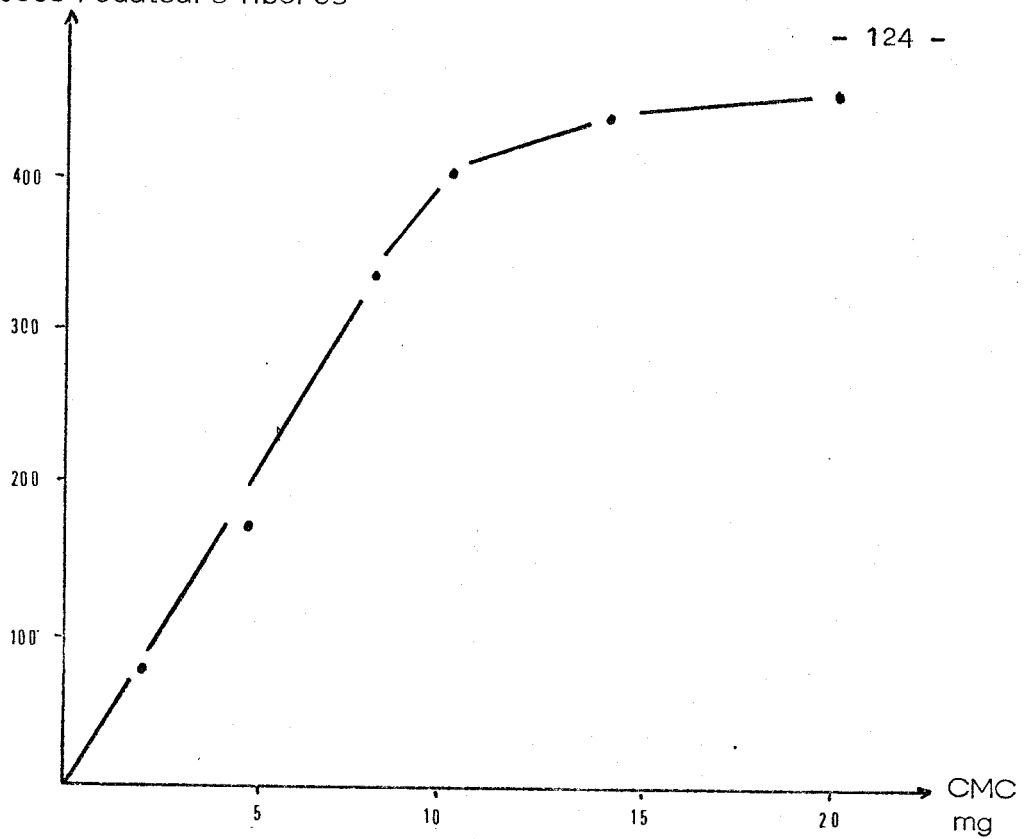


Figure 27 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CMC

1 ml de surnageant + 1,8 ml tampon acétate + 0,2 ml MgCl_2
incubation 1 heure à 37°

$\mu\text{g/ml}$ oses réducteurs libérés

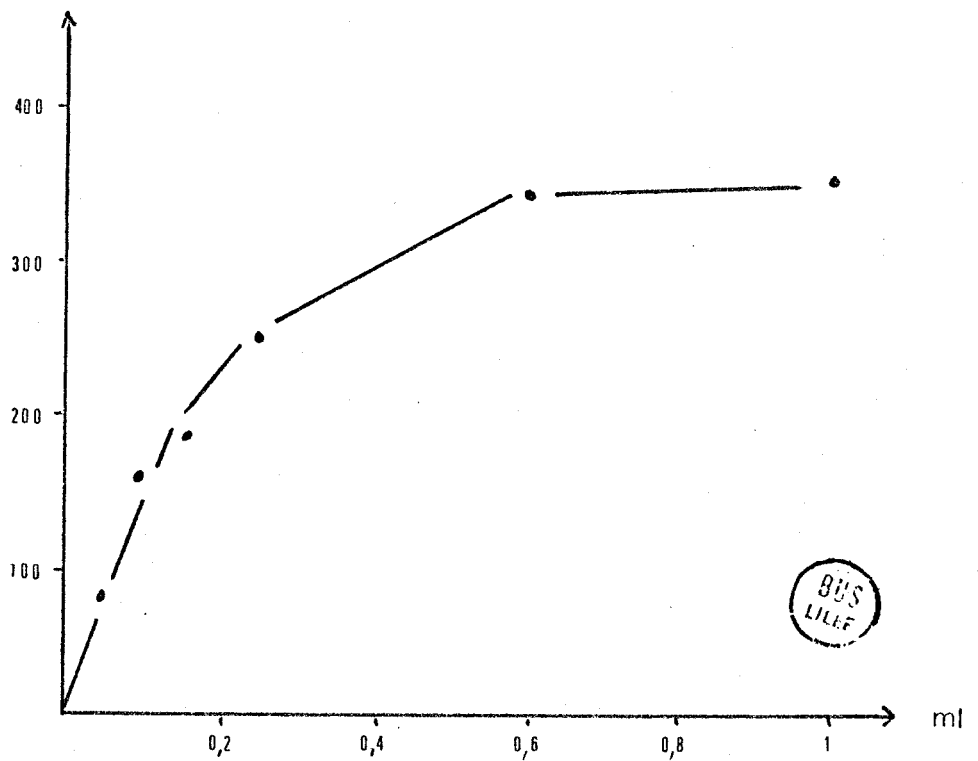


Figure 28 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME

résultats ont montré que (figure 29) l'optimum de dégradation de la CMC est obtenu après 24 heures d'incubation à 37°. Pour des périodes plus longues, il faut tenir compte des pollutions bactériennes utilisant les sucres libérés et faussant ainsi les résultats.

- Influence de la nature du substrat

Nous avons testé l'activité des surnageants de culture envers deux sortes de substrats celluloses :

- . une cellulose insoluble : poudre de cellulose Whatman
- . une cellulose soluble : carboxyméthylcellulose

Les dosages de sucres réducteurs libérés ont montré que la carboxyméthylcellulose est plus fortement dégradée que la poudre de cellulose. Les rapports de dégradation sont de l'ordre de 20 pour 1, soit pour une heure d'incubation à 39° une libération de :

- . 350 $\mu\text{g/ml}$ de sucres réducteurs dans le cas de la CMC
- . 7 $\mu\text{g/ml}$ dans le cas de la poudre de cellulose

(Ces mesures ont été en fait réalisées sur des périodes d'incubation plus longues et rapportées à l'unité : l'heure).

c) Essais de fractionnement des cellulases

Les essais de purification des cellulases de Trichoderma viride (OKADA, 70 ; et de Pseudomonas fluorescens var. cellulosa (YOSHIKAWA, SUZUKI et NISIZAWA, 94) ont montré l'existence de nombreux composants spécifiques de chaque organisme. De ce fait, il serait aventureux de vouloir résoudre le système cellulosique présent dans le surnageant des cultures mixtes de bactéries du rumen.

Nos essais de fractionnement ont essentiellement porté sur l'obtention d'une fraction enzymatique ayant une forte activité spécifique. Dans ce but, nous avons étudié l'influence d'une précipitation fractionnée

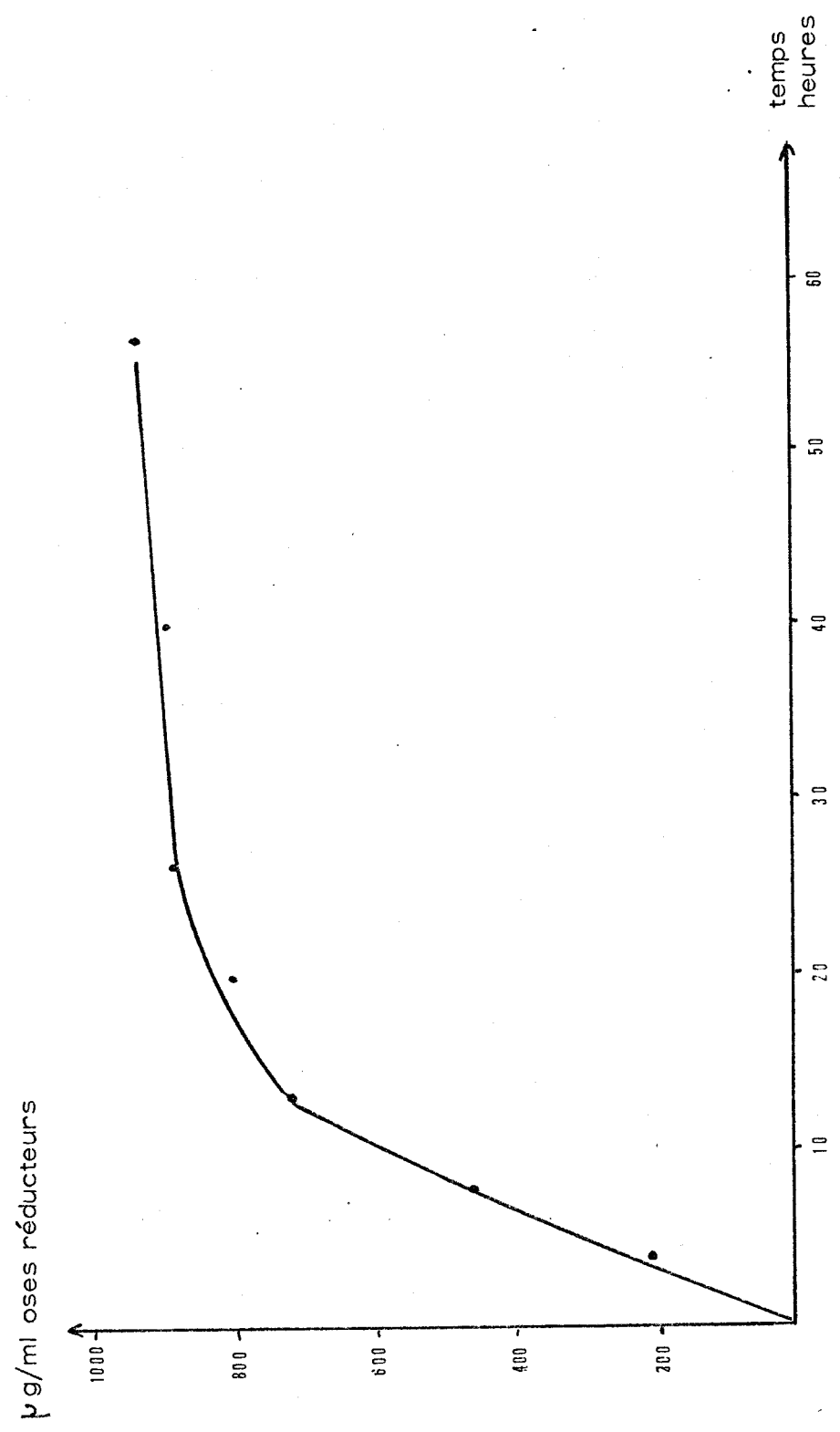


Figure 29 CINÉTIQUE D'ACTION DES CELLULASES SUR LA CMC

1 ml surnageant + 1,8 ml de tampon acétate pH 5,5 + 0,2 ml MgCl₂ + 1 ml CMC à 1%
incubation à 37°



au sulfate d'ammonium des cellulases, puis essayé de "purifier" par chromatographie sur colonne.

1. Précipitation fractionnée

Nous avons essayé de faire une précipitation fractionnée des cellulases en opérant à partir du surnageant de culture de bactéries du rumen. Ces essais ont été effectués à différents taux de saturation en sulfate d'ammonium 0,3 s - 0,5 s - 0,5 s - 0,6 s - 0,8 s.

Ceux réalisés à faible saturation (0,3 s - 0,4 s) n'ont montré aucune précipitation de protéines. Ce n'est qu'à partir d'une concentration en sulfate d'ammonium égale à 0,5 s que l'on obtient un précipité. Ceux-ci sont recueillis par centrifugation ou par filtration sur CELITE 535 puis dissous dans le tampon acétate pH 5,5, 0,1 M. Les jus sont mis à dialyser une nuit à 4° C.

Nous avons testé l'activité cellulase des différents extraits envers la carboxyméthylcellulose ainsi qu'examiné s'il existe un effet synergique en les additionnant.

Les résultats ont montré que toute l'activité se retrouve dans les précipités. De plus cette activité n'est pas identique entre les extraits enzymatiques précipités à 0,5 s - 0,6 s - 0,8 s.

Ainsi pour une heure d'incubation à 37° en présence de CMC 1 % 1 ml, MgCl₂ 3 % 0,2 ml et de Tampon acétate pH 5,5 1,8 ml nous obtenons une libération de sucres réducteurs égale à :

pour 0,5 s	:	400	µg	par millilitre
0,6 s	:	500	"	"
0,8 s	:	550	"	"

D'autres essais réalisés en combinant les différents extraits n'ont pas permis de mettre en évidence un effet synergique. Il semblerait donc que l'addition de sulfate d'ammonium à différents taux de saturation agit quantitativement sur la précipitation des cellulases et non pas qualitativement.

2. Fractionnement sur colonne

Nous avons essayé de fractionner les extraits enzymatiques par chromatographie sur gel. A cet effet, nous utilisons différents supports :

Sephadex G₁₀₀

DEAE Sephadex

CM Sephadex

Les résultats ont varié suivant la nature du support.

. sur Sephadex G₁₀₀

Avant de chromatographier, il nous a fallu concentrer les extraits enzymatiques obtenus par précipitation par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0,8 s. Pour cela, nous avons opéré sur membrane UM 05 (AMICON). Le concentré est déposé sur G₁₀₀ puis élué par du Tampon acétate 0,1 M pH 5,5.

Le dosage des protéines se fait par mesure de la densité optique à 280 nm. De plus à partir de chaque tube nous dosons l'activité cellulaire.

La figure 30 montre les résultats obtenus. Nous voyons que l'activité maximale est obtenue entre les deux pics.

Nous avons essayé de voir ce qu'il se passe sur des échangeurs d'ions Sephadex.

. Echangeurs d'ions Sephadex

Dans un premier temps, nous avons opéré sur DEAE Sephadex. L'extrait est déposé au sommet du gel sans concentration au préalable.

Cependant, nous n'avons pu dans les conditions normales éluer les protéines que ce soit par gradient de pH ou gradient de molarité.

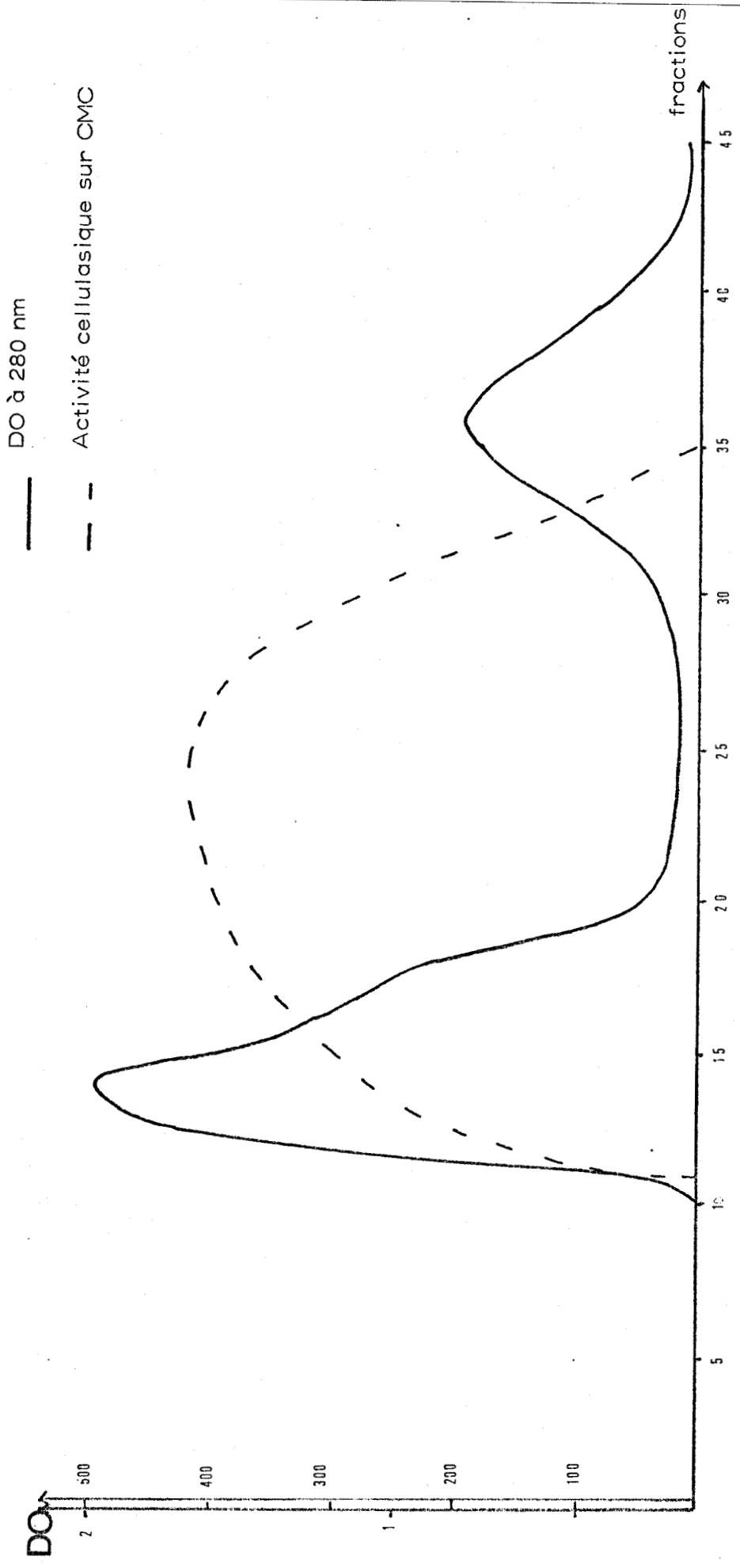


Figure 30 : FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX G 100

Dimension de la colonne : 80 x 2 cm - Débit : 0,4 ml par minute
 Fraction recueillie : 4 ml - Tampon Acétate 0,1 M ph 5,5

Nous avons reporté nos travaux sur la CM Sephadex. Les résultats obtenus ont été les suivants : figure 31.

. Nous voyons que les protéines sont facilement décrochées par de faibles molarités en Tampon.

. La mesure de la densité optique à 280 nm montre l'existence de deux pics dont l'un est très important.

. Le dosage des protéines par la méthode de LOWRY (59) permet de définir l'activité spécifique c'est-à-dire : $\mu\text{g/ml}$ de sucres réducteurs libérés par mg de protéine. Nous nous apercevons que le deuxième pic possède la plus forte activité spécifique.

Ainsi, le passage des extraits enzymatiques sur CM Sephadex permet de "purifier" sommairement les cellulases et d'obtenir une fraction protéique ayant une forte activité spécifique envers la CMC.

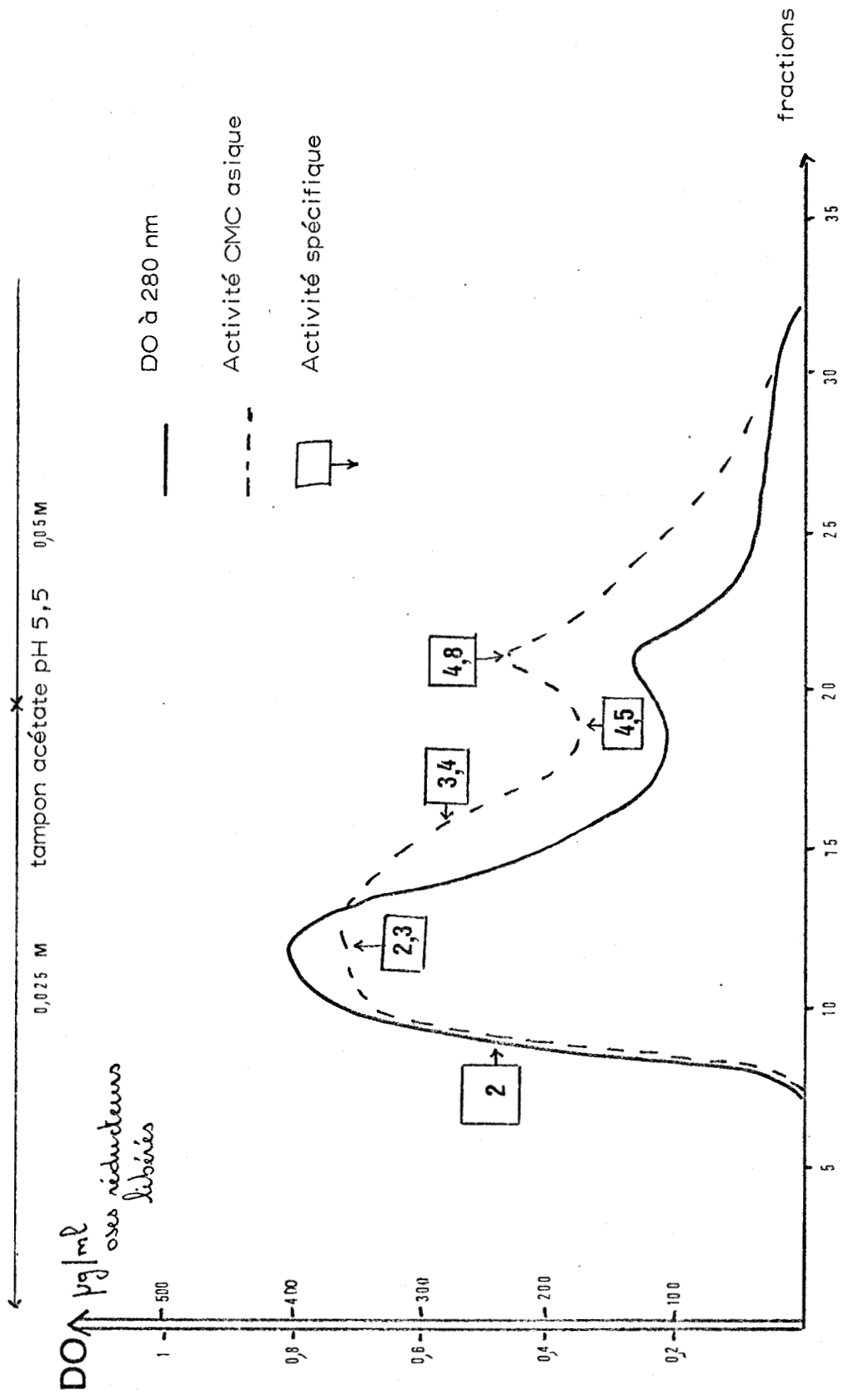


Figure 31 : FRACTIONNEMENT SUR CM Sephadex

Dimension de la colonne 55 x 2 cm - Débit 0,4 ml par minute - Fraction recueillie : 4ml

CONCLUSION

Les cellulases présentes dans le surnageant des cultures montrent une activité envers différents substrats cellulosiques insolubles ou solubles.

Nous avons étudié les différents paramètres influençant cette activité des cellulases en les testant sur la carboxyméthylcellulose. Les résultats ont montré un optimum d'activité en opérant à pH 5,5 et à une température d'incubation de 37°. La dégradation de la CMC n'est jamais totale ; deux systèmes limitateurs peuvent intervenir soit un effet de rétro-inhibition du glucose sur l'enzyme soit la présence d'inhibiteurs agissant à un certain niveau de la dégradation.

L'étude de l'influence de la concentration en substrat sur l'activité cellulasique permet de déterminer la constante de MICHAELIS K_M voisine de 0,6 % de carboxyméthylcellulose.

Les divers essais de fractionnement ont montré qu'il est possible d'obtenir, par passage sur colonne CM Sephadex, d'obtenir une fraction enzymatique ayant une forte activité spécifique.

CONCLUSION

GENERALE

Au terme de cette étude, nous pouvons dégager un certain nombre de points essentiels :

. Malgré les difficultés inhérentes à l'étude des bactéries du rumen de boeuf, nous avons pu évaluer leur activité cellulolytique "in vitro". Pour cela, il nous a fallu déterminer plusieurs critères :

- critère d'échantillonnage c'est-à-dire le prélèvement de liquide de rumen lequel contient les bactéries

- critère de dosage de l'activité cellulolytique

Les résultats ont montré que ces bactéries dégradent fortement la cellulose insoluble en très peu de temps : plus de 70 % de solubilisation de poudre de cellulose Whatman en 48 heures. Cette activité cellulolytique n'est pas ou très peu présente dans le surnageant du liquide du rumen.

. La culture "in vitro" en milieu liquide des bactéries du rumen n'est possible que si les conditions de culture respectent l'anaérobiose stricte indispensable à ces microorganismes et si le milieu apporte les différents nutriments nécessaires à leur développement. Le milieu de HUNGATE répond à ces exigences.

. L'optimisation de la cellulolyse, observée à partir des jus de culture a été rendue possible grâce à des modifications de la composition du milieu de HUNGATE. Ces modifications ont porté sur la nature de la source carbonée et azotée. De plus, des additions de composés divers ont permis de remplacer le liquide de rumen stérile incorporé au milieu de culture comme source nutritive. Ces composés sont :

- le produit atomisé du liquide de macération de maïs appelé Corn Steep

- la vitamine B₁₂ ou cyanocobalamine

- une solution d'acides gras volatils

. Ces résultats ont permis de réaliser une étude en fermenteur
Nous avons pu ainsi définir deux types d'activité :

- la première est liée aux bactéries vivantes,

- la deuxième est présente dans le surnageant des cultures
et correspond à l'activité cellulasique

L'ensemble de ces deux activités correspond à l'activité
cellulolytique que nous avons dosé dans les prélèvements de liquide de
rumen et dans les cultures de bactéries du rumen.

. Les méthodes de lyse bactérienne n'ont permis de libérer
qu'une très faible partie de l'activité liée aux microorganismes, cel-
lulases attachées aux membranes. Il se pourrait que celles-ci soient
détruites ou inactivées lors de leur libération. Cependant l'activité
cellulosique dans les surnageants est importante.

. Les études menées sur les cellulases libres ont permis de
définir leurs principales caractéristiques :

Elles montrent un optimum d'activité à pH 5,5 Tampon acétate
0,1 M et à la température de 37° envers différents substrats cellulosi-
ques solubles ou insolubles.

Ces résultats permettent d'espérer ouvrir une nouvelle voie
de production d'enzymes cellulolytiques, à partir de bactéries vraies.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - AKKADA A.R., BLACKBURN T.H.

Some observations on the nitrogen metabolism
of rumen proteolytic bacteria.

J. Gen. Microbiol

1963, 31, 461 - 469

- 2 - BENTLEY O.G., JOHNSON R.R.

Studies on factors needed by rumen Microorga-
nisms for cellulose digestion in vitro.

J. Animal Sci

1964, 13, 581 - 593

- 3 - BOMAR M.T., SCHMID S.

Control of the bacterial breakdown of cellulose.
Process Biochem.

1973, 8 (10), 22 - 23

- 4 - BRYANT M.P.

Symposium on microbial digestion in ruminants
Identification of groups of anaerobic bacteria
active in the rumen.

J. Animal Sci

1963, 22, 801 - 805

- 5 - BRYANT M.P., BURKEY L.A.

Numbers and some predominant groups of bacteria
in the rumen of cows fed different rations.

J. Dairy Sci

1953, 36, 218 - 232

- 6 - BRYANT M.P., BURKEY L.A.

Cultural methods and some characteristics of some
of the more numerous groups of bacteria in the
bovine rumen

J. Dairy Sci

1953, 36, 205 - 217

- 7 - BRYANT M.P., DOETSCH R.N.

A study of actively cellulolytic rod shaped bacteria of the bovine rumen.

J. Dairy Sci

1954, 37, 1176 - 1181

- 8 - BRYANT M.P., ROBINSON I.M.

An improved non selective culture medium for ruminal bacteria and its use in determining diurnal variation in numbers of bacteria in the rumen.

J. Dairy Sci

1961, 44, 1446 - 1452

- 9 - BRYANT M.P., ROBINSON I.M., HILDA CHU

Observations on the nutrition of *Bacteroides succinogenes*, a ruminal cellulolytic bacterium.

J. Dairy Sci

1959, 42, 1831 - 1834

- 10 - BRYANT M.P., SMALL N.

The anaerobic monotrichous butyric acid - producing curved rod shaped bacteria of the rumen.

J. Bacteriol

1956, 72, 16 - 22

- 11 - BRYANT M.P., SMALL N., BOUMA C., ROBINSON I.M.

Characteristics of ruminal anaerobic cellulolytic cocci and *Cillobacterium cellulosolvens* n. sp.

J. Bacteriol

1958, 76, 529 - 537

- 12 - BURROUGHS E.W., HEADLEY H.G., BETHKE R.M., GERLAUGH P.

Cellulose digestion in good and poor quality roughages using an artificial rumen

J. animal sci.

1950, 9, 513 - 518

- 13 - BURROUGHS E.W., LATONA A., DE PAUL P., GERLAUGH P.

Mineral influences upon urea utilization and cellulose digestion by rumen microorganism using the artificial rumen.

J. animal Sci
1951, 10, 693 - 698

- 14 - CALDWELL D.R., HUDSON R.

Sodium an obligate growth requirement for predominant rumen bacteria.

Appl. Microbiol
1974, 27 (3) 549 - 552

- 15 - CASON J.L., THOMAS W.E.

Cellulolytic activity of bovine rumen liquid upon a soluble cellulose derivative.

J. Dairy Sci
1955, 38, 608 - 615

- 16 - CONCHIE J.

Glucosidase from rumen Liquor.

Biochem J.
1954, 58, 552

- 17 - COWLING E.B., BROWN W.

Adv. Chem. Ser.

1969, 95, 152

- 18 - CRAMPTON E.W., MAYNARD L.A.

The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animals feeds.

J. Nutrition
1938, 15, 383-386

19 - DEHORITY B.A.

Isolation and characterisation of several
cellulolytic bacteria from in vitro rumen
fermentation.

J. Dairy Sci
1963, 46, 217 - 222

20 - DOETSCH R.N., ROBINSON R.Q., SHAW J.C.

Techniques employed in cellural investigations
of the bacteriology of bovine rumen contents.

J. animal Sci
1952, 11, 536 - 540

21 - DOETSCH R.N., ROBINSON R.Q.

The bacteriology of the bovine rumen : a review

J. Dairy Sci
1953, 36, 115 - 127

22 - DUNNING J.W., LATHROP E.C.

The Saccharification of Agricultural résidues.

Ind. Eng. Chem.
1945, (37) 1, 24 - 29

23 - EDWARDS C.

Determination of lignin and cellulose in forages
by extraction with tri-éthylène-glycol.

J. of Sci Food and Agricul.
1973, 24 (4) 381 - 388

24 - ELSDEN S.R.

The fermentation of carbohydrates in the rumen
of sheep.

J. Exp Biol
1945, 22, 51 - 63

25 - EPPS H.M.R., GALE E.F.

The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of *E. coli*.

Biochem J.

1942, 36, 619 - 623

26 - FUSEE M.C., LEATHERWOOD J.M.

Régulation of cellulase from *Ruminococcus*.

Can. J. Microbiol

1972, 18, 347 - 353

27 - GASCOIGNE J.A., GASCOIGNE M.M.

Biological decomposition of cellulose.

Butterworths London

1960

28 - GIESECKE D., HENDERICKX H.K.

Biologie und biochemie der mikrobiellen Verdauung.

B.L.V. München

1973

29 - GHOSE T.K.

Continuous enzymatic saccharification of cellulose with cultures filtrates of *Trichoderma viride*.

Biotech Bioeng

1969, 11, 239 - 261

30 - GILCHRIST F.M.C., KISTNER A.

J. agric. Sci.

1962, 59, 77

31 - GILL J.W., KING K.W.

Characteristics of free rumen cellulases

Agricultural and Food chemistry

1957, 5 (5) 363 - 367

32 - GILLIGAN W. REESE E.T.

Evidence for multiple components in microbial cellulase.

Can. J. Microbiol

1954, 1, 90 - 107

33 - GRIMES R.M.

Arch Biochem Biophys.

1957, 68, 412 - 414

34 - GRUBY D., DELAFOND O.

Compt. Rend.

1843, 17, 1305 - 1308

35 - HALL E.R.

Investigations on the microbiology cellulose. Utilization of domestics rabbits.

J. Gen. Microbiol

1952, 7, 350 - 357

36 - HALL G., CHENG E.W., BURROWS W.

B.vitamins and other factors stimulatory to cellulose digestion by washed suspensions of rumen microorganisms.

J. Animal Sci

1953, 12, 918 - 919

37 - HALLIWELL G.

Cellulolysis by Rumen Microorganisms

J. Gen. Microbiol

1957, 17, 153 - 165

38 - HALLIWELL G.

Cellulolytic preparations from micro-organisms of the rumen and from Myrothecium verrucaria

J. Gen Microbiol

1957, 17, 166 - 183

39 - HALLIWELL G.

Advan. Enzymic hydrolysis cellulose.

Related Mater. Proc. Symp.

1963, 71 - 92

40 - HALLIWELL G., BRYANT M.P.

The cellulolytic activity of pure strains of
bacteria from the rumen of the cattle.

J. Gen. Microbiol

1963, 32, 441 - 447

41 - HIGUCHI M.

Rumen and its microbes.

J. Agr. Chem. Soc.

1962, 36, 451 - 455

42 - HOBSON P.N.

Continuous culture of rumen bacteria : Apparatus.

J. Gen. Microbiol

1965, 38, 161 - 166

43 - HUHTANEN C.N., ROGERS M.R., GALL L.S.

Improved techniques for isolating and purifying
rumen organisms.

J. Bact

1952, 64, 17 - 23

44 - HUNGATE R.E.

The culture of Eudiplodinium neglectum with
experiments on the digestion of cellulose.

Biol. Bull. Woods hole

1942, 83, 303

45 - HUNGATE R.E.

Studies on cellulose fermentation. The culture
and isolation of cellulose decomposing bacteria
from the rumen of cattle.

J. Bacteriol

1947, 631 - 645

46 - HUNGATE R.E.

The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria
Bacteriol. Rev.
1950, 14, 1 - 9

47 - HUNGATE R.E.

Microorganisms in the rumen of cattle fed
a constant ration
Can. J. Microbiol
1957, 3, 289 - 295

48 - HUNGATE R.E.

The rumen and its microbes
Acad. Press New-York
1966

49 - HUSAIN A.

Phytopathology
1958, 48, 338

50 - KING K.W., SMITH P.H.

Comparisons of two media proposed for the
isolation of bacteria from the rumen
J. Bacteriol
1955, 70, 726 - 729.

51 - KING K.W.

Basic properties of the dextrinizing cellu-
loses from the rumen of the cattle
Virginia Agr. Expt. Sts.
Tech Bull
1956, 127

52 - KING K.W.

Biochem Biophys. Res. Comm.
1966, 24 (3) 295 - 298

53 - KISTNER A.

An improved method for viable counts of bacteria of the ovine rumen with ferment carbohydrates.

J. gen. Microbiol
1960, 23, 565 - 576

54 - KISTNER A., GOUWS L.

Cellulolytic cocci occurring in the rumen of sheep conditioned to luzern hay.

J. gen. Microbiol
1964, 34, 447 - 454

55 - KITTS W.D., UNDERKOFER L.A.

Digestion by rumen microorganisms. Hydrolytic products of cellulose and the cellulolytic enzymes.

J. Agr Food Chem.
1954, 2, 639 - 645

56 - KRISHNAMURTI C.R., KITTS W.D.

Preparation and properties of cellulases from rumen microorganisms.

Can J. Microbiol
1969, 15, 1373 - 1379

57 - LEATHERWOOD J.M.

Cellulase from Ruminococcus albus and mixed Rumen microorganisms.

Appl. Microbiol
1965, 13 (5), 771 - 775

58 - LEVINSON H.S., MANDELS G.R., REESE E.T.

Products of enzymatic hydrolysis of cellulose and its derivatives.

Arch. Biochem. Biophys.
1951, 31, 351 - 365

59 - LOWRY O.H., ROSENBROUGH N.J., FARR A.L.

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem.

1951, 193, 265 - 275

60 - MANDELS M., REESE E.T.

Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric.

Develop. Ind. Microbiol

1964, 5, 5 - 20

61 - MANN S.O.

An improved method for determining cellulolytic activity in anaerobic bacteria.

J. Appl. Bact.

1968, 31, 241 - 244

62 - Mc DOUGALL E.O.

Studies on ruminant saliva I. The composition and output of sheep's saliva.

Biochem J.

1947, 43, 99 - 103

63 - Mc NEILL J.J., DOETSCH R.N., SHAW J.C.

Some nutritonal requirements of bovine rumen bacteria.

J. Dairy Sci

1954, 37, 81 - 85

64 - MONOD J.

Mutation et adaptation enzymatique chez Escherichia coli mutabile.

Ann. Inst. Pasteur

1940, 72, 868 - 878

65 - MORRISON I.M.

J. Sci. Fd. Agric.

1972, 23, 455

66 - MERLE J.P.

Etude physico-chimique et morphologique du
mécanisme de dégradation enzymatique de la
cellulose.

Thèse 3° cycle Grenoble

1968

67 - NEIDHART F.C.

Mutant of *Aerobacter aerogenes* lacking
glucose repression.

J. Bacteriol.

1960, 80, 536 - 543

68 - NISIZAWA T., SUZUKI H., NISIZAWA K.

Catabolite repression of cellulase formation
in *Trichoderma viride*.

J. Biochem

1972, 71, 999 - 1007

69 - NORKRANS B.

Cellulose and cellulolysis.

Advan Appl. Microbiol

1967, 9, 91

70 - OKADA G.

Enzymatic studies on a cellulase system of
Trichoderma viride

II Purification and properties of two cellulases.

J. Biochem

1975, 77, 33 - 42

71 - PEYER J.C.

"Merycologia, sive de ruminantibus et ruminantio-
ne commentarius".

KOENING et Brandmyllerum

1885

72 - RAVERDY J.

Recherche des bacteries cellulolytiques du rumen
par les techniques de culture en milieu préréduit.

Thèse 3^e cycle Lille

1970

73 - REESE E.T.

A microbiological process report. Enzymatic
hydrolysis of cellulose.

Appl. Microbiol

1956, 4, 39 - 45

74 - REESE E.T.

Biological degradation of cellulose derivatives.

Ind. Eng. Chem.

1957, 49, 89 - 93

75 - REESE E.T., LEVINSON H.

A comparative study of the breakdown of cellulose
by microorganisms.

Physiol Plantarum

1952, 5, 345 - 366

76 - RUFENER W.H., NELSON W.O., WOLIN M.J.

Maintenance of the rumen microbial population
in continuous culture.

Appl. Microbiol

1963, 11, 196 - 201

77 - SELBY K.

The cellulose of *Trichoderma viride*. Separation of the components involved in the solubilization of cotton.

Biochem J.

1967, 104, 716 - 724

78 - SCOTT H.W., DEHORITY B.A.

Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria.

J. Bacteriol

1965, 89, 1169 - 1175

79 - SIJPESTEIJN A.K.

Cellulose decomposing bacteria from rumen of cattle.

Thèse Leiden Hollande

1948

80 - SIJPESTEIJN A.K.

On *ruminococcus flavefaciens*, a cellulose-decomposing bacterium from the rumen of the sheep and the cattle.

J. Gen. Microbiol

1951, 5, 869 - 875

81 - SLAVCHEV G.

Effet de la pénicilline et de la streptomycine sur la dégradation de la cellulose dans la panse du mouton.

Veter - med. Nauki

1972, 9 (8), 41 - 46

82 - SLYTER L.L., NELSON W.O., WOLIN M.J.

Modifications of a device for maintenance of the rumen microbial population in continuous culture

Appl. Microbiol

1964, 12 (4), 374 - 377

83 - SLYTER L.L., BRYANT M.P., WOLIN M.J.

Effect of pH on population and fermentation in
a continuously cultured rumen ecosystem.

Appl. Microbiol
1966, 14 (4), 573 - 578

84 - SOUTHGATE D.A.

J. Sci. Fd. Agri.
1969, 20, 331 - 332

85 - STANLEY R.W., KESTLER E.M.

Préparations and some properties of cell free
cellulolytic extracts of rumen fluid.

J. Dairy Sci
1959, 42, 127 - 136

86 - SUGDEN B.

The cultivation and metabolism of oligotrich
protozoa from the sheep's rumen.

J. Gen Microbiol
1953, 9, 44 - 50

87 - VAN SOEST P.J.

J. Ass. Off. Analyt. Chem.

1973, 56, 781 - 783

88 - WARNER A.C.I.

Criteria for establishing the validity of in
vitro studies with rumen microorganisms in
so-called Artificial rumen systems.

J. Gen. Microbiol
1956, 14, 733 - 748

89 - WALSETH C.S.

Occurrence of celluloses in enzyme preparation
from microorganisms.

Tappi

1952, 35, 228 - 233

90 - WHITAKER D.R.

Hydrolysis of a series of β - 1,4 - oligoglu-
cosides by *Myrothecium verrucaria* cellulase.

Arch Biochem Biophys

1954, 53, 439 - 449

91 - WHITAKER D.R.

The Enzymes

VII 1969, 273 - 290

92 - WILSON M.K., BRIGGS C.A.E.

The normal flora of the bovine rumen.

J. Appl. Bacteriol

1955, 18, 294 - 299

93 - YAMANE K., SUZUKI H., NISIZAWA K.

Purification and properties of extracellular
and cell-bound cellulase components of
pseudomonas fluorescens var *cellulosa*.

J. Biochem

1970, 67, 19 - 35

94 - YOSHIKAWA T., SUZUKI H., NISIZAWA K.

Biogeneses of multiple cellulase components of
pseudomonas fluorescens var *cellulosa*.

J. Biochem

1974, 75, 531 - 540