

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude à mon père Mouhamed Nachi et à ma chère maman Souad Ben Jabeur pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée; avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance.

A celui qui m'a transmis, l'amour, le courage, à toi chère fiancé Ahmed ; les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à ton égard.

Ce travail, et bien au-delà, je le dois à mes très chers beaux-parents Miloud et Hayet qui m'ont fourni au quotidien un soutien et une confiance sans faille et de ce fait, je ne saurais exprimer ma gratitude seulement par des mots. Que dieu vous protège et vous garde pour nous.

Je tiens à remercier mes précieux frères Malek, Heykel, Youssef et mes sœurs Cécile et Samia qui m'ont encouragé en tout moment de fatigue et de malaise tout le long de mon parcours d'études.

Je ne peux pas oublier d'exprimer mes sincères gratitude à tous les membres de ma grande famille qui ont ouvert leurs portes pour m'accueillir quand j'avais besoin d'eux.

Bref, je dédie finalement ce travail à tous mes collègues de la promotion 2013 pour les moments inoubliables passés ensemble et bien évidemment à mes amis que j'ai rencontré durant mon stage en France y compris mon équipe à l'IMBE, qui ont été toujours là pour moi.

Insaf

Remerciements

C'est un devoir bien agréable que de venir rendre hommage au terme de ce travail à ceux sans lesquels ils n'auraient pas pu être faits.

Je tiens à remercier Mme Imene CHERIF pour son aide inconditionnelle. Sans elle, je n'aurais pu jamais réaliser ce stage. Je la remercie aussi pour sa collaboration permanente et son soutien pratique et moral.

J'adresse ma sincère gratitude à Mme Isabelle PERRAUD-GAIME pour sa bienveillante collaboration, les conseils qu'elle m'a apportés lors des différents suivis. Qu'elle soit vivement remerciée. Je remercie aussi Monsieur Sevastianos ROUSSOS pour son accueil chaleureux et sympathique. Je tiens à remercier particulièrement mon collègue Sébastien FARGOSO pour la confiance qu'il m'a accordé tout le long de ce stage.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner ma reconnaissance à toute l'équipe de l'IMBE pour m'avoir intégrée rapidement au sein du laboratoire et leur coopération professionnelle durant ces trois mois.

L'occasion m'est offerte de remercier les personnes qui me font l'honneur de participer au jury chargé de juger ce travail.

Qu'il me soit permis de remercier tous mes professeurs qui ont si bien mené leur noble quête. Je les remercie non seulement pour le savoir qu'ils m'ont transmis, mais aussi pour la fierté et l'ambition que leurs personnes m'inspirent. Un spécial remerciement à ma professeure de Techniques de communications Mme Narjes RABOUDI pour ses recommandations judicieuses.

Présentation du laboratoire IMBE-IRD B&B

J'ai effectué mon stage de fin d'études du 01 Mars au 28 Mai 2013 au sein de l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Écologie marine et continentale (IMBE), à la Faculté des Sciences de St Jérôme, Campus de l'Etoile à Marseille, dans une équipe où travaillent plusieurs chercheurs de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

L'IRD est un établissement public à caractère scientifique et technologique, placé sous la double tutelle des ministères chargés de la Recherche de la Coopération. Il mène des programmes scientifiques, dans les pays du Sud, centrés sur les rapports entre l'Homme et son environnement, qui ont pour objectif de contribuer au développement durable.

1. L'institut IMBE :

L'Institut Méditerranéen de la Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale (IMBE, UMR CNRS 7263 - IRD 237) est une nouvelle Unité Mixte de Recherche créée au 01 janvier 2012.

Elle est dirigée par le Professeur Thierry TATONI et présente deux Directeurs Adjointes Scientifiques (Wolfgang CRAMER, Alexander ERESKOVSKY).

L'IMBE analyse les systèmes biologiques marins et continentaux, avec un regard particulier sur la biodiversité et le fonctionnement des écosystèmes. L'objectif est d'améliorer la conservation et la gestion des ressources naturelles face aux changements globaux. Avec plus de 200 professionnels de la recherche en environnement, l'institut apporte une compétence forte dans les domaines clés de la biodiversité, de l'évolution, de l'écologie, de la paléoécologie et des relations homme-milieu (écologie globale). Ses chercheurs utilisent et développent des approches de biologie fondamentale ou appliquée, et de modélisation.

L'objectif général de ce nouvel institut est de permettre l'expression du potentiel « Aixois - Marseillais » en écologie, de manière à développer une approche intégrative et interdisciplinaire (i.e. écologie globale) sur le continuum Mer-Continent-Société.

L'IMBE est adossé à quatre tutelles (Aix-Marseille Université, CNRS, IRD, Université d'Avignon) et regroupe plus de 200 personnes se répartissant dans 13 équipes et explorant 6 axes scientifiques majeurs, et se retrouvant autour d'un axe transversal dédié au transfert des connaissances pour la gestion de la biodiversité.

2. L'équipe IMBE-IRD Biotechnologies et Biorémédiation (B&B)

De nombreux écosystèmes (agrosystèmes, friches issues de sites post-industriels, milieux naturels...) sont soumis à des pollutions multiples (polluants organiques et inorganiques, composés toxiques d'origine biologique) présentant des risques de transfert pour le réseau trophique nuisant à la pérennité des écosystèmes. Dans ce contexte, l'équipe B&B étudie en conditions de laboratoire et in situ des solutions de détoxification, de dépollution ou de stabilisation de ces contaminants à l'aide de plantes et de micro-organismes. Le développement de techniques écologiques permet de donner des réponses se conformant à une démarche durable et environnementale que ce soit sur des sols à visée agricole ou des sols à réhabiliter voire à restaurer. L'objectif visé est de disposer de connaissances et d'un savoir-faire pour limiter l'accumulation de déchets dans l'environnement.

Historiquement, les chercheurs IRD de cette équipe ont travaillé depuis une trentaine d'années sur la valorisation des sous-produits agricoles tropicaux (café, olive, canne à sucre, tomate) par Fermentation en Milieu Solide (FMS). Ceux-ci peuvent être utilisés pour la production de biomasse ou de métabolites à partir de souches de champignons filamenteux soigneusement sélectionnées.

En parallèle, ces chercheurs travaillent sur la biodiversité et la biotechnologie des moisissures utiles et nuisibles ; la physiologie et le métabolisme des moisissures cultivées en FMS ; et la physiologie de la sporulation et production de spores de moisissures.

Liste des personnels de l'équipe B&B :

Nom	Prénom	Grade
GAIME-PERRAUD	Isabelle	CR2
LABROUSSE	Yoan	AI
LAFFONT-SCHWOB	Isabelle	MCF-Responsable d'équipe
MACARIE	Hervé	CR2
MARTINEZ	Martine	AJT
MASOTTI	Véronique	MCF
RABIER	Jacques	MCF
RANGON	Luc	TCN
ROUSSOS	Sevastianos	DR2
SALDUCCI	Marie-Dominique	TCE
WOIGNIER	Thierry	DR2

(MCF = Maître de Conférence, CR = Chargé de Recherches, AI = Assistant Ingénieur, DR = Directeur de Recherches, TCN = Technicien Classe Normale, TCE = Technicien Classe Exceptionnelle, AJT = Adjoint Technique)

Abréviations

ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
A. Primeur	Agreste Primeur
AFSSA	L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
BL	Bactéries Lactiques
DNS	Acide 3-5 dinitrosalicylique
DTU	Technical University of Denmark
IAA	Industries Agro-Alimentaires.
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
MRS	Le milieu Man, Rogosa, and Sharpe
MS	Matière Sèche
O-E	Orge humidifiée par de l'eau.
O-PL	Orge humidifiée par du petit lait.
O-PL-F	Orge humidifiée par du petit lait additionnée de déchets de fromage.
PCA	Le milieu Plate Count Agar
PDA	Milieu Potatoes Dextrose Agar
Rpm	Rotation par minute
UFC	Unité Formant Colonies
PCR	Polymerase Chain Reaction

AND Acide Désoxyribonucléique

DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1	2
1.1 Sous-produits agro-alimentaires	3
1.1.1 Définition	3
1.1.2 Quelques chiffres.....	4
1.2 Valorisation	5
1.2.1 Digestion anaérobie ou Méthanisation.....	5
1.2.2 Le compostage.....	5
1.2.3 L'extraction de molécules	6
1.2.4 Production de fibres alimentaires	7
1.2.5 Utilisation de la biomasse pour produire de l'éthanol.....	8
1.2.6 Alimentation animale	9
1.3 Différentes méthodes de conservation.....	10
1.3.1 Le séchage	10
1.3.2 Acidification chimique	10
1.3.3 Acidification biologique : Ensilage.....	11
1.4 Conservation par ensilage.....	11
1.4.1 Généralités.....	11
1.4.2 Barème d'appréciation de l'ensilage	12
1.5 Les bactéries lactiques	14
1.6 Les facteurs intervenant dans le processus d'ensilage.....	15
1.6.1 L'anaérobiose	15

1.6.2	Le pH.....	15
1.6.3	La teneur en matière sèche	17
1.6.4	La teneur en sucres fermentescibles	18
1.6.5	Les ferments lactiques	18
1.6.6	Le pouvoir tampon	19
1.7	Les étapes d'évolution d'un ensilage.....	19
1.8	Ensilage des sous-produits alimentaires	20
1.8.1	Ensilage du maïs et de ses déchets	20
1.8.2	Ensilage des déchets de blé	21
Chapitre 2	23
2.1	Nature et origine des substrats.....	24
2.2	Caractérisation des substrats.....	24
2.2.1	Caractérisation physico-chimique des substrats.....	24
2.2.2	Caractérisation microbiologique des substrats	26
2.3	La technique d'ensilage	27
2.3.1	Préparation des seringues	28
2.3.2	Conditions de fermentation d'ensilage.....	29
2.4	Le traitement des échantillons	29
2.5	Les techniques d'analyse	29
2.5.1	La teneur en matière sèche	29
2.5.2	La mesure du pH	30
2.5.3	Dosage de l'acide lactique.....	30
2.5.4	Suivi de la microflore	31

2.5.5	Caractérisation moléculaire de la communauté microbienne par la technique DGGE.....	31
2.6	Expression des résultats.....	34
2.6.1	Evaluation de la microflore.....	35
2.6.2	La teneur en sucres.....	35
2.6.3	Teneur en acide lactique.....	36
2.7	Outil de statistique.....	36
Chapitre 3	37
3.1	Caractérisation des substrats.....	38
3.1.1	Caractérisation physico-chimique des substrats.....	38
3.1.2	Caractérisation microbiologique des déchets.....	39
3.2	Confection des microsilos.....	40
3.3	Cinétique des ensilages.....	42
3.3.1	Evolution de l'humidité.....	42
3.3.2	Evolution du pH.....	43
3.3.3	Evolution des sucres.....	44
3.3.4	Evolution de l'acide lactique.....	45
3.3.5	Evolution de la microflore.....	46
3.3.6	Identification moléculaire :.....	49
Conclusion	51
Références bibliographiques	53
Annexes	58

Liste des tableaux

Tableau 1-1: Exemples de déchets d'industries agro-alimentaires (ADEME, 2000). ...	3
Tableau 1-2 : Quelques exemples de composés à extraire des déchets agro-alimentaires (Ademe, 2006).....	6
Tableau 1-3: Teneur en fibres alimentaires de certains déchets de céréales, d'oléagineux, de fruits.	7
Tableau 1-4: Quantité de déchets valorisés en alimentation animale en fonction de la filière de production (Petitjean, 1996).	9
Tableau 1-5 : Le pH de stabilité en fonction de la teneur en matière sèche de l'ensilage (Delteil, 2012).	13
Tableau 1-6: Barème d'appréciation de la qualité des ensilages (Vignau-Loustau & Huyghe, 2008).	13
Tableau 1-7: pH de croissance de certains micro-organismes	17
Tableau 1-8 : Quelques types de déchets de maïs et la teneur en ses différents constituants (% Matière sèche).	21
Tableau 1-9 : Composition des déchets selon le type de produit fabriqué à base de blé (% Matière sèche).	22
Tableau 2-1: la composition du mélange réactionnel de la PCR.....	32
Tableau 3-1: Caractéristiques physico-chimiques des substrats.....	38
Tableau 3-3: Caractéristiques physico-chimiques initiales des différents ensilages...	42

Liste des figures

Figure 1-1 : Répartition des déchets organiques produits par les industries alimentaires françaises en 2008 (A. primeur, 2010).	4
Figure 1-2 : Différentes étapes d'évolution d'un ensilage (Delteil , 2012)	19
Figure 2-1 : Schéma expliquant la technique de mesure de l'absorption de l'eau des substrats.....	25
Figure 2-2 : Schéma de la technique d'ensemencement par point des boîtes de pétri pour déterminer les dilutions optimales.	27
Figure 2-3 : Schéma explicatif du dispositif d'ensilage.	28
Figure 2-4 : Schéma résumant les analyses réalisées sur le substrat fermenté.	29
Figure 3-1 : Profil de capacité d'absorption et de rétention d'eau du matériel.....	39
Figure 3-2 : Distribution de la microflore totale de champignons, de bactéries, et de levures contenus dans types de déchets.	40
Figure 3-3 : Photo du dispositif d'un microsilo expérimental pour l'ensilage.	41
Figure 3-4 : Evolution de l'humidité des différents ensilages au cours du temps.....	42
Figure 3-5 : Evolution du pH au cours du temps.	43
Figure 3-6 : Evolution de teneur en sucres au cours du temps des trois ensilage dans des seringues de 100 g.	44
Figure 3-7 : Evolution de la teneur en acide lactique au cours du temps.	45
Figure 3-8 : Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-E]	46
Figure 3-9 : Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-PL].	47
Figure 3-10 : Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-PL-F]. ...	48
Figure 3-11 : Profil DGGE des trois types d'ensilage.	49

Liste des annexes

Annexe A : Composition des milieux de culture.....	59
Annexe B : Protocole de la coloration de Gram.....	61
Annexe C : Protocole du dosage de l'acide lactique.....	63
Annexe D : Exemple de fiche technique de la mise en œuvre d'un ensilage.....	64
Annexe E : Composition du Kit Extraction de l'ADN.....	66
Annexe F : Protocole de la DGGE.....	68

Introduction

Introduction générale

Les Industries de transformation des aliments produisent une grande quantité de sous-produits et de déchets. Les principaux volumes sont jetés dans la nature et posent de sérieux dégâts pour l'environnement, avec des risques sanitaires sur les êtres humains. D'où, la nécessité de les gérer en les valorisant.

L'objectif du projet NOSHAN, FP/KBBE/UE est de trouver les processus et les technologies nécessaires à l'utilisation des déchets alimentaires pour la production d'aliments pour bétail à un faible coût, faible consommation d'énergie et à une valorisation maximale des déchets. Ces produits doivent satisfaire les besoins nutritionnels des animaux et ne doivent causer aucun souci de maladies ou d'infections aux animaux.

Le problème majeur est de pouvoir conserver ces déchets avant de les transformer. Pour ceci l'Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie marine et continentale de Marseille (IMBE) est chargé d'étudier la partie « technologies de conservation et de stabilisation des déchets agro-alimentaires » du projet. Nous nous intéresserons alors à la technique de conservation par ensilage qui concernera des sous-produits alimentaires tels que des déchets laitiers (petit lait, écarts de fromagerie) et des déchets de céréales (orge, petits pois).

L'objectif de ce travail est d'étudier le pouvoir de l'ensilage à conserver les déchets agro-alimentaires en vue de leurs valorisations ultérieures. L'étude bibliographique que je présenterai au début de ce travail, permettra de donner une idée sur les déchets agro-alimentaires produits en France, les techniques utilisées pour les conserver et les domaines de réutilisation. Au niveau du matériel et méthodes, nous procéderons en premier temps à une caractérisation des déchets à ensiler. Puis tous les aspects de la mise en œuvre des dispositifs d'ensilage et du suivi du processus fermentaire sont ensuite abordés. Une discussion des résultats obtenus clôt l'étude des sous-produits ensilés.

Chapitre 1.

Etude Bibliographique

Au cours de cette étude bibliographique, il nous est apparu essentiel de donner dans un premier temps quelques chiffres sur les déchets agro-alimentaires en France. Ensuite nous présenterons les possibilités d'utilisation et de valorisation de ces sous-produits dont l'orge, le petit lait, les coques de pois et les écarts de fromagerie. Puis nous ferons le point sur les diverses techniques de conservation dont l'ensilage.

1.1 Sous-produits agro-alimentaires

1.1.1 Définition

Un sous-produit est un produit résidu qui apparaît durant la fabrication d'un produit fini. Pour la plupart d'entre eux, ces sous-produits sont conformes avec la législation en vigueur concernant l'alimentation animale (ADEME, 2000).

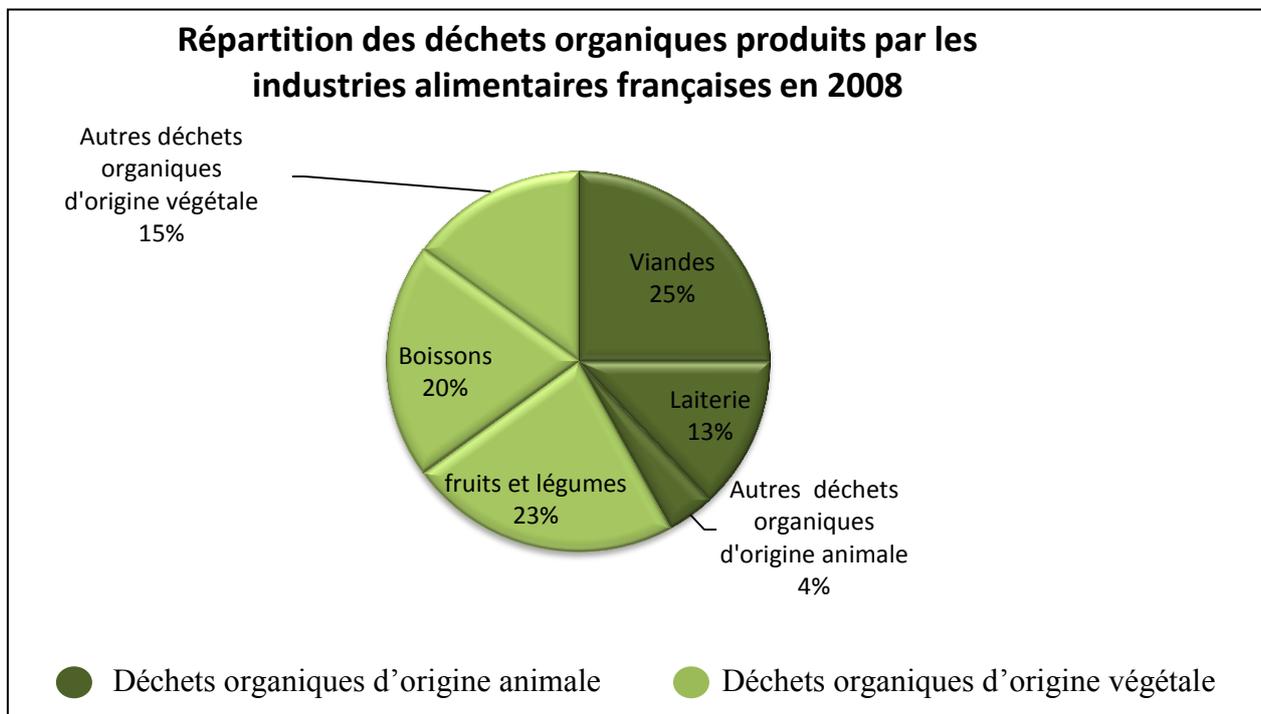
Toutes les industries alimentaires produisent des quantités plus au moins importantes de sous-produits dont le type diffère selon l'activité. Le tableau 1-1 illustre quelques exemples d'industries alimentaires et leurs déchets générés.

Tableau 1-1: Exemples de déchets d'industries agro-alimentaires (ADEME, 2000).

Activité	Type de déchet généré
Industrie de la viande abattage de bovins, ovins, caprins et porcins et filière charcuterie	Graisses, os, abats, déchets de découpe, cuir, poils...
Industrie du poisson	Arêtes, peaux...
Laiterie, fromagerie	Lactosérum, boues.
Sucrierie, distillerie de betteraves	Mélasses, pulpes humides, écumes, herbes et radicelles, tares terreuses.
Distilleries de brasserie, cidreries, malteries	Marc de pomme, gâteau de filtration, boues, effluents
Viticulture	Marc de raisin, lies, vinasses, déchets de distillation et de fermentation vinicole
Transformation des oléoprotéagineux (céréales)	Tourteaux, coques...
Fruits et légumes	Déchets végétaux (déchets de dégrillage, de parage et de découpe).

1.1.2 Quelques chiffres

Agreste Primeur (organisme chargé de la statistique, l'évaluation et la prospective agricole au Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de forêt) a rapporté que les industries alimentaires françaises en 2008 ont produit 805 000 tonnes de déchets organiques, soit 93% du total des déchets organiques de l'ensemble de l'industrie. Cela représente 17,48% de la totalité des déchets agro-alimentaires. La figure 1-1 montre la répartition des déchets organiques selon l'activité de l'industrie alimentaire (Agreste primeur, 2010).



Source : Insee - SSP - Agreste - Enquête sur la production de déchets non dangereux dans l'industrie en 2008

Figure 1-1 : Répartition des déchets organiques produits par les industries alimentaires françaises en 2008 (A. primeur, 2010).

D'après Agreste Primeur (2010), avec 227 500 tonnes, l'industrie de viandes est le plus gros producteur de déchets organiques (25%). L'industrie laitière vient en deuxième position (108 200 tonnes), soit 13% des déchets organiques totaux. Les déchets organiques végétaux sont essentiellement produits par l'industrie des fruits et légumes et l'industrie des boissons (respectivement 23% et 20 % du total des déchets organiques).

La quantité des déchets générés par les industries alimentaires est de plus en plus importante. La menace pour l'environnement et l'impact sanitaire sur l'homme sont devenus de sérieux problèmes, il est donc devenu indispensable de traiter et de valoriser les déchets au lieu de les laisser en décharges.

1.2 Valorisation

Les sous-produits des industries agro-alimentaires sont généralement riches en protéines, en glucides et en fibres comme les déchets de la filière de viande, les tourteaux des oléoprotéagineux, le lactosérum et les sous-produits sucriers. Ils peuvent être utilisés directement ou bien constituer un ingrédient d'un autre processus de production en vue de la fabrication d'un nouveau produit d'intérêt.

La valorisation et le recyclage des déchets sont assurés par différents procédés de traitement dont je cite quelques exemples :

1.2.1 Digestion anaérobie ou Méthanisation

La méthanisation, également appelée « digestion anaérobie », est un procédé biologique naturel au cours duquel des microorganismes digèrent en plusieurs étapes la matière organique dans des conditions anaérobies. Cette « digestion » va générer du « biogaz » riche en méthane et un « digestat », composé de matières organiques résiduelles, qui constitue un bon fertilisant (Fahrasmane & Ganou-Parfait, 1997).

La méthanisation permet de répondre à la double problématique de traitement des déchets fermentescibles et de production d'énergie verte (le biogaz).

1.2.2 Le compostage

Le compostage est un procédé biologique contrôlé qui permet, sous l'action de microorganismes aérobies, la dégradation accélérée de déchets organiques pour produire du compost stabilisé. Ce procédé est basé sur une succession de plusieurs populations de microorganismes. Les bactéries mésophiles consommant les sucres directement

fermentescibles et provoquent un accroissement de la température atteignant 60-70°C. Ensuite les champignons thermophiles dégradent les sucres les plus difficilement assimilables alors que la température continue à augmenter jusqu'à 71-77°C. Ces conditions stimulent l'élimination des agents pathogènes contenus dans les déchets entrants (Peter et al., 1999). Ces composts sont ensuite utilisés comme fertilisateurs et amendement du sol et comme substrats préférentiels de la culture des champignons de couche (de paris). En effet, le compostage est indispensable pour rendre les matériaux organiques assimilables pour la croissance de ces champignons en permettant l'obtention :

- d'un substrat sélectif (adéquat pour la culture des mycéliums recherchés et avec moins de contamination par des champignons indésirables).
- d'un substrat homogène ayant une structure homogène et un taux d'humidité constant (Nieuwenhuijzen, 2007).

1.2.3 L'extraction de molécules

Cette technique consiste à extraire un composé intéressant pour pouvoir par la suite le concentrer. Pour cela on utilise des solvants qui présentent des affinités avec les composés que l'on souhaite extraire. Le tableau 1-2 illustre quelques exemples de composés à extraire à partir de sous-produits agro-alimentaires.

Tableau 1-2 : Quelques exemples de composés à extraire des déchets agro-alimentaires (Ademe, 2006).

Sous-produits	Composés à extraire
Déchets de salade	Acides phénoliques et flavonols
Déchets d'oignon	Quercétine
Déchets de brocolis	Glucosinolates
Déchets de carottes	Caroténoïdes
Marc de pommes	Pectines, anthocyanes, les flavonoïdes, les tanins, et les acides

1.2.4 Production de fibres alimentaires

Les méthodes utilisées pour la récupération de ces fibres alimentaires sont purement enzymatiques (Elleuch et al., 2011).

Plusieurs études faites sur les déchets de marc de pommes et de poires, de balles d'avoine et d'autres céréales, ont prouvé la richesse de ses résidus en fibres alimentaires, principalement (cellulose, hémicellulose A et B, et lignine). La cellulose est le polysaccharide renouvelable la plus abondante sur terre et il est largement utilisé dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique. La cellulose est récupérée à partir des enveloppes de l'orge avec succès (elle représente 66% de la masse des enveloppes). Cette cellulose peut être utilisée comme source de glucides digestibles dans l'alimentation des poissons qui peuvent aider à réduire le coût de production d'aliments (Alhadi Ighwela et al., 2012). Le tableau 1-3 donne une idée sur la quantité de fibres alimentaires qu'on peut trouver dans quelques exemples de déchets agro-alimentaires.

Tableau 1-3: Teneur en fibres alimentaires de certains déchets de céréales, d'oléagineux, de fruits.

Source de fibres	Quantité de fibres alimentaires (% de matière sèche)	Références
Son de riz	27.04	Abdul-Hamid et Luan (2000)
Enveloppes de Sésames	42	Elleuch et al., (2007)
Gaines de feuilles de palmier roi	70.85	De Simas et al., (2010)
Marc de pommes	78.2–89.8	Figuerola et al., (2005)
Déchets de dattes	88–92.4	Elleuch et al., (2007)

Ces fibres alimentaires sont recherchées par les consommateurs qui de plus en plus préfèrent les suppléments naturels, à l'opposé de produits synthétiques source de toxicité. Ces

composés présentent de nombreuses vertus. Le son de blé, par exemple, semble démontrer une protection contre le cancer du côlon, même quand il est consommé avec un régime riche en matières grasses (Alabaster et al., 1997).

1.2.5 Utilisation de la biomasse pour produire de l'éthanol

Compte tenu des coûts de production d'énergie et des quantités d'éléments nutritifs disponibles, les déchets alimentaires pourraient être adaptés à la production de bioéthanol. A ce niveau, on définit deux générations de bioéthanol :

- Ceux de première génération : provenant de plantes riches en sucre comme la canne à sucre ou la betterave sucrière. On peut aussi l'obtenir à partir de plantes à forte teneur en amidon tel que le blé, le maïs et la pomme de terre.
- Ceux de deuxième génération : qui implique la production de biocarburants à partir de résidus agricoles et forestiers, de cultures dédiées et de déchets organiques et donc en évitant toute compétition avec la filière alimentaire. Les sucres utilisés proviennent des déchets de végétaux comme les résidus de canne à sucre, de betterave sucrière, de blé, de maïs... (Asada et al., 2005). De plus, des chercheurs ont découverts que les termites (les fourmis blanches) ont des bactéries capables de transformer de manière efficace et économique les déchets de bois en sucres destinés à la production d'éthanol (Nakamura & Sawada., 2003).

Ghobrini et al., (2012) ont travaillé sur les déchets de dattes variété NOUR et ont conclu que les rendements dans la production d'éthanol à partir de ces rebuts sont plus importants lors de fermentation en milieu solide qu'en milieu liquide. D'après Scram et al., (1993), vu que la production de vin dans la Communauté européenne dépasse la demande de 20-40%, il est intéressant de produire l'éthanol à partir des excédents de vin. Cependant, en utilisant les critères de production d'énergie et les couts de production, il a été calculé que les cultures annuelles telles que le blé et la betterave à sucre restent préférable comme matières premières que les raisins.

1.2.6 Alimentation animale

L'utilisation des déchets dans l'alimentation animale est une pratique universelle très ancienne. La société, essentiellement rurale, utilisait les déchets des ménages et assimilés pour nourrir le bétail (porcs, bovins, volailles). Cette pratique a presque complètement disparu. A titre d'exemple, avant la Seconde Guerre mondiale 80 à 90% du volume des déchets des restaurants et des cantines d'Ile-de-France étaient valorisés dans l'élevage ; aujourd'hui la proportion ne dépasse pas les 10%. Cette importante régression s'explique par la composition de nos poubelles qui est devenue de plus en plus défavorable pour ce type d'utilisation à cause de la diminution du taux de matières nobles organiques et l'augmentation des éléments nuisibles (plastiques, piles, produits chimiques dispersés).

A l'inverse, le développement des industries agro-alimentaires a engendré une masse croissante de déchets spécifiques et relativement homogènes du point de vue de leur composition (ex: tourteaux de soja, lactosérum, pulpes de distillerie, etc.), ce qui a permis très tôt de développer une importante filière de valorisation en alimentation animale. Aujourd'hui, en France, sur 43 millions de tonnes de déchets produits par les industries agro-alimentaires, 28 sont valorisés dans l'alimentation animale. Cette valorisation concerne essentiellement les produits à forte valeur intrinsèque, riches en protéines ou en glucides, comme les déchets de la filière viande, les tourteaux, le lactosérum et les sous-produits sucriers (Petitjean, 1996).

Le tableau 1-4 illustre pour chaque grande catégorie de déchets agro-alimentaires la part prise actuellement par la valorisation animale.

Tableau 1-4: Quantité de déchets valorisés en alimentation animale en fonction de la filière de production (Petitjean, 1996).

Filière de production	Valorisation en alimentation animale (en tonnes / an)
Viande	900 000
Laiterie / Fromagerie	8 880 000
Sucrierie et betterave	13 790 000
Céréales et meunerie	1 830 000

1.3 Différentes méthodes de conservation

La bonne utilisation de ces sous-produits nécessite la maîtrise de leur conservation. Ceci implique habituellement de retarder l'oxydation des graisses qui provoque le rancissement ou l'auto-oxydation et l'autolyse par les propres enzymes des cellules de l'aliment, d'empêcher le développement des bactéries, champignons et autres micro-organismes, et de lutter contre les ravageurs animaux, notamment les insectes et les rongeurs.

La conservation des sous-produits agro-alimentaires comprend un ensemble de procédés de traitement dont le but est de préserver les propriétés gustatives et nutritives et les caractéristiques de texture et de couleur des déchets alimentaires, ainsi que d'éviter d'éventuelles toxicités alimentaires dans le cas de déchets destinés à l'alimentation animale.

Dans le but de stopper la prolifération des micro-organismes, principale source de dégradation des aliments, plusieurs techniques sont utilisées, parmi lesquelles on peut citer :

1.3.1 Le séchage

Le séchage des déchets agro-alimentaires à l'air est l'un des procédés les plus anciens et les plus répandus de la conservation. Cette technique permet d'éliminer l'eau libre et une partie de l'eau liée. Contrairement à la déshydratation, cette méthode ne permet pas d'atteindre des valeurs suffisamment basses pour interdire le développement des spores et quelques formes végétatives. C'est pour ces raisons, que l'on doit veiller à éviter toute contamination par les *clostridium*.

Malgré son utilisation abondante, cette technique mène à deux principaux problèmes à savoir le risque d'altération de la forme, de la texture et des qualités nutritionnelles et organoleptiques du produit ainsi que la consommation énergétique considérable.

1.3.2 Acidification chimique

L'ajout d'un acide est une des techniques qui ont pour but de réduire rapidement le pH et donc d'éviter la multiplication des microorganismes à risques. Les agents chimiques utilisés pour acidifier les ensilages sont soit des acides minéraux (acides sulfurique et chlorhydrique), soit des acides organiques comme l'acide formique. L'incorporation de 3,5 litres d'acide

formique par tonne de fourrage permet d'abaisser instantanément le pH des graminées aux environs de 4,5 (AFSSA., 2004).

En raison, d'une part, des risques de brûlures pour le personnel et de leur corrosivité sur le matériel d'incorporation et de récolte, et d'autre part, d'incidences néfastes sur la santé des animaux (déminéralisation osseuse...), cette technique est de moins en moins utilisée.

1.3.3 Acidification biologique : Ensilage

L'ensilage est une méthode de conservation par voie humide passant par la fermentation lactique anaérobie afin de minimiser les pertes de matière sèche, de valeur alimentaire et d'éviter le développement de micro-organismes indésirables.

1.4 Conservation par ensilage

1.4.1 Généralités

L'ensilage se définit comme une technique de conservation du matériel humide (organique alimentaire) par une acidification anaérobie due à l'action de microorganismes. Cette technique est basée sur une fermentation par les bactéries lactiques qui transforment les hydrates de carbone en acides organiques principalement l'acide lactique (Weinberg et Muck, 1996 ; Saarisalo et al., 2007). L'acidification rapide du milieu stoppe le développement de microorganismes putréfiants y compris *Salmonella spp* (Martínez-Gamba et al., 2001) et l'anaérobiose interdit la croissance des champignons aérobies (McDonald et al., 1991).

Ramírez et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que l'ensilage améliore l'odeur et préserve la valeur nutritive de la matière. Une fermentation efficace assure généralement un aliment plus agréable au goût et digeste pour le bétail. Cela favorise au maximum la consommation de matière sèche par le bétail qui se traduit généralement par une augmentation de la production du lait et de meilleures performances de gains de poids pour le bœuf.

La matière première peut être soit des fourrages verts (herbe, plante entière de maïs, céréales immatures) ou des coproduits humides issus des industries agroalimentaires et des

cultures (pulpes de betterave, déchets de conserverie de légumes,...) qui peuvent ainsi être conservés durablement (AFSSA, 2004).

Perraud-Gaime (1995) a rapporté que le processus d'ensilage peut être assimilé à un système à trois composants : substrat végétal, enzyme, bactérie dans lequel chaque élément joue un rôle spécifique et primordial dans la réussite ou l'échec des ensilages.

Le substrat végétal contient les sucres nécessaires aux bactéries pour leur multiplication. Les enzymes végétales, parfois bactériennes vont dégrader les sucres complexes pour libérer les sucres simples assimilables par les bactéries lactiques. Ces dernières en se développant dans la masse du produit à ensiler, métabolisent les glucides et produisent de l'acide lactique, conservateur naturel de l'ensilage.

1.4.2 Barème d'appréciation de l'ensilage

La qualité de conservation d'un ensilage peut être estimée grâce à un barème d'appréciation proposé par l'INRA et établi à partir de la compilation des résultats des essais conduits sur l'ensilage. Ce barème dépend de plusieurs paramètres (AFSSA, 2004).

Le pH, révélateur de l'intensité des fermentations lactiques doit être inférieur à 4 pour les céréales. On parle de pH 'de stabilité'. Il dépend de la teneur en matière sèche de l'ensilage. Il fixe le niveau minimal d'acidification à atteindre en fonction de la teneur en matière sèche pour obtenir un milieu de fermentation en équilibre qui bloque les modifications chimiques et/ou enzymatiques dans la masse du produit ensilé. L'acidification doit également être réalisée le plus rapidement possible pour assurer l'inhibition des fermentations indésirables productrices d'acides gras volatils (acétique, propionique, butyrique) et d'alcools et pour réduire la perte en matières sèches. Le tableau 1-5 illustre le pH de stabilité en fonction de la matière sèche de l'ensilage.

Tableau 1-5 : Le pH de stabilité en fonction de la teneur en matière sèche de l'ensilage (Delteil, 2012).

MS (%)	pH
15-20	< 4
20-25	< 4.2
25-30	< 4.4
30-35	< 4.6
35-40	< 4.8

L'acide lactique, responsable de l'abaissement du pH et garant de la qualité de conservation ;

L'acide acétique, indice d'une mauvaise orientation des fermentations, ne doit pas dépasser 20-25 g par kg de MS. Au-dessus de 40 g, l'ensilage est mal consommé et les protéines se trouvent dégradées ;

L'acide butyrique, produit par les clostridies, doit se retrouver à l'état de traces (moins de 0,1 g par kg de MS d'ensilage) ;

L'ammoniac indique l'état de dégradation des protéines de l'ensilage.

Le tableau 1-6 illustre le classement des ensilages selon quatre paramètres.

Tableau 1-6: Barème d'appréciation de la qualité des ensilages (Vignau-Loustau & Huyghe, 2008).

Classe	Acide acétique	Acide butyrique	N-NH ₃ (% N Total)			N soluble (% N total)
	(g/kg MS)		Maïs	Luzeerne	Autres plantes	
Excellent	< 20	0	< 5	< 8	< 7	< 50
Bon	20-40	< 5	5-10	8-12	7-10	50-60
Médiocre	40-55	> 5	10-15	12-15	10-15	60-70
Mauvais	55-75	> 5	15-20	16-20	15-20	> 65
Très mauvais	> 75	> 5	> 20	> 20	> 20	> 75

1.5 Les bactéries lactiques

Les bactéries lactiques (BL) sont des bactéries Gram positif sous forme de bâtonnet ou de coque, non sporulé, immobile et qui produisent de l'acide lactique comme produit principal de leur métabolisme. Elles regroupent 12 genres bactériens dont les plus étudiés sont *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, et *Bifidobacterium*. Les bactéries lactiques sont largement utilisées dans des procédés industriels de fermentation agro-alimentaire et certains genres comme les lactobacilles ou les bifidobactéries sont des bactéries commensales qui font partie de la microflore intestinale.

Du fait de leur parfaite innocuité et de leur effet probiotique (pour certaines), les BL sont introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou de suppléments alimentaires et sont de plus en plus étudiées pour le développement de nouvelles technologies (Heyman et Heuvelin, 2006).

Les probiotiques sont des micro-organismes vivants, issus de la microflore intestinale humaine affectant positivement la santé de l'hôte. En s'implantant dans le tube digestif, elles peuvent interagir avec la flore intestinale. Ces interactions permettent d'améliorer l'équilibre de la microflore généralement par une stimulation du système immunitaire pour qu'il réagit rapidement à l'infection par des agents pathogènes et il inhibe la colonisation de l'intestin par des nuisibles ou bactéries pathogènes, mais aussi ça permet d'induire un effet anti-inflammatoire dans certaines maladies de l'intestin telles que les rectocolites hémorragiques et les pochites (inflammation de la poche iléoanale après résection colique) (Vanderhoof, 2001).

Ces souches doivent être inoffensives, résister aux sels biliaires et à l'acidité gastrique, adhérer aux cellules épithéliales pour persister suffisamment longtemps dans le tube digestif, produire des substances antimicrobiennes, moduler les réponses immunitaires et résister aux traitements technologiques industriels.

Parallèlement, l'intérêt s'est porté sur certains oligosaccharides non digestibles définis comme prébiotiques, qui favorisent et induisent le développement d'une flore spécifique

enrichie en bifidobactéries et qui sont utilisés seuls ou en combinaison avec les probiotiques (symbiotiques) (Heyman et Heuvelin, 2006).

1.6 Les facteurs intervenant dans le processus d'ensilage

La réalisation d'un ensilage est subordonné à l'installation précoce, rapide et intense de l'acidité lactique (65 à 70 % des acides totaux et un taux supérieur à 3% de matière sèche soit 30g/Kg de matière sèche). Cela se déroule spontanément lorsque les conditions suivantes sont réunies :

1.6.1 L'anaérobiose

L'anaérobiose est un facteur primordial pour réussir un ensilage. Si cette condition n'est pas remplie, la respiration des cellules brûle les sucres disponibles. Parallèlement, les diverses enzymes endogènes ou bactériennes dégradent les protéines. Certaines bactéries consomment l'acide lactique déjà formé suite à l'action des bactéries lactiques, ce qui fait remonter le pH et prolonge donc l'action des coliformes. Ces pertes de matière sèche s'accompagnent aussi d'une baisse de la valeur nutritive.

Pour cela l'anaérobiose doit s'instaurer le plus rapidement possible par :

- Le fort tassement des déchets dans le silo ou le micro-silo pour limiter la phase aérobie. Ce tassement est facilité par le hachage de la matière.
- L'étanchéité des parois des silos pour s'opposer à la pénétration d'air dans l'ensilage.

1.6.2 Le pH

Le pH de la masse ensilé est le facteur le plus important qui doit être contrôlé pendant l'ensilage. Il doit être abaissé le plus vite possible. Tant qu'il est élevé, les bactéries acétiques continuent à transformer les sucres en acide acétique (peu acidifiant et facteur d'inappétence) et les bactéries butyriques consomment l'acide lactique produit.

Pour éviter ces problèmes :

- Les déchets alimentaires doivent contenir une quantité suffisante de sucres solubles, utilisables par la flore lactique. Le hachage accélère la dégradation des constituants solubles par la flore lactique.
- Les végétaux ensilés doivent permettre une baisse rapide du pH ; ils ne doivent donc pas présenter de fort pouvoir tampon qui est dû à certains sels minéraux et aux protéines. Ces substances s'opposent aux variations brutales d'acidité.

Des opérations complémentaires permettent d'installer rapidement une forte acidité et limiter les fermentations butyriques :

- L'addition de substrats riches en sucres assimilables tel que pulpes, céréales broyées, mélasse pour compenser des substrats pauvres. Incorporation de ferments lactiques accélère l'acidification.
- L'addition de ferments lactiques pour augmenter une population endogène faible et favoriser la production rapide d'acides.
- Le sel épandu en surface du silo pour limiter le développement des spores butyriques. (Delteil, 2012).

Lorsque le pH baisse de 6,5 à 5, le développement de *Clostridium sp.* est réduit de 80% et la dégradation des protéines du fourrage est diminuée de 40%, alors que l'activité des ferments lactiques restent pratiquement à son optimum. En dessous de pH 5, le développement de la microflore indésirable (coliformes, bactéries lactiques hétérofermentaires ...) est considérablement réduit puis inhibé. Dans ces conditions, seule la fermentation lactique peut continuer à se développer dans la mesure où elle dispose d'un substrat suffisant en glucides solubles. Lorsque l'acidification atteint un pH 4, la protéolyse de la plante et les fermentations productrices d'acides gras volatils sont stoppées. Le tableau 1-7 donne une idée sur le pH de croissance de certains microorganismes susceptibles de se développer dans l'ensilage.

Tableau 1-7: pH de croissance de certains micro-organismes

Micro-organisme	Mini	Optimal	Maxi
Moisissures	1.5-3.5	4.5-6.8	8.0-11
Levures	2.0-3.5	4.0-6.5	8.0-8.5
Bactéries acétiques	2.0	5.4-6.3	9.2
Bactéries lactiques	3.2	5.5-6.5	10.5
<i>Pseudomonas</i>	5.6	7.0	8.0
<i>Salmonella sp</i>	4.5	7.0	8-9
<i>C.Botulinum</i>	4.8	7.0	8.2
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.3	6.5-7.5	9.5

1.6.3 La teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche est une condition importante qui doit être vérifiée avant de procéder à l'ensilage. Elle doit être suffisante pour réussir l'ensilage. Quand le déchet à ensiler est pauvre en matière sèche (une teneur inférieure à 27%), les pertes dans les jus d'écoulement seront importantes, de l'ordre de 60 à 80 grammes de matière sèche par litre de jus. La teneur optimale en matière sèche de l'ensilage est de 35% (Roberge et Toutain, 1999).

Cependant, si la teneur en matière sèche est trop importante (supérieure à 40%), la quantité d'acides volatils devient trop forte et la qualité de l'ensilage peu intéressante (Roussos et al., 1992).

1.6.4 La teneur en sucres fermentescibles

La concentration d'hydrates de carbone solubles est un des principaux déterminants du potentiel d'ensilage des fourrages. La matière sèche de la plante doit contenir au moins 12% de sucres pour alimenter correctement les fermentations (Delteil, 2012). Un déficit en hydrates de carbonnes fermentescibles entraine la production d'ensilage de qualité médiocre. Pour pallier à ce problème, on peut procéder à un apport de sucres ou de mélasse.

1.6.5 Les ferments lactiques

Pour pallier au déficit de ferments lactiques naturellement présents dans le substrat à ensiler, il est possible d'inoculer une quantité importante de bactéries lactiques (10^5 à 10^6 UFC / g de matière sèche) au moment de la récolte. Les études ont montré que ces germes peuvent augmenter le taux d'acidification et réduire le pH final et la dégradation des protéines (Weinberg et Muck, 1996).

Cependant, ces ferments doivent être rigoureusement sélectionnés pour leur capacité à se développer rapidement dans les conditions physico-chimiques particulières de fermentation (pH, température, pression osmotique...). De nombreux agents microbiologiques homologués existent actuellement sur le marché et permettent d'obtenir une qualité de conservation comparable à celle obtenue avec l'acide formique dans la mesure où ils sont correctement utilisés (dose d'application, incorporation homogène et utilisation sur des fourrages faciles à ensiler).

Contrairement aux additifs chimiques, les ferments sont avantageux car ils sont sûrs et faciles à utiliser, non-corrosifs pour les machines, ne polluent pas l'environnement, et sont considérés comme des produits naturels (Weinberg et Muck, 1996).

Généralement, pour l'ensilage, on procède à un mélange de bactéries lactiques homofermentaires performantes qui produisent le maximum d'acide lactique et des bactéries hétérofermentaires dont l'acide acétique produit permet de bloquer le développement des

levures (Holzer et al., 2003). Les bactéries lactiques les plus utilisées pour l'inoculation de l'ensilage sont *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici* et *Enterococcus faecium*.

1.6.6 Le pouvoir tampon

Le pouvoir tampon d'un ensilage représente sa capacité à résister à un abaissement du pH. Il est d'autant plus élevé que la plante est riche en matières azotées et en minéraux. Le pouvoir tampon se mesure par le nombre de mg d'acide lactique par gramme de matière sèche nécessaire pour amener le pH de l'ensilage à 4.

La teneur en glucides solubles et le pouvoir tampon de la plante conditionnent la facilité d'acidification de la masse. Les fourrages comme le maïs riche en glucides solubles et à faible pouvoir tampon, sont faciles à ensiler. A l'opposé, la luzerne et le dactyle contenant peu de glucides solubles et à pouvoir tampon élevé, sont difficiles à ensiler et il est alors indispensable d'avoir recours à des agents biologiques d'ensilage pour obtenir une acidification efficace (AFSSA, 2004).

1.7 Les étapes d'évolution d'un ensilage

La cinétique des ensilages englobe le suivi des différents paramètres physico-chimiques et microbiologiques. Les différentes phases de l'ensilage sont illustrées par la figure 1-2 :

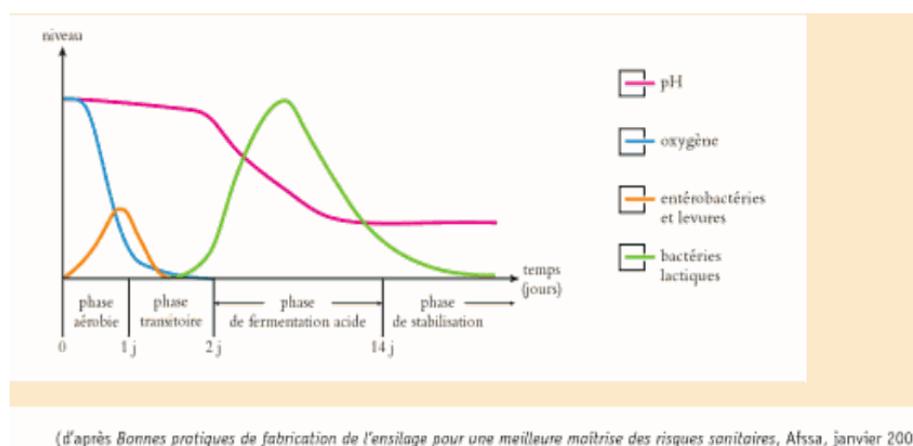


Figure 1-2: Différentes étapes d'évolution d'un ensilage (Delteil , 2012)

Après la réalisation du tas, l'oxygène résiduel dans la masse entretient la respiration des microorganismes : l'oxydation des glucides solubles libère du dioxyde de carbone, de l'eau et de la chaleur. Parallèlement les protéases dégradent les protéines en acides aminés qui peuvent ensuite être dégradés en ammoniac. Pendant cette première phase aérobie, on assiste donc à des pertes en matière organique.

L'épuisement progressif en oxygène permet l'installation de la flore anaérobie. Les bactéries lactiques endogènes transforment les glucides en acides lactiques et provoquent la chute du pH. Lorsque le pH baisse de 6,5 à 5, le développement de *Clostridium sp.* est réduit de 80% et la dégradation des protéines du fourrage est diminuée de 40%, alors que l'activité des ferments lactiques restent pratiquement à son optimum.

Dans la pratique, on essaye de réduire au maximum les deux premières phases, et commencer directement la fermentation. Ceci est assuré par une application instantanée d'anaérobiose et par une teneur initiale suffisante de matière sèche (Delteil, 2012).

1.8 Ensilage des sous-produits alimentaires

L'ensilage s'applique tant aux graminées fourragères qu'au maïs et éventuellement à des sous-produits agro-alimentaires comme la pulpe de betterave, les drêches de brasserie, etc. Il est cependant difficile à réussir avec certains fourrages comme la luzerne, pauvre en sucres solubles et riche en azote.

La part des céréales dans l'alimentation humaine est importante. Cette forte consommation génère un tonnage important de sous-produits, utilisés pour réduire le coût de l'alimentation animale (Saddek et al., 2008).

1.8.1 Ensilage du maïs et de ses déchets

Le maïs est l'une des cultures les plus ensilées dans le monde, en raison de sa cultivabilité facile, son taux de production élevé, et une quantité élevée de glucides solubles dans l'eau. Le maïs est caractérisé par un pourcentage élevé des pièces de déchets constitués

de rafles, de spathes (feuilles de l'épi) mais aussi d'autres parties de l'épi (soies et un peu de graines) et d'enveloppes avec le reste du noyau. Ces déchets sont très riches en hydrates de carbone, phosphore, magnésium, manganèse, zinc, fer, vitamine B et trace en vitamine A et E. Ces sous-produits peuvent être utilisés dans l'alimentation des bovins (Niedziółka et Szymanek, 2006). Le tableau 1-8 illustre quelques types de déchets de maïs et la teneur de ses différents constituants.

Tableau 1-8 : Quelques types de déchets de maïs et la teneur en ses différents constituants (% Matière sèche).

Type de déchets	Stade de rejet	Eau (%)	Fibres alimentaires	Protéines	Hydrates de carbones	Sucres	Lipides	Vitamines	Références
Épi de maïs	Déchets de récolte	17,9	3,5	0,5	86,3	N.D	0,5	N.D	Nangole et al., (1983)
Infusion de maïs	Production de l'amidon de maïs	50	0	46	16	0	0	0,7	Obayori et al., (2010)
L'huile de maïs	Extraction de l'huile de maïs	0	0	0	0	0	100	0	DTU (2009)
farine de maïs	Fabrication de la farine de maïs	11,1	3,6	7,6	88,5	1,4	3,1	<0,001	DTU (2009)
Résidu d'amidon	l'amidon de maïs	10,2	0,6	0,4	98,9	0	0,7	<0,001	DTU (2009)

1.8.2 Ensilage des déchets de blé

La richesse des déchets de blé en ses différents constituants rend ces sous-produits très intéressants à l'alimentation animale. Le tableau 1-9 donne une idée sur la composition des déchets des industries de blé.

Tableau 1-9 : Composition des déchets selon le type de produit fabriqué à base de blé (% Matière sèche).

Type de déchet	Stade de rejet	Eau (%)	Fibres	Protéines	Hydrates de carbones	Sucres	Lipides	Référence
Son de blé	Farine de blé	8,2	43,8	17,6	70,9	70,9	5,8	DTU, 2009
Amidon de blé	farine	12,7	4,2	11,0	86,7	0,6	1,8	DTU, 2009
Pate alimentaires	germe	6,7	13,2	30,1	55,0	16,8	10,3	DTU, 2009

Chapitre 2.

Matériel et méthodes

Au cours de ce chapitre, nous présenterons la nature et l'origine des déchets reçus. Ensuite, nous détaillerons le matériel utilisé et les protocoles mis au point pour la détermination des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des substrats. Puis, nous parlerons des techniques d'analyse et de suivi des différents ensilages réalisés

2.1 Nature et origine des substrats

L'étude a porté sur des sous-produits de nature différente. Ils sont tous récupérés à partir des industries d'origine allemande:

- Les déchets d'orge sont des résidus obtenus lors de la moisson. Le lot contient des graines d'orge, des enveloppes et des morceaux d'épi d'orges.
- Les déchets de petit pois sont les coques des pois jaunes issues d'une industrie de conserve des petits pois. Ces sous-produits représentent 12 à 20% de la matière première.
→ Ces deux déchets sont maintenus à température ambiante.
- Les déchets de fromages sont des résidus issus d'un procédé classique de fabrication de fromage à pâte molle et à pâte dure. Il s'agit de parties inconsommables telles que les croûtes.
- Le petit lait est le lactosérum issu du procédé de fabrication de fromage.
→ Ces deux sous-produits sont conservés à -18°C avant leur manipulation.

2.2 Caractérisation des substrats

2.2.1 Caractérisation physico-chimique des substrats

Avant de lancer les ensilages, nous avons effectué un ensemble d'analyses sur les sous-produits que nous disposons pour pouvoir choisir les substrats appropriés à être ensiler.

2.2.1.1 Matière sèche, humidité

Pour déterminer l'humidité du substrat, un échantillon de masse comprise entre 0.75 et 1.5 g est mis dans une coupelle en aluminium préalablement tarée et introduit dans l'analyseur d'humidité infrarouge MA35M-000230V1.

2.2.1.2 Mesure du pH

Le pH est mesuré sur une suspension composée de 2 g de substrat repris dans 18 ml d'eau distillée. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un pH mètre CyberScan muni d'une

électrode combinée. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen des solutions tampon de pH 4.0, 7.0, 10.0 à 25°C. Les mesures sont toujours faites en Triplica.

2.2.1.3 Mesure de l'absorption en eau

L'absorption d'eau est un critère important pour le choix de substrats à ensiler. Pour déterminer la capacité du sous-produit à absorber l'eau, on a procédé comme suit :

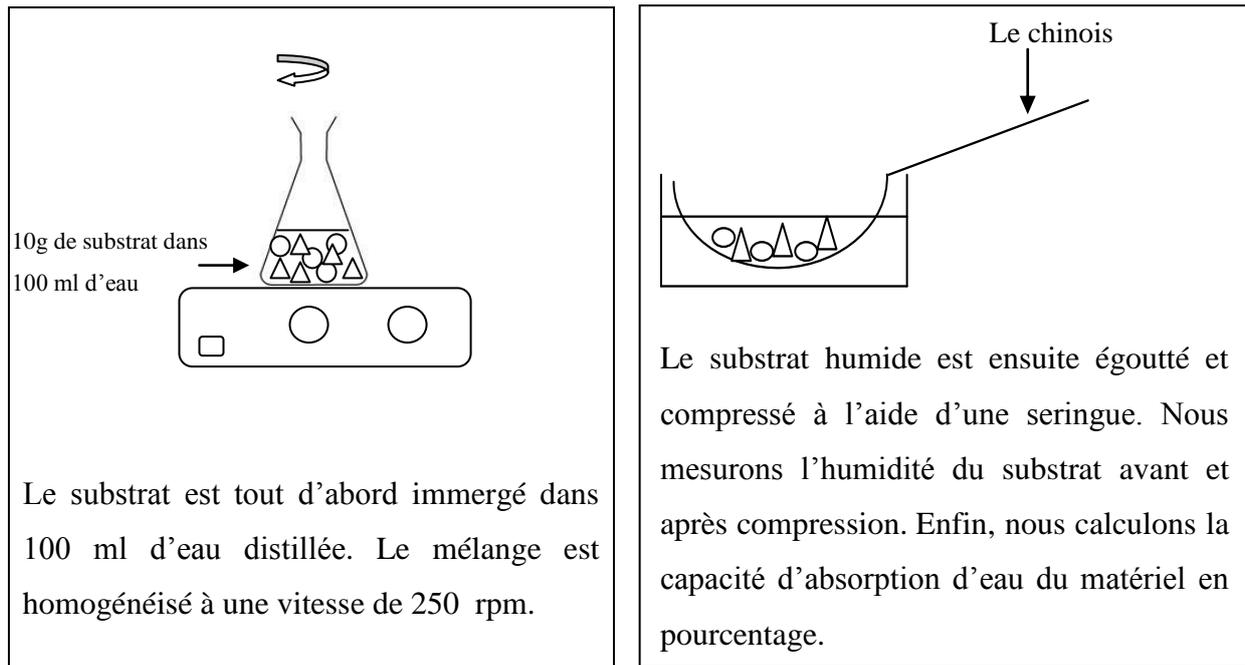


Figure 2-1: Schéma expliquant la technique de mesure de l'absorption de l'eau des substrats.

Pour avoir une idée claire sur la capacité de substrat à retenir l'eau, nous avons mesuré l'humidité de substrat non comprimé et l'humidité de substrat après compression.

2.2.1.4 Dosage des sucres réducteurs totaux

Les sucres réducteurs totaux sont dosés par la méthode de MILLER (1959). Le pouvoir réducteur des sucres permet de réduire l'acide 3-5 dinitrosalicylique (DNS) (de couleur jaune) en acide 3-amino-5-nitrosalicylique (de couleur jaune orangée) à chaud et en milieu basique. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'ose si l'on opère dans des conditions physico-chimiques constantes.

Une suspension de substrat dilué au 1/10 ou 1/100 est réalisée. Elle est ensuite centrifugée pour récupérer le surnageant dépourvu de pigments. Nous rajoutons 1,5 ml d'eau distillée et 1 ml de la solution DNS. Les tubes sont ensuite chauffés dans un bain marie à 90°C puis refroidis dans un bac d'eau glacée pendant 5 min avant de passer à la mesure de la densité optique par spectrophotométrie.

L'absorbance est mesurée à 530 nm. Une courbe étalon de glucose de 0 à 1 g.l⁻¹ a été réalisée pour chaque série de mesure afin d'exprimer les résultats en g.l⁻¹ d'équivalent de sucre réducteur.

2.2.2 Caractérisation microbiologique des substrats

2.2.2.1 Milieu de culture

Pour le comptage de la flore totale, nous avons utilisé les milieux suivants :

- Le milieu Plate Count Agar (PCA) pour estimer le nombre de bactéries aérobies mésophiles.
- Le MRS Agar (Le Man, Rogosa, and Sharpe Medium) pour compter la microflore lactique.
- Milieu Potatoes Dextrose Agar (PDA) additionné d'un antibiotique (chloramphénicol 5%) pour estimer la prolifération des levures et moisissures.

Les milieux Plate Count Agar, MRS Agar et PDA sont des produits Sigma prêts à l'emploi (Composition en Annexe A). Après stérilisation, tous ces milieux ont été répartis en boîtes de pétri de 90 mm de diamètre à raison de 20 ml par boîte.

2.2.2.2 Ensemencement et comptage :

Les dilutions décimales sont réalisées à partir d'une suspension mère composée de 10 g de substrats et de 90 ml d'eau distillée stérile additionnée d'un tensioactif (Tween 80 à 1 g.l⁻¹).

L'ensemble est homogénéisé pendant 10 min à 250 rpm. A partir de cette suspension, nous avons préparé une série de dilution jusqu'à 10⁻⁸.

Afin de limiter le nombre d'ensemencement, nous avons utilisé une technique d'évaluation des dilutions optimales à ensemercer développée par Perraud-Gaime en 1995. Cette technique consiste à déposer, sur une boîte de pétri de chaque milieu, 20µl de la solution mère (SM) et chacune des dilutions suivantes (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8}) comme indiqué sur la figure 2-2 :

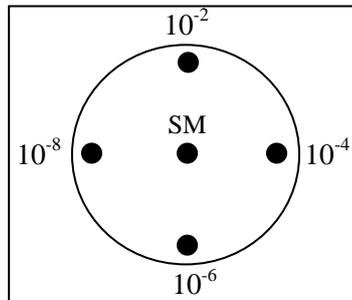


Figure 2-2: Schéma de la technique d'ensemencement par point des boîtes de pétri pour déterminer les dilutions optimales.

Les boîtes de pétri sont ensuite incubées à 28°C pendant 24h. Cette expérience permet d'optimiser l'ensemencement et de tester l'adéquation des milieux.

Ayant ciblé les dilutions qui permettront un comptage optimal des colonies par boîte, les différents milieux de culture sont inoculés en surface à partir d'une nouvelle série de dilutions, à raison de 20 µl de chaque dilution. Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 28°C pendant 24h. Les comptages se font au cours du temps. La distinction entre les bactéries et les levures est réalisé au microscope.

Le milieu MRS est incubé à 28°C, en atmosphère anaérobie grâce au système de jarres d'anaérobiose Merck dans lesquelles sont introduits des sachets d'anaérobiose. Ce système a permis de différencier les contaminants aérobies des microorganismes anaérobies.

2.3 La technique d'ensilage

Afin de suivre l'évolution biochimique et microbiologique des ensilages, nous avons développé un système de seringues en guise de micro silos dont la capacité est de 50 ml et de 100 ml de matériel humide.

Cette mise en œuvre comprend les étapes suivantes :

2.3.1 Préparation des seringues

Le choix des substrats à ensiler a été basé sur les caractérisations physico-chimique et microbiologique faites au préalable.

De ce fait, trois types de mélanges de substrats ont été testés. Le premier étant l'orge seule humidifiée avec de l'eau. Le deuxième consiste à une humidification de l'orge par le petit lait. Et le troisième mélange est de l'orge hydratée par le petit lait additionnée de déchets de fromages. Pour favoriser la pénétration de l'eau dans la structure rigide de l'orge, nous avons procédé à un pétrissage manuel intense et prolongé.

Le substrat est tout d'abord hydraté pour atteindre 60-65% d'humidité indispensable pour déclencher le procédé de fermentation. La seringue (1) de 100 ml est remplie en tassant suffisamment les substrats afin de limiter la quantité d'air. Le bout de la seringue (1) est lié à une autre seringue vide (2) par un tuyau fin. Cette dernière servira à récupérer les gaz et le jus libérés par le substrat au cours de sa fermentation. Pour empêcher l'échappement du gaz de la seringue (1), cette dernière est fermée à l'aide de bandes adhésives comme le montre la figure 2-3.

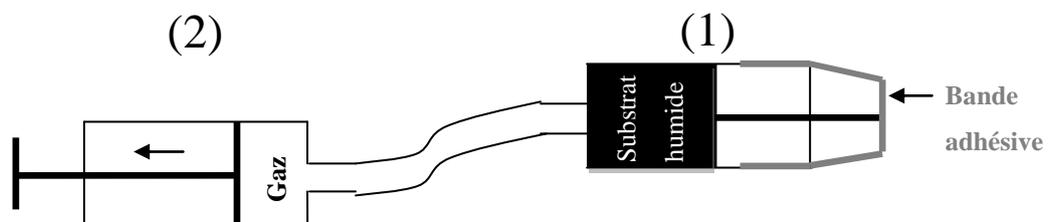


Figure 2-3: Schéma explicatif du dispositif d'ensilage.

Pour suivre les paramètres de la fermentation en fonction du temps, il est nécessaire de prélever une seringue correspondante à un temps donné. Pour ce faire, Nous avons préparé autant de seringues que de points de prélèvements souhaités. Les cinétiques des paramètres sont suivies par prélèvements d'ensilages aux jours 0, 1, 2, 3, 7 et 14.

2.3.2 Conditions de fermentation d'ensilage

Les seringues sont incubées à l'obscurité et à une température de 25°C pendant deux semaines.

2.4 Le traitement des échantillons

Pour étudier les paramètres de la fermentation en fonction du temps, il est nécessaire de prélever une seringue complète correspondante à un temps de fermentation donné. La figure 2-4 résume les analyses effectuées sur le substrat fermenté.

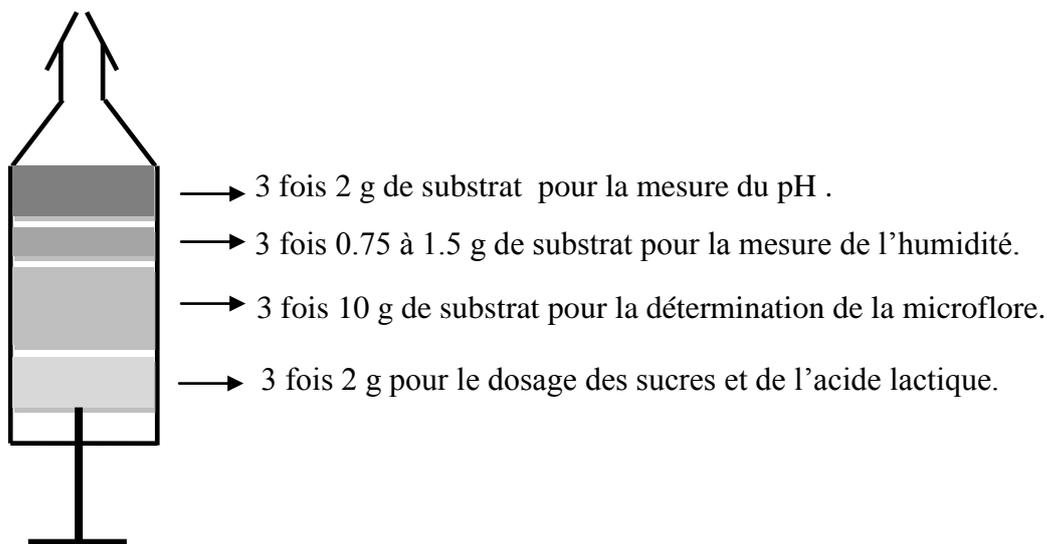


Figure 2-4: Schéma résumant les analyses réalisées sur le substrat fermenté.

2.5 Les techniques d'analyse

2.5.1 La teneur en matière sèche

Pour suivre l'évolution de l'ensilage, il est indispensable de suivre l'évolution de l'humidité du substrat fermenté. En effet, l'eau produite lors de la dégradation des substrats carbonés, ainsi que la perte du poids sec due à la respiration (minéralisation des composés organiques), conduisent à des variations de l'humidité des produits au cours de la

fermentation. Les mesures de l'humidité sont effectuées selon la technique exprimée en 2.2.1.1.

2.5.2 La mesure du pH

Pour la mesure du pH, 2g du substrat humide sont homogénéisés dans 18 ml d'eau distillée. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un pH mètre CyberScan muni d'une électrode combinée. L'étalonnage de l'appareil est réalisé au moyen des solutions tampon de pH 4.0, 7.0, 10.0 à 25°C.

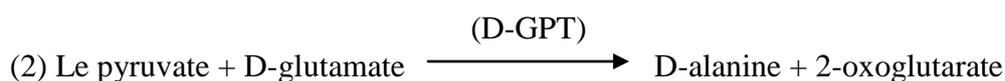
2.5.3 Dosage de l'acide lactique

L'acide lactique des échantillons est dosé à l'aide de kit Mégazime D-Acide lactique (D-Lactate) (Rapide). L'échantillon à doser est tout d'abord dilué avec de l'eau distillée. Ensuite, nous rajoutons 0.5 ml de tampon qui va assurer le bon fonctionnement des enzymes. Après, nous rajoutons 0.1 ml de NAD⁺ (nicotinamide-adénine dinucléotide) qui, en présence d'acide lactique, donne le pyruvate et le NADH. Ce dernier sera dosé par spectrophotométrie. Cette réaction est catalysée par l'enzyme D-lactate déshydrogénase (D-LDH) comme le montre la réaction (1) :

L'acide D-lactique (D-lactate) est oxydé en pyruvate comme le montre la réaction (1).



Cependant, l'équilibre de la réaction (1) est lié à la réaction (2) qui consiste à «piéger» le pyruvate. Ce résultat est obtenu par la conversion de pyruvate en D-alanine et de 2-oxoglutarate, avec l'enzyme Transaminase de D-glutamate-pyruvate (D-GPT), en présence d'un excès de D-glutamate (2).



Le dosage effectué concerne l'acide L-lactique. En pratique, nous rajoutons le D-GPT au début (0.02 ml), nous mesurons l'absorbance à une longueur d'ondes de 340 nm après un

repos de 3 min. Ensuite, nous rajoutons le L-LDH, nous laissons en repos 5 min et nous mesurons l'absorbance à la même longueur d'ondes.

2.5.4 Suivi de la microflore

La solution mère est réalisée à partir de 5 g ou 10 g d'orge dans 45 ml ou 90 ml (dilution au $1/10^{\text{ème}}$) d'eau distillée stérile additionnée de Tween 80. L'ensemble est homogénéisé à 250 rpm pendant 2 min. A partir de la solution mère nous avons préparé la série de dilution de 10^{-1} à 10^{-8} puis nous avons ensemencé en triplica les milieux de culture PCA, MRS et PDA + chloramphénicol par la méthode d'ensemencement par point décrite au 2.2.2. Un test de Gram a été réalisé sur les colonies suspectes.

2.5.5 Caractérisation moléculaire de la communauté microbienne par la technique DGGE

2.5.5.1 Principe de la DGGE

La DGGE (l'Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) est une méthode moléculaire qui permet de réaliser des empreintes génétiques des populations microbiennes présentes dans l'échantillon analysé. Cela consiste à séparer des molécules d'ADN ou d'ARN de grande taille selon leur composition en bases GC, ce qui n'est pas possible par une électrophorèse classique.

Lors de leurs migration, à travers le gradient dénaturant croissant, et lorsqu'une molécule atteint son point de fusion, elle devient simple brin ce qui freine son mouvement dans le gel. Nous utilisons la queue GC afin d'éviter une dénaturation totale des molécules.

2.5.5.2 Les étapes de la DGGE

Cette technique doit être précédée par certaines étapes :

- ✓ Extraction de l'ADN total: Cette étape est réalisée en utilisant un kit spécial pour l'extraction de l'ADN des plantes nommé « ABIOPureTM ». Il s'agit d'une méthode facile et rapide pour la purification de l'ADN total. Les échantillons sont broyés, mis dans le nitrogène liquide puis dans un tampon de lyse. Le lysat est traité avec ARNase pour

dégrader l'ARN puis filtré afin d'éliminer les débris cellulaires. Avec la présence de tampon de fixation, l'ADN génomique se lie à la matrice de la colonne. Les contaminants sont éliminés en utilisant un tampon de lavage. L'ADN purifié sera prêt à être amplifié par PRC. La composition du Kit utilisé et le protocole détaillé de l'extraction sont mentionnées dans l'Annexe E.

- ✓ Amplification de la région cible : Cette étape consiste à amplifier une zone de l'ADN ribosomique 16S (de taille environ 630 Paires de bases) en utilisant des amorces spécifiques par la technique PCR.

Le tableau 2-1 illustre la composition du mélange réactionnel de la PCR.

Tableau 2-1: la composition du mélange réactionnel de la PCR.

Réactifs	Dose pour un seul échantillon (µl)	Dose pour tous les échantillons (µl)
Tampon 10 ×	2,50	45
MgCl ₂	1,50	27
dNTP	0,20	3,60
Amorce 357 GC (sens)	0,30	5,40
Amorce 907 R (anti-	0,30	5,40
Taq polymérase	0,25	4,50
ADN	1,00	341,10
H ₂ O	18,95	341,10

L'amplification est accomplie selon le protocole thermique suivant :

- 1^{ère} étape de dénaturation : 95°C pendant 4 min.
- 2^{ème} étape :

Le cycle (1) x 10 :

- Une dénaturation à une température de 94°C pendant 30 secondes.
- Une hybridation à 61°C pendant 1minute.
- Une élongation à 72°C pendant 1minute.

Le cycle (2) x 25 :

- Une dénaturation à une température de 94°C pendant 30 secondes.
- Une hybridation à 56°C pendant 1minute.

- Une élongation à 72°C pendant 1 minute.
 - Une étape d'élongation à 72°C pendant 7 minutes.
 - Une phase de refroidissement jusqu'à 4°C.
- ✓ Electrophorèse sur gel d'agarose : l'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les molécules dans un champ électrique sur la base de la charge, de la taille et de la forme. Si une molécule d'ADN (chargé négativement) est coupée en petites sections et placée dans un puits à l'extrémité cathode d'un gel d'agarose, les fragments vont migrer dans le gel vers l'anode. Leur vitesse va dépendre de leurs tailles individuelles, et de ce fait ils finiront par former des bandes localisées en différentes positions dans le gel. La bande peut alors être visualisée par le bromure d'éthidium qui permet à l'ADN de fluorescer sous lumière UV.
- ✓ La DGGE (Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) : Le mélange des produits de la réaction de PCR est mis à migrer sur un gel présentant un gradient vertical de dénaturant. Le protocole de la DGGE est détaillé en Annexe F.
- ✓ Réamplification par PCR : L'amplification est accomplie en utilisant le protocole thermique est le suivant :
- 1^{ère} étape de dénaturation : 94°C pendant 5 min.
 - 2^{ème} étape :
- Le cycle x 30 :
- Une dénaturation à une température de 92°C pendant 5 min.
 - Une hybridation à 60°C pendant 1 minute.
 - Une élongation à 72°C pendant 1 minute.
- Une étape d'élongation à 72°C pendant 10 minutes.
 - Une phase de refroidissement jusqu'à 4°C.
- ✓ Séquençage :
- Le séquençage est précédé par une découpe des bandes dominantes du gel. Les morceaux ont ensuite été transférés chacun dans 80 µl d'eau stérile et incubés à 37 ° C durant une nuit pour permettre la diffusion de l'ADN. Les fragments peuvent ensuite être clonés et séquencés afin de connaître l'identité taxonomique des différentes bandes.

La technique de séquençage nécessite un ensemble d'étapes qui doivent être réalisées prudemment :

- **Purification :**

Elle consiste à éliminer les impuretés qui sont dans ce cas les dNTP et les amorces résiduels de la PCR.

Nous utilisons alors deux enzymes :

- Exonucléase 1 (20 U/ μ l) qui a pour rôle de dégrader les dNTP .
- Shrimp Alkaline phosphatase (1 U/ μ l) pour dégrader les amorces.

Dans le thermocycleur, les conditions de la réaction enzymatique sont les suivantes :

- ✓ Activation enzymatique à 37 °C pendant 40 min.
- ✓ Inactivation enzymatique à 90 °C pendant 20 min.

- **Ajout des amorces :**

L'amorce est une courte séquence d'ADN complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière par une ADN polymérase.

- **Ajout du mélange réactionnel :**

Le mélange réactionnel contient les éléments suivants :

- 1 μ l du Big Dye qui contient les ddNTP (fluorescent), dNTP, MgCl₂.
- 2 μ l de tampon (contient la polymérase).
- 5.5 μ l d'eau distillée stérile.

- **Marquage :**

Le programme de séquençage est le suivant :

- ❖ Dénaturation initiale : 96 °C pendant 1 min.
- ❖ Dénaturation : 95°C pendant 10 sec.
- ❖ Hybridation 50°C pendant 5 sec.
- ❖ Elongation 60°C pendant 4 min.
- ❖ Refroidissement 40°C pendant 10 min.

2.6 Expression des résultats

Au cours de ce travail, tous les résultats expérimentaux seront exprimés par rapport au poids de Matière sèche (PMS).

2.6.1 Evaluation de la microflore

Pour ramener le nombre de colonies au % MS, on a utilisé la formule suivante :

$$M = \frac{\text{Nombre de colonies} \times D \times SM}{I \times P \times (\%MS / 100)}$$

Où :

M est le nombre de colonie par gramme de matière sèche [UFC / gms] ;

D est le facteur de dilution ;

SM est le volume de la solution mère [L] ;

I est la volume de l'inoculum [L] ;

P est la prise d'essai [g] ;

% MS est la teneur en matière sèche de l'échantillon [%].

Les résultats obtenus sont la moyenne des essais.

2.6.2 La teneur en sucres

Les résultats expérimentaux des sucres réducteurs sont exprimés en g.L⁻¹. Nous avons utilisé la formule suivante pour les convertir en pourcentage de matière sèche :

$$Q_{\text{Sucre}} = \frac{X \times V \times D}{M \times \%MS} \times 100$$

Où :

Q_{Sucre} est la quantité de sucre par 100g MS ;

X est la concentration en sucre par dosage obtenue en rapportant l'absorbance sur la courbe étalon [g.l⁻¹] ;

M est la masse de substrat [g] ;

V est le volume total de la suspension [ml] ;

% MS est la teneur en matière sèche de l'échantillon [%].

2.6.3 Teneur en acide lactique

Déterminer la différence d'absorbance (A2-A1) pour le blanc et l'échantillon. Soustraire la différence d'absorbance du blanc de la différence d'absorbance de l'échantillon, en obtenant ainsi $\Delta A_{D\text{-lactique}}$. La valeur de l'acide $\Delta A_{D\text{-lactique}}$ doit en règle générale être d'au moins 0,100 unités d'absorbance pour obtenir des résultats suffisamment précis.

La concentration de l'acide D-lactique peut être calculé comme suit:

$$C = \frac{V \times PM}{\epsilon \times D \times v}$$

Où:

V = volume final [ml] ;

PM = poids moléculaire de l'acide D-lactique [g / mol] ;

ϵ = coefficient d'extinction du NADH à 340 nm = 6300 [L x mol⁻¹ x cm⁻¹] ;

D = chemin lumineux [cm] ;

v = volume de l'échantillon [ml].

Ce qui signifie :

$$C = \frac{2,24 \times 90,1 \times \Delta A_{D\text{-lactique}}}{6300 \times 1,0 \times 0,1} \quad [\text{g.l}^{-1}]$$

$$= 0,3204 \times \Delta A_{D\text{-lactique}} \quad [\text{g.l}^{-1}]$$

Si l'échantillon a été dilué lors de la préparation, le résultat doit être multiplié par le facteur de dilution.

2.7 Outil de statistique

Pour que les interprétations soient représentatives, j'ai analysé les résultats obtenus avec le logiciel de statistique SPSS.

Chapitre 3.

Résultats et discussion

Ce chapitre est dédié à la présentation des résultats de la caractérisation des substrats analysés. Nous exposerons aussi les courbes de suivi des différents paramètres d'analyse. Et nous discuterons les phénomènes observés tout en comparant nos bilans à d'autres réalisés auparavant.

3.1 Caractérisation des substrats

Nous disposons d'un ensemble de sous-produits de nature différente (des déchets d'orge, du petit lait, des résidus de petit pois et des écarts de fromagerie). Nous avons caractérisé ces substrats afin de déterminer lesquels sont les plus appropriés pour être ensilés. La caractérisation des substrats implique des analyses physico-chimiques (pH, humidité, teneur en sucre) et une numération de la microflore totale. Toutes les mesures ont été faites en triplica.

3.1.1 Caractérisation physico-chimique des substrats

Le tableau 3-1 regroupe les résultats des analyses préliminaires réalisées sur les différents substrats.

Tableau 3-1: Caractéristiques physico-chimiques des substrats.

	Déchets d'orge	Coques de pois	Fromage	Petit lait
pH	6,02 ± 0,04	5,59 ± 0,08	5,17 ± 0,04	4,25 ± 0,02
Humidité (%)	4,37 ± 0,10	10,22 ± 0,21	5,19 ± 0,16	94,50 ± 0,19
Sucres (%MS)	2,76 ± 0,09	0,41 ± 0,02	0,19 ± 0,01	54,82 ± 0,24

Le pH initial des différents substrats est supérieur à 4. Cette condition est favorable au développement des microorganismes indésirables. Donc, il est essentiel d'abaisser ces valeurs par acidification pour une meilleure conservation.

Le petit lait est un sous-produit riche en sucres assimilables par les bactéries lactiques (54,82%).

L'absorption d'eau est aussi un paramètre important puisque ça nous donne une idée sur la capacité du substrat d'absorber et de retenir l'eau.

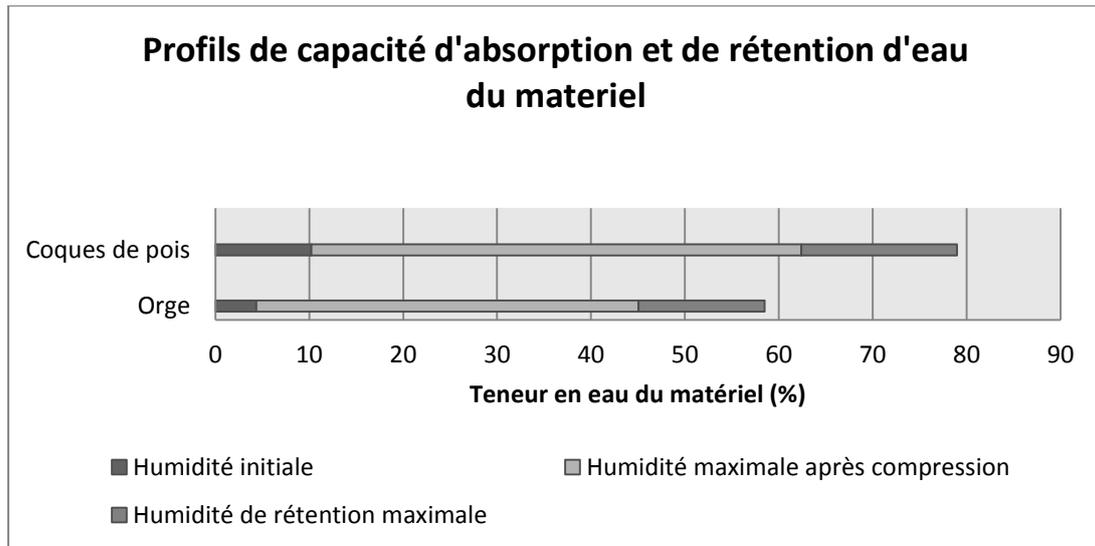


Figure 3-1: Profil de capacité d'absorption et de rétention d'eau du matériel.

D'après ce graphe, nous remarquons que les coques de pois ont une capacité d'absorption et de rétention d'eau supérieure à celle de l'orge. Cependant, en compressant les coques de pois, nous avons obtenu une pâte sans structure qui sera difficilement ensilable.

Nous n'avons pas pu mesurer l'absorption d'eau pour le fromage puisqu'il se désagrège rapidement dans l'eau. Donc ce paramètre a été mesuré seulement pour les déchets d'orge et les coques de petits pois.

3.1.2 Caractérisation microbiologique des déchets

Tous les comptages ont été réalisés en Triplica suivant le protocole décrit au 2.2.2 de manière rigoureusement identique. On peut donc supposer que le facteur d'erreur lié à ce type de comptage est le même pour tous les résultats obtenus.

La représentation en Log du nombre de germes (UFC) par gramme de substrat (Figure 3-2) permet de mieux comprendre les résultats.

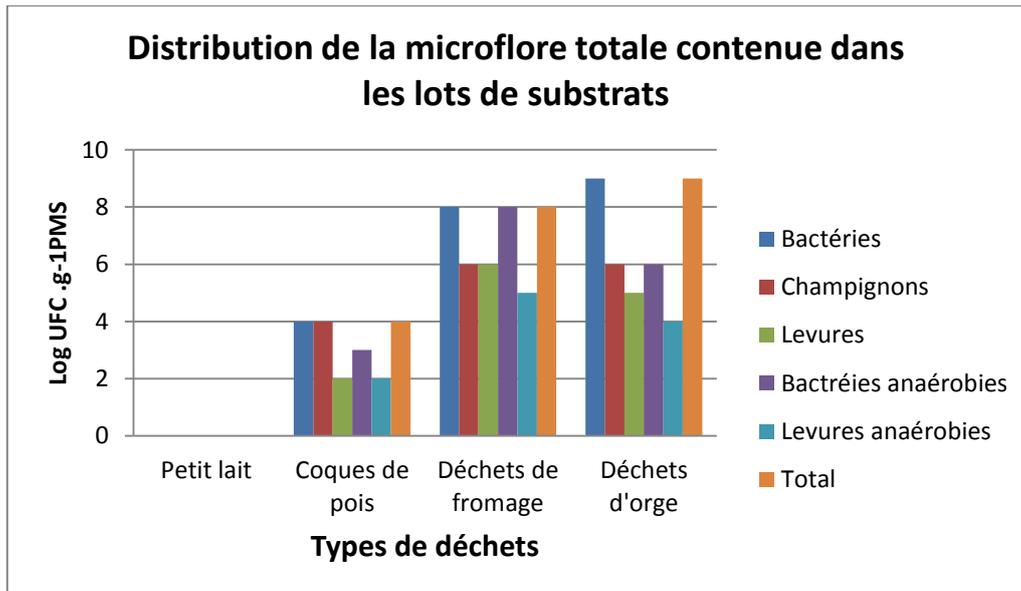


Figure 3-2: Distribution de la microflore totale de champignons, de bactéries, et de levures contenus dans types de déchets.

La microflore totale des déchets de fromage est nettement supérieure à celle des coques de pois. Le petit lait reçu ne contient pas de microorganismes. Le résultat du comptage microbien des déchets d'orge est variable. Cela peut être dû à l'hétérogénéité des échantillons reçus.

D'après les résultats de la distribution de la microflore, les déchets de fromage peuvent être une source de microorganismes. Puisque l'orge est pauvre en sucres, l'ajout du petit lait paraît intéressant.

3.2 Confection des microsilos

Nous avons réalisé trois types d'ensilage :

1. L'orge seule réhydratée avec de l'eau.
2. L'orge réhydratée avec du petit lait, source de sucres assimilables.
3. L'orge réhydratée avec du petit lait et additionnée de déchets de fromage susceptible d'apporter ou d'augmenter la population de ferments lactiques



Figure 3-3: Photo du dispositif d'un microsilo expérimental pour l'ensilage.

La réhydratation a été faite de façon à obtenir une humidité initiale proche de 65%. Cette condition est essentielle pour assurer un bon ensilage (Roberge et Toutain, 1999).

Vu la difficulté d'absorption d'eau par les déchets d'orge, nous avons essayé d'écraser les graines avec nos mains afin de faciliter la pénétration de l'eau dans la structure rigide de l'orge.

Pour le reste du rapport, nous utiliserons les abréviations suivantes :

[O-E] désigne l'orge humidifiée par de l'eau.

[O-PL] désigne l'orge humidifiée par du petit lait.

[O-PL-F] désigne l'orge humidifiée par le petit lait additionnée de déchets de fromage.

Le tableau 3-3 regroupe les caractéristiques physico-chimiques des ensilages au temps T0. Ils sont tous réalisés à partir d'un même lot d'orge.

Tableau 3-2: Caractéristiques physico-chimiques initiales des différents ensilages.

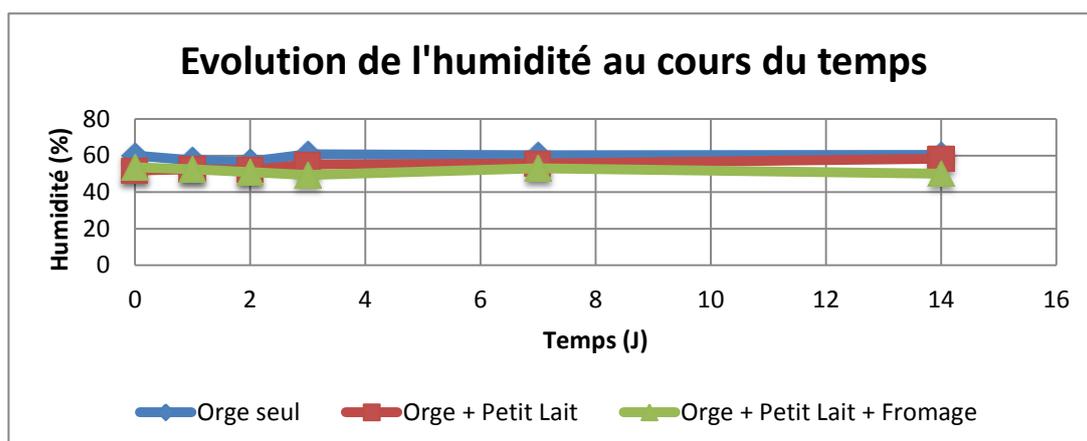
	Humidité	pH
O - E	57.37 ± 6.04	5.69 ± 0.03
O-PL	56.86 ± 2.45	5.17 ± 0.07
O-PL-F	55,51 ± 2.90	5.15 ± 0.02

Les valeurs de l'humidité des lots d'ensilage d'orge sont aux alentours à 65%. Cependant, l'écart type est assez grand à cause de l'hétérogénéité de l'orge. Il y a une grande dispersion entre les échantillons d'ensilage.

3.3 Cinétique des ensilages

Tout d'abord, nous avons étudié d'un point de vue microbiologique et biochimique un ensilage naturel d'orge seule. Ensuite, avons déterminé l'impact de l'humidification de l'orge par du petit lait. Et enfin, nous avons examiné l'impact de l'ajout des écarts de fromagerie à cet ensilage. Le suivi des paramètres physico-chimiques et microbiologiques a été fait aux temps T0 puis les jours 1, 2, 3, 7 et 14. Nous avons testé les ensilages dans micro silos de 5 à ml et de 100 ml mais les résultats présentés sont ceux de la cinétique des micro silos de 100g. Un exemple de fiche technique est présenté en Annexe D.

3.3.1 Evolution de l'humidité

**Figure 3-4:** Evolution de l'humidité des différents ensilages au cours du temps.

On en déduit que l'humidité des substrats est restée presque stable durant les 14 jours. Elle est aux alentours de 60% dans le cas de l'ensilage de l'orge seule. Dans le cas des deux autres types d'ensilage, elle est un peu moindre. Ces résultats sont conformes à ceux de Roberge et Toutain (1999) et Perraud Gaime (1995) qui ont rapporté que la teneur en matière sèche doit être supérieure ou égale à 30%.

Les résultats statistiques sont inférieurs à 0,05 ce qui signifie que la date d'ensilage et le temps ont un effet significatif sur l'humidité au seuil de signification 5%. L'interaction entre la date et le type d'ensilage n'est pas significative.

3.3.2 Evolution du pH

Les profils de pH des différents ensilages au cours de 14 jours d'incubation sont présentés dans la figure 3-5.

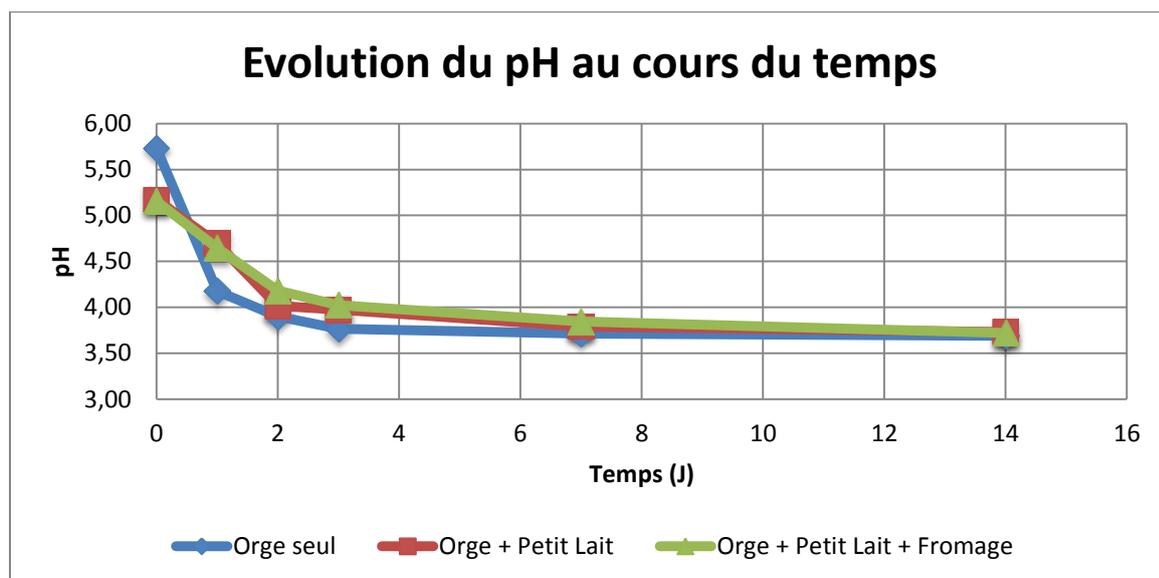


Figure 3-5: Evolution du pH au cours du temps.

La diminution du pH des trois ensilages est rapide et se stabilise à partir du 3^{ème} jour dans le cas de [O-E] et à partir du 5^{ème} jour dans les deux autres cas. L'acidification de [O-E] est la

plus rapide vu qu'il a atteint une valeur de pH égale à 3,75 pourtant qu'il avait initialement le pH le plus élevé.

D'après Martin-Rosset (2011), si la teneur en matière sèche est comprise entre 35 et 40%, le pH de stabilité doit être inférieur à 4.8. Le pH final de tous les ensilages est inférieur à 4. Cette condition assure normalement l'inhibition des fermentations indésirables productrices d'acides gras volatils.

Les résultats statistiques sont inférieurs à 0,05, ce qui signifie la date d'ensilage et le temps ont un effet significatif sur le pH au seuil de signification 5%. L'interaction entre la date et le type d'ensilage est significative.

3.3.3 Evolution des sucres

La figure 3-6 présente l'évolution du taux des sucres au cours des trois types d'ensilage.

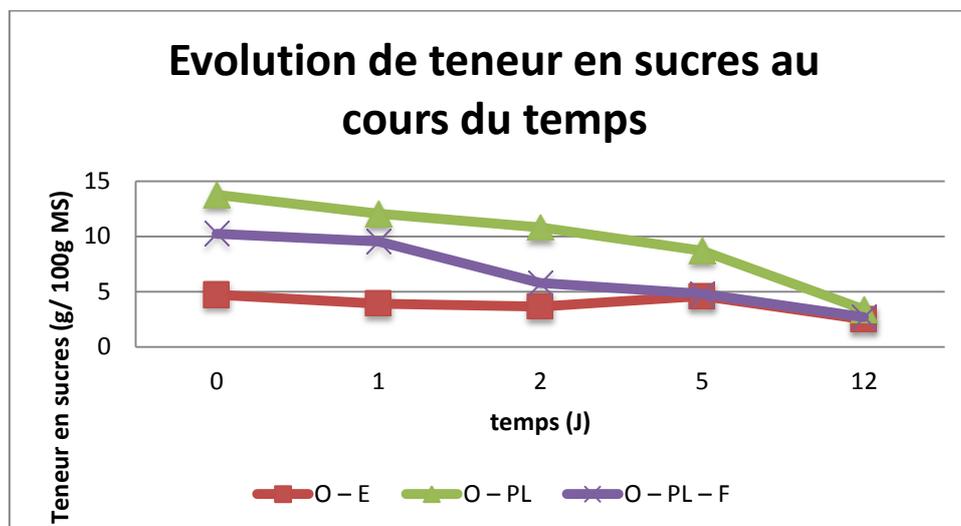


Figure 3-6 : Evolution de teneur en sucres au cours du temps des trois ensilage dans des seringues de 100 g.

Dans le cas de l'orge humidifiée avec le petit lait, la concentration initiale en sucre est de 13%, alors qu'elle est plus faible dans le cas des deux autres types d'ensilage. De plus, la concentration en sucres solubles diminuent en même temps que le pH. D'après Delteil

(2012), la concentration d'hydrates de carbone solubles initiale doit être au moins 12% pour alimenter correctement les fermentations.

Dans le cas de l'ensilage de type [O-E], ce taux est relativement faible (environ 5%). La quantité des sucres n'évoluent pas vraiment au cours de l'ensilage, il ne s'agit donc pas d'un facteur limitant. Un déficit en hydrates de carbonnes fermentescibles entraine la production d'ensilage de qualité médiocre. Pour pallier à ce problème, on peut procéder à un apport de sucres ou de mélasse.

Les résultats statistiques sont inférieurs à 0,05 donc la date d'ensilage et le temps ont un effet significatif sur la teneur en sucres au seuil de signification 5%. L'interaction entre la date et le type d'ensilage est significative.

3.3.4 Evolution de l'acide lactique

L'acide lactique est le principal responsable de l'abaissement du pH et de la qualité de l'ensilage. La réalisation d'un ensilage est subordonnée à l'installation précoce, rapide et intense de l'acidité lactique (un taux supérieur à 4% de matière sèche soit 40g/Kg de matière sèche) (AFFSA, 2004).

La cinétique d'évolution de l'acide L-lactique est présentée dans la figure 3-7.

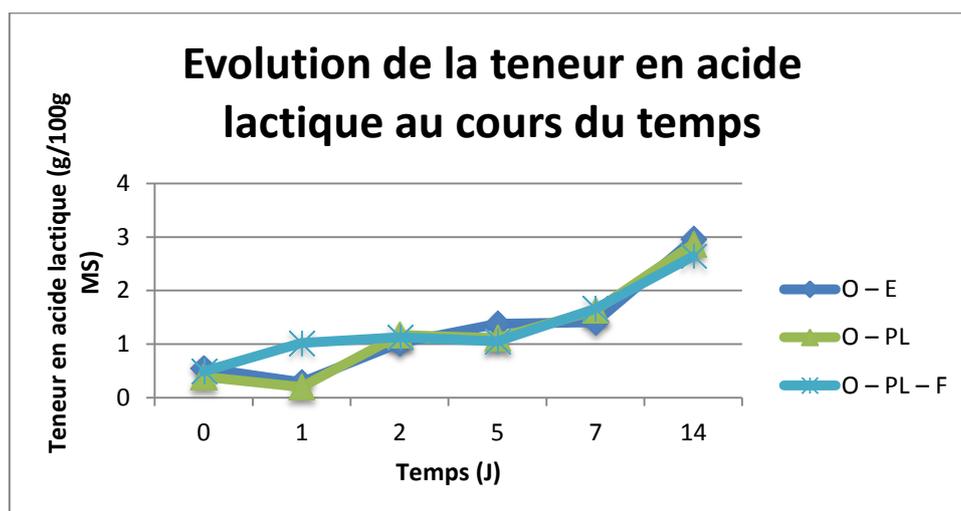


Figure 3-7: Evolution de la teneur en acide lactique au cours du temps.

Dans le cas des ensilages [O-E] et [O-PL], au bout du 1^{er} jour, il y avait une chute de l'acidité puis ça a repris. Les valeurs finales d'acide lactique sont aux alentours de 3%, légèrement inférieures à la valeur minimale recommandée par AFSSA.

3.3.5 Evolution de la microflore

Tous les comptages ont été réalisés en triplica suivant le protocole décrit au 2.5.4 de manière identique. Les figures 3-8, 3-9 et 3-10 présentent les résultats obtenus sur les ensilages en nombre de germes formant colonie (UFC) par gramme de matière sèche.

3.3.5.1 Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-E]

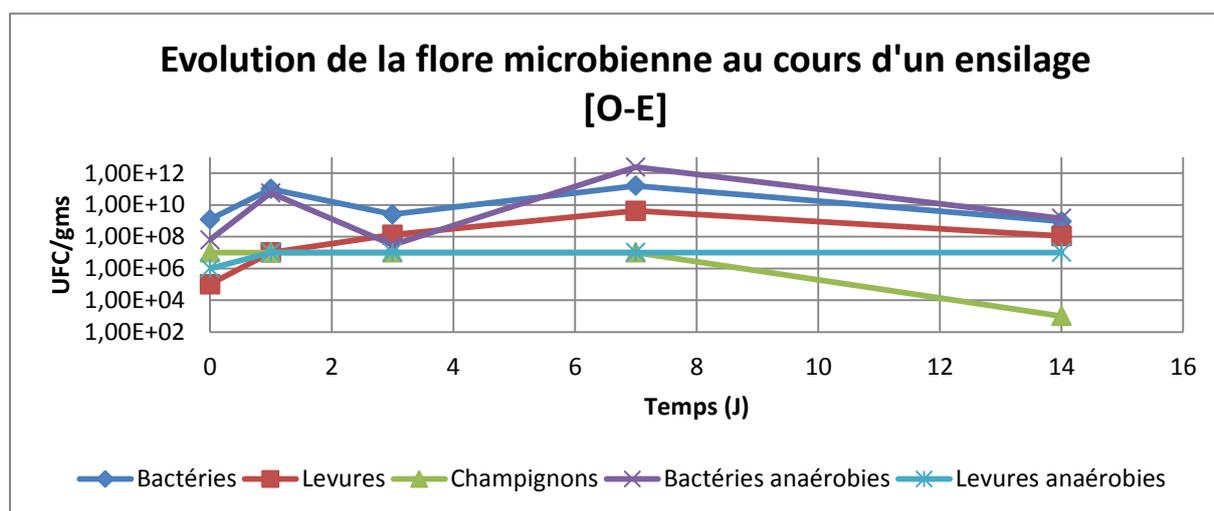


Figure 3-8 : Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-E]

Dans le cas de l'ensilage [O-E], la population des bactéries anaérobies suit une fluctuation. Au bout du 7^{ème} jour, elle est maximale (elle atteint 10^{12}). A partir de ce jour-là, nous avons remarqué une chute des champignons, alors que la population des levures a proliféré comme le montre la figure 3-8. L'acide lactique avait une action inhibitrice seulement sur le développement du champignon. Ceci peut être dû au manque d'acide lactique de sucre. De ce point de vue, les principaux paramètres physico-chimiques ont évolué d'une manière cohérente avec les résultats microbiologiques obtenus. Le manque de sucre dans l'orge a limité l'instauration d'acidité, ce qui a favorisé le développement des levures.

3.3.5.2 Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-PL]

La figure 3-9 présente l'évolution de la microflore totale au cours des 14 jours d'ensilages.

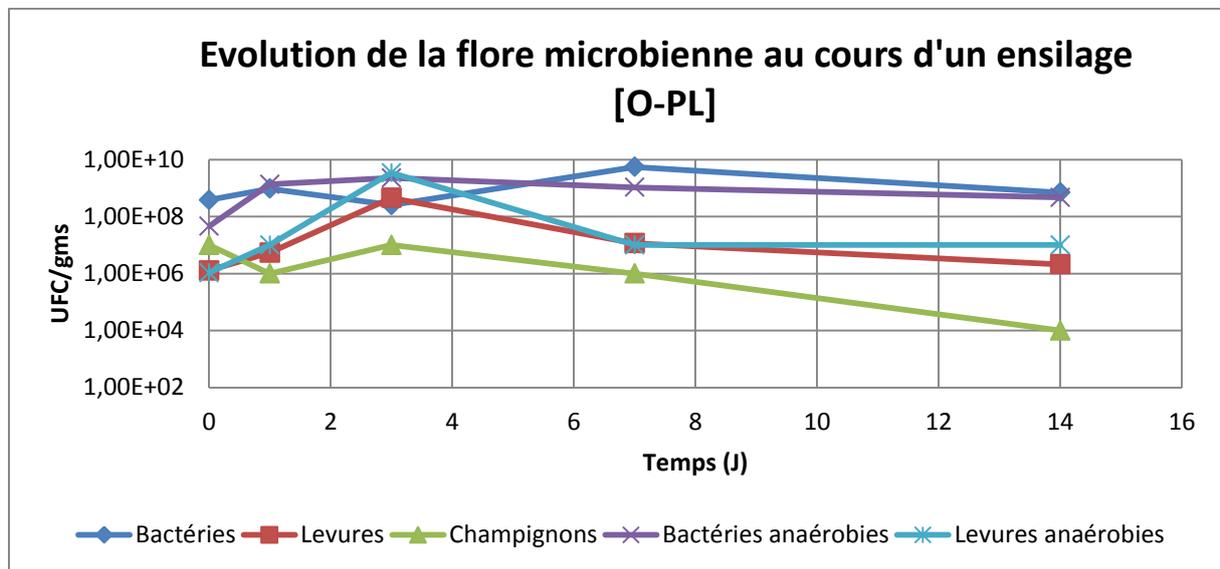


Figure 3-9 : Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-PL].

Pendant les 14 jours de fermentation, l'évolution des bactéries anaérobies n'est pas significative. A partir du 3^{ème} jour, nous observons une chute de champignons moins intéressante que celle dans le cas de l'ensilage [O-E]. Après 14 jours de fermentations, les levures reprennent leur activité du début. Même si le petit lait constitue une source de sucres assimilables par les bactéries lactiques, l'acidification n'était pas suffisante à cause du manque de bactéries lactiques.

3.3.5.3 Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-PL-F].

La figure 3-10 présente l'évolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-PL-F].

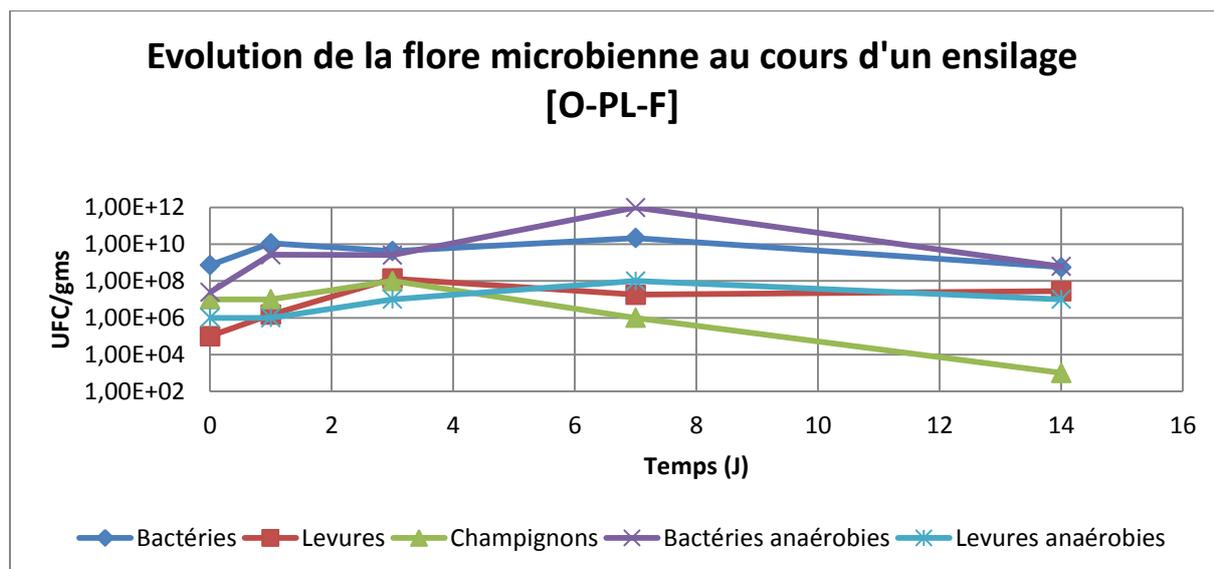


Figure 3-10 : Evolution de la flore microbienne au cours d'un ensilage [O-PL-F].

Comme dans le cas de l'ensilage [O-E], l'évolution des bactéries anaérobies atteint son maximum au bout de 7 jours puis elle a diminué. En contrepartie, les champignons ont diminué et le problème de la persistance des levures reste le même.

Le problème de ces ensilages réside dans le manque de rapidité d'installation d'acidité et de réduction du pH. C'est pour cette raison que les microorganismes indésirables, à savoir les levures et les champignons, trouvent les conditions favorables pour se multiplier. Ce manque de performance, peut être dû à un déficit de bactéries lactiques. Cela est conforme aux études faites par Weinberg et Muck (1996).

Pour pallier au déficit de ferments lactiques naturellement présents dans le substrat à ensiler, il est possible d'inoculer une quantité importante de bactéries lactiques (10^5 à 10^6 UFC / g de matière sèche). Ces ferments lactiques permettent d'augmenter le taux d'acidification et réduire le pH (Weinberg et Muck, 1996).

Cependant, ces ferments doivent être rigoureusement sélectionnés pour leur capacité à se développer rapidement dans les conditions physico-chimiques particulières de fermentation (pH, température, pression osmotique...).

3.3.6 Identification moléculaire :

Parmi les nombreuses approches moléculaires, la technique DGGE est la plus utilisée en écologie microbienne permettant l'étude de la composition ainsi que la structure des communautés microbiennes complexes. Au cours de cette étude, la PCR-DGGE, qui cible la région V3-V5 du gène de l'ADNr 16S, a été appliquée sur 15 échantillons d'ensilage. Les produits d'amplifications de 630 pb ont été visualisés sur gel d'agarose à 1,5%. La migration des produits d'amplification sur gel de polyacrylamide dénaturant montre des profils DGGE peu variables entre les échantillons avec des bandes d'intensités variables (Figure 3-11). Les bandes d'intérêt ont été coupées du gel DGGE, réamplifiées par PCR et séquencées.

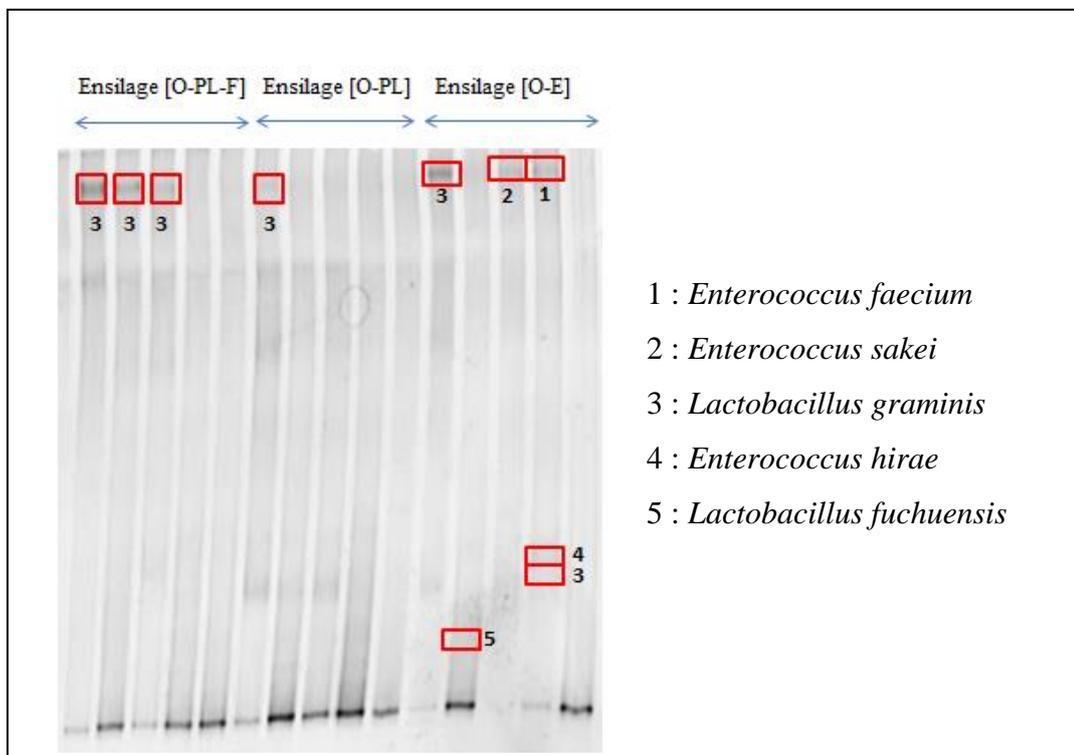


Figure 3-11 : Profil DGGE des trois types d'ensilage.

Certaines bandes intenses sont communes à plusieurs échantillons de sédiments, d'autres sont plus spécifiques. L'analyse visuelle des profils DGGE révèle des variations de migration, ce qui va nous permettre de répartir les bandes en deux niveaux de migration: des bandes de faible migration et de longue migration.

D'après les résultats obtenus, nous avons pu détecter la présence de la souche *Enterococcus graminis* dans tous les types d'ensilage. En effet, cette dernière est une bactérie spécifiques des céréales, à caractère hétérofermentaire, et qui a été isolée principalement à partir d'ensilage d'herbe (Beck et al., 1988).

A partir du profil de l'ensilage orge humidifié avec de l'eau [O-E], nous pouvons déduire qu'il s'agit de l'ensilage le plus riche en bactéries. Les profils de DGGE détectés montrent la prolifération d'autres espèces bactériennes telles que *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*.

De plus, deux bactéries lactiques, nommées « *Lactobacillus fuchuensis* » et « *Lactobacillus sakei* » ont été détectées au niveau de l'ensilage [O-E]. Ces deux souches ont été détectées à partir des produits carnés altérés préalablement conservés sous atmosphère modifiée (Audenaert et al., 2010 ; Macé et al., 2012). Aucune publication n'a reporté l'isolement de ces deux souches à partir des produits céréaliers ce qui montre l'aptitude de ces espèces lactiques à s'adapter à différents types de substrats.

Conclusion

Au cours de ce travail nous avons étudié la possibilité de conservation des déchets agro-alimentaires par ensilage. Trois types d'ensilage ont été suivi à savoir : orge seule, orge humidifiée avec du petit lait, orge humidifiée avec du petit lait additionnée de fromage.

Mais au préalable à toute étude de conservation ou de valorisation de ce substrat, il est nécessaire de caractériser les déchets reçus (l'orge, de petit lait, de coques de pois et des écarts de fromagerie) sur le plan physico-chimiques, d'identifier et de quantifier leurs microflore endogène. Cette caractérisation nous a permis de choisir les ensilages possibles à réaliser.

En premier temps, nous avons développé un système de seringues en guise de micro silos dont la capacité est de 50 ml et de 100 ml de matériel humide.

Par la suite, nous avons réalisé un suivi de pH, d'humidité, de sucres réducteurs et d'acide L-lactique des trois ensilages [O-E], [O-PL] et [O-PL-F]. Malgré sa richesse en sucres, le petit lait n'avait pas d'effet remarquable sur la qualité de l'ensilage de l'orge. Ceci peut être dû à un déficit de bactéries lactiques ou à un problème de performance de ces dernières. Les écarts de fromagerie aussi n'avaient pas d'effet positif sur la qualité de l'ensilage. Ces résultats peuvent être amélioré par inoculation des ensilages naturelles avec des ferments lactiques plus performants et par ajout de déchets riches en sucres (déchets de pommes et de pores) afin d'installer l'acidité lactique d'une façon précoce, rapide et intense.

Par ailleurs, nous avons vu l'intérêt de la technique moléculaire DGGE qui a permis d'avoir une idée sur la communauté bactérienne des différents ensilages et nous avons pu déduire que l'ensilage d'orge seul a été le plus favorable pour le développement et la prolifération des bactéries lactiques. Nous retiendrons que nous avons pu détecter, à partir de l'ensilage [O-E], deux souches lactiques qui ont comme niche écologique les produits carnés.

En conclusion, ce travail nous a permis de démontrer que l'ensilage naturel est difficile à réussir et qu'il est plus intéressant de l'inoculer par des ferments lactiques. Il reste à explorer le profil fermentaire des deux souches « *Lactobacillus fuchuensis* » et « *Lactobacillus sakei* », isolées pour la première fois des produits céréaliers.

Références bibliographiques

Ademe. *Les coproduits d'origine végétale des industries agroalimentaires*. Ademe Editions, 76 (2000).

Ademe. (2006). [http://www.ademe.fr/paca/Pdf/12-Rapport_public_Vvalorisation_coproduits_paca%2008-2006%20rapport.pdf].

Abdul-Hamid, A. & Luan, Y. S. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chemistry* 68, 15–19 (2000).

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). Bonnes pratiques de fabrication de l'ensilage pour une meilleure maîtrise des risques sanitaires. 101, 17 (2004).

Agreste primeur. Déchets des industries agroalimentaires : Une bonne gestion des déchets organiques. 245 (2010).

Alabaster, O., Tang, Z. & Shivapurkar, N. Inhibition by wheat bran cereals of the development of aberrant crypt foci and colon tumours. *Food and Chemical Toxicology*. 35, 517–522 (1997).

Alhadi Ighwela. K. Bin Ahmad, A. Abol-Munafi, A. B. Production of Cellulose from Barley Husks as a Partial Ingredient of Formulated Diet for Tilapia Fingerlings, *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, Vol 2, No.2, 19-24 (2012).

Asada, C. & Nakamura, Y. Chemical characteristics and ethanol fermentation of the cellulose component in autohydrolyzed bagasse. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10, 346–352 (2005).

Audenaert K, D'Haene K, Messens K, Ruysen T, Vandamme P, Huys G. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* ;27 (1):12-8 (2010).

Beck R., Weiss N., Winter J. *Lactobacillus graminis* sp. nov., a New Species of Facultatively Heterofermentative Lactobacilli Surviving at Low pH in Grass Silage. *Systematic and Applied Microbiology*. Volume 10, Issue 3, Pages 279–283, (1988).

De Simas, K. N. *et al.* Microstructure, nutrient composition and antioxidant capacity of king palm flour: A new potential source of dietary fibre. *Bioresource Technology* 101, 5701–5707 (2010).

Delteil L. Nutrition et alimentation des animaux d'élevage - tome 1 (édition 2012), Volume 1. *Les bases théoriques de l'alimentation*. Educagri Editions. 40, 285 (2012).

DTU (Technical University of Denmark). Danish Food Composition Databank - ed. 7.01. (2009).

Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, B., Attia, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry* 124, 411–421 (2011).

Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C. & Attia, H. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chemistry* 103, 641–650 (2007).

Fahrasmane, L. & Ganou-Parfait, B. *De la canne au rhum*. (Editions Quae).104 pages. (1997).

Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I. & Asenjo, F. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry* 91, 395–401 (2005).

Ghobrini D. Aïboud K, Kebbab K, Koumad L, et Yakoub-Bougdal S. Production de bioéthanol à partir de rebuts de dattes par fermentation en milieu solide. *Revue des Energies Renouvelables SIENR '12 Ghardaïa* 109 – 114 (2012).

Heyman M, Heuvelin E. Micro-organismes probiotiques et régulation immunologique : le paradoxe. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. Volume 20, Issue 2, Pages 85–94 (2006).

Holzer M., Mayrhuber E., Danner H., et Braun R. « The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation ». *Trends in Biotechnology* 21, n° 6 282-287 (2003).

Macéa S., Cornet J., Chevalier F., Cardinal F., Pileta M.F., Dousset X., Joffraud J.J. Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE. *Food Microbiology*, Volume 30, Issue 1, Pages 164–172 (2012).

McDonald P., Henderson A.R., Heron S.J.E. *The Biochemistry of silage*. 2nd ed., Chalcombe Publications, Marlow, England. 340 pp. (1991).

MILLER, G. L. *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959).

Martínez-Gamba R., Pradal-Roa, P., Castrejón, M., Herradora, E., Galvan, C., Mercado Persistence of *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, Aujeszky's Disease virus,

Blue Eye Disease virus in ensilages based on the solid fraction of pig faeces. *J. Appl. Microbiol.*, pp. 750–758 (2001).

Nakamura, Y. & Sawada, T. Ethanol production from artificial domestic household waste solubilized by steam explosion. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 8, 205–209 (2003).

Nangole, F., Kayongo-Male, A. Said Chemical composition, digestibility and feeding value of maize cobs. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 9, 121-130 (1983).

Niedziółka I., Szymanek M. An estimation of energy input in the process of sweet corn kernels harvesting and cutting. *TEKA Kom. Mot. Energ. Roln.*, 6, 94–101 (2006).

Nieuwenhuijzen, B. V. Culture à petite échelle de champignons -2-. Ed Agromisa Foundation. 90 pp (2007).

Obayori O.S, Adebusoye S.A, Ilori M.O, Oyetibo G.O, Omotayo A.E, Amund O.O. Effects of Corn Steep liquor on growth rate and pyrene degradation by *Pseudomonas* strains. *Curr. Microbiol.* Vol. 60, 407-411 (2010).

Perraud-Gaime, I. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse doctorale. Orstom, Montpellier (1995).

Peter H., Rayf E., Einhorn, N. Biologie végétale : La nutrition des plantes et le sol. Trad de Jules Bouharmont. Ed de Boeck Supérieur, 2000. 745, 726-748. (1999).

Petitjean, S. Utilisations des déchets en agriculture. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA* n°28, (1996).

Ramírez, G., Martínez, R., Herradora, M., Castrejón, F. & Galvan, E. Isolation of *Salmonella* spp. from liquid and solid excreta prior to and following ensilage in ten swine farms located in central Mexico. *Bioresource Technology* 96, 587–595 (2005).

Rene, S. Problèmes généraux de l'utilisation des sous-produits agro-industriels en alimentation animale dans la région méditerranéenne. *Options Méditerranéennes - Série séminaires* 16 : 75-79 (1991).

Roberge, G., Toutain, B. Cultures fourragères tropicales. Editions Quae.122-369. (1999).

Roussos S., Raimbault M., Geoffroy F., Sausedo-Castaneda G., Lonsane B.K. Potential of ensiling for efficient management of spent residue from solid state fermentation system. *Biotechnology Techniques*, 6, 87-90 (1992).

Saarisalo, E., Skyttä, E., Haikara, A., Jalava, T. & Jaakkola, S. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *J. Appl. Microbiol.* 102, 327–336 (2007).

Saddek. A, Mohamed. S, LyamineE. M, Ali. T. Etude de la Complémentation des Pailles Traitées à L'ammoniac (PNH₃) avec les pulpes de tomates en vue de réduire la dépendance alimentaire des ruminants domestiques en Algérie. *European Journal of Scientific Research* vol 22 N° 02 pp: 168-176 (2008).

Scram j.I., Hall D.O., Stuckey D.C. Bioethanol from grapes in the European community. *Biomass and Bioenergy* Volume 5, Issue 5, Pages 347–358 (1993).

Vanderhoof, JA. Probiotics: future directions 1–3. *Am J Clin Nutr* .73(2001).

Vignau-Loustau, L. & Huyghe, C. Stratégies fourragères. Ed France Agricole Editions, 2008. 289-366 (2008).

Weinberg, Z. G. & Muck, R. E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Reviews* 19, 53–68 (1996).

Annexes

Annexe A : Composition des milieux de culture.

Annexe B: Protocole de la coloration de Gram.

Annexe C: Protocole du dosage de l'acide lactique.

Annexe D: Exemple de fiche technique de la mise en œuvre d'un ensilage.

Annexe E: Composition du Kit Extraction de l'ADN

Annexe F : Protocole de la DGGE

Composition des milieux de culture

Tableau A-1 : Composition du milieu Plat Count Agar

Composition	Quantité (g / L)
Tryptone	5.0
Extrait de levure	2.5
Glucose	1.0
Agar bactériologique	12.0
Préparation : Chauffer à ébullition pour dissoudre les 17.5 g de milieu dans un litre d'eau. Puis stériliser à 121°C pendant 15 min. pH final à 25°C = 7.0 ± 0.2	

Tableau A-2: MRS Agar (Le Man, Rogosa, and Sharpe Medium) Agar

Composition	Quantité (g / L)
Peptone 1%	10.0
Extrait de viande	10.0
Extrait de levure	5.0
Glucose	20.0
Tween 80	1.0
K ₂ H ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ , 3H ₂ O	5.0
Citrate d'ammonium	2.0
MgSO ₄ , 4H ₂ O	0.05
Agar bactériologique	15.0

Préparation : Chauffer à ébullition pour dissoudre les 51 g de milieu dans un litre d'eau. Puis stériliser à 121°C pendant 15 min. pH final à 25°C = 6.2

Tableau A-3 : Milieu PDA + Chloramphenicol 5%

Composition	Quantité (g/ L)
Extrait de pomme de terre	4.0
Dextrose	20.0
Chloramphenicol 5%	0.05
Agar bactériologique	15.0
Préparation : Chauffer à ébullition pour dissoudre les 39 g de milieu dans un litre d'eau. Puis stériliser à 121°C pendant 15 min. pH final à 25°C = 3.5 ± 0.2	

Protocole de la coloration de Gram

Les différentes étapes de cette coloration :

1. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau
2. Fixation de la couleur au lugol : étalez le lugol et laissez agir le même temps que le violet de gentiane ; rincez à l'eau déminéralisée.
3. Décoloration (rapide) à l'alcool : est l'étape la plus importante de la coloration : versez goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement, et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Rincez abondamment avec de l'eau déminéralisée pour stopper la décoloration.
4. Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Mettez de l'eau distillée sur la lame et quelques gouttes de Fuchsine. Laissez agir de 30 secondes à 1 minute. Lavez doucement à l'eau déminéralisée.
5. Observez avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement $\times 1000$).

Les étapes 1 et 2 colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.

L'étape 3 (alcool) sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycanes - donc plus fine - qui va laisser passer l'alcool (molécule hydrophile) et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites « Gram positif » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une « couche » de peptidoglycanes plus importante, donc de ce fait plus épaisse. Elles resteront alors de couleur violette.

L'étape 4 est une contre-coloration ayant pour but de donner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que le violet imprégnant leur cytoplasme. La coloration de Gram permet de différencier la paroi bactérienne et de scinder les bactéries en deux grands groupes :

- Gram+ qui ont une paroi de peptidoglycane épaisse.
- Gram- qui ont une paroi de peptidoglycane fine, mais ont en plus une membrane externe lipidique.

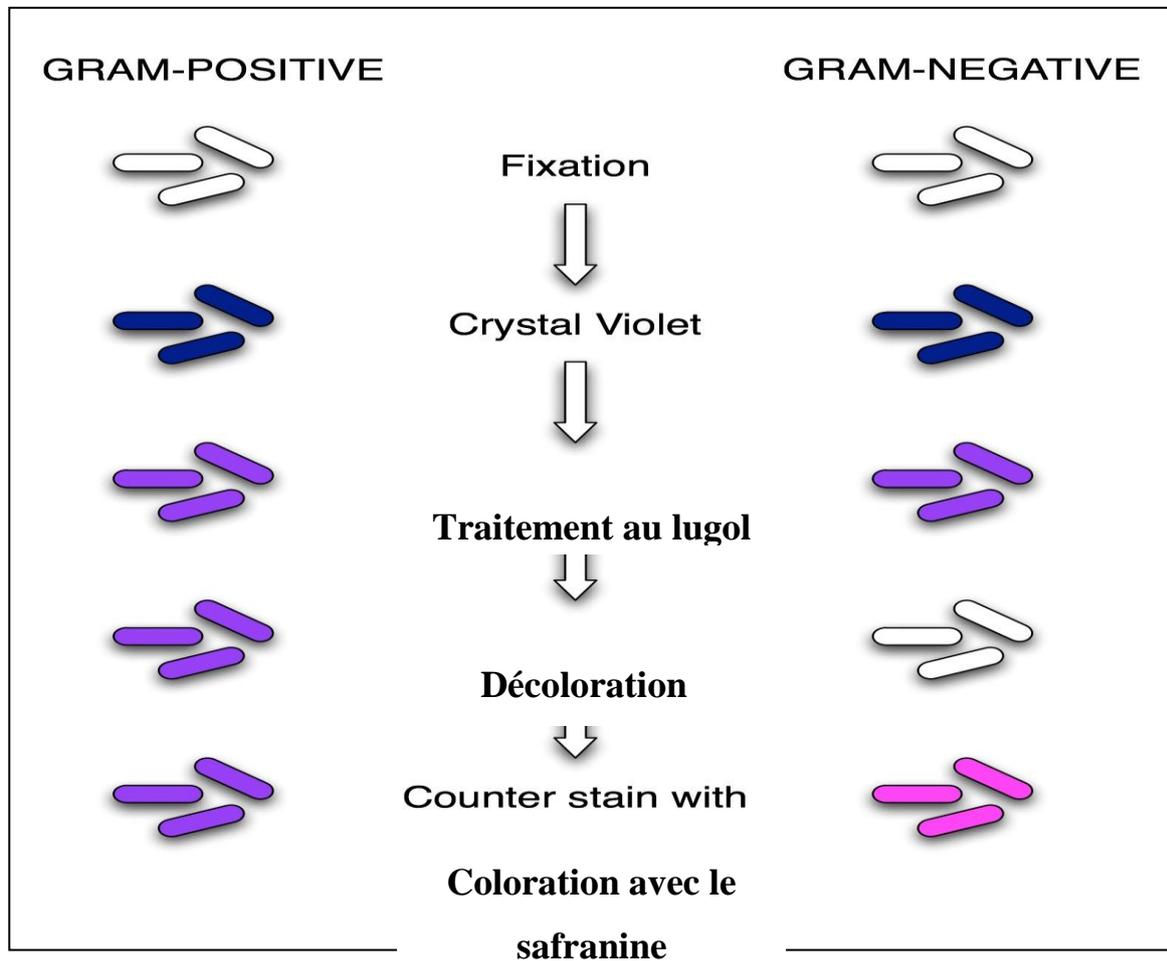


Figure B-1: Etape de coloration Gram des bactéries

Protocole du dosage de l'acide lactique

Le tableau C-1 résume la liste des solutions à rajouter et le protocole à suivre pour le dosage de l'acide lactique.

Tableau C-1: liste des solutions à rajouter et le protocole à suivre pour le dosage de l'acide lactique.

	Blanc	Echantillon
Eau distillée (mL)	1.60	1.50
Echantillon (mL)	-	0.10
Tampon (mL)	0.50	0.50
NAD ⁺ (mL)	0.10	0.10
D-GPT (mL)	0.02	0.02
Mélanger, lire les absorbances des solutions (A1) après environ 3 min et démarrer les réactions par addition de:		
D-LDH (mL)	0.02	0.02
Mélanger, lire les absorbances des solutions (A2) à la fin de la réaction (environ 5 min). Si la réaction ne s'est pas arrêtée après 5 min, continuer à lire les absorbances à des intervalles de 1 min jusqu'à ce que la absorbances soit restent les mêmes, ou augmentent constamment sur 5 min **		

Une courbe étalon d'acide lactique de 0.005 à 0.3 g.L⁻¹ a été réalisée pour chaque série de mesure afin d'exprimer les résultats en g.L⁻¹.

SAISIE DES RÉSULTATS

Date

Orge + Petit Lait

<i>N° seringue</i>	T0	T1	T2	T3	T7	T13
<i>Humidité désirée (%)</i>	65					
<i>Composition du mélange</i>	257 g d'orge + 443 mL d'eau distillée (500 g)					
<i>Masse seringue vide (g)</i>	60.53	60.58	60.02	59.86	60.63	60.14
<i>Masse seringue pleine</i>	123.65	120.58	123.64	122.15	118.91	128.59
<i>Masse seringue pleine</i>	118.25	112.03	119.12	119.1	111.92	120.6
<i>Masse substrat humide</i>	63.12	60	63.62	62.29	58.28	68.45
<i>Masse de substrat retenu</i>	57.72	51.45	59.1	59.24	51.29	60.46
<i>Volume d'eau relâché (mL)</i>	5.4	8.55	4.52	3.05	6.99	7.99
<i>Volume de compression</i>	63	60	64	63	59	68
<i>Date de mise en ensilage</i>	14/05/2013	14/05/2013	14/05/2013	14/05/2013	14/05/2013	14/05/2013
<i>Heure de mise en ensilage</i>	15h00	15h00	15h00	15h00	15h00	15h00
<i>Temps de fermentation (J)</i>	0	1	2	3	7	13
<i>Observations</i>						
<i>Masse seringue pleine</i>		111.56	115.67		117.03	

<i>Masse substrat humide</i>	57.72			50.98			55.65			56.4					
<i>Perte de poids sec</i>	0.00			2.38			6.60			-1.45					
<i>Humidité mesurée (%)</i>	51.5	50.8	53.2	52.6	52.5		52.5	51.9		56.9	53.4		54.8	56.3	
<i>Humidité moyenne</i>	51.86			52.57			52.25			55.21			55.59		
<i>pH mesuré</i>	5.34	5.08	5.1	4.73	4.66	4.7	4.05	4.02	3.98		3.98	3.97	3.84	3.76	3.77
<i>Bactéries (UFC/gms)</i>	7.29E+08			1.13E+10						4.24E+09			2.16E+10		
<i>Levures (UFC/gms)</i>	<1E+05			1.49E+06						1.36E+08			1.78E+07		
<i>Champignons (UFC/gms)</i>	<1E+07			<1E+07						<1E+08			<1E+06		
<i>Bactéries anaérobies</i>	2.42E+07			2.67E+09						2.57E+09			9.81E+11		
<i>Levures anaérobies</i>	<1E+06			<1E+06						<1E+07			<1E+08		
<i>Teneur en sucres</i>	3.72			3.64			5.42			3.99			3.11		
<i>Teneur en acide lactique</i>															

Composition du Kit pour extraction de l'ADN des plantes « ABIOpure™ »

Composé
Tampon GP1
Tampon GPX1
Tampon GP2
Tampon GP3 (isopropanol)
Tampon W1
Tampon de lavage (Ethanol)
Tampon d'éluion
RNase A (10 mg/ml)
Colonne de filtration
Colonne GD
Tube de clection de 2 ml

Etape	Protocole
Etape 1 : La lyse cellulaire	<p>-Broyer 50 mg de l'échantillon dans du nitrogène liquide jusqu'à avoir une poudre fine et transférer la dans un tube.</p> <p>-Ajouter 400 µl du tampon GP1 et 5 µl de la solution enzymatique RNase A et vortexer.</p> <p>-Incuber à 65°C durant 10 min. En ce moment, chauffer le tampon d'éluion (200 µl par échantillon) jusqu'à 65°C.</p> <p>-Ajouter 100 µl du tampon GP2 et mélanger avec le vortex.</p> <p>-Incuber dans du glaçon pendant 3 min.</p> <p>-Placer la colonne de filtration dans un tube d collection de 2 ml. Passer le mélange à travers la colonne et centrifuger pendant 1 min avec une vitesse de 1,000 × g.</p> <p>-Transférer rigoureusement le surnageant dans un tube de</p>

	microcentrifuge de 1,5 ml.
Etape 2 : La récupération de l'ADN	<ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 1,5 volume de tampon GP3 additionné de l'isopropanol au lysat et vortexer immédiatement durant 5 sec. -Placer une colonne GD dans un tube de collection de 2 ml. -Transférer 700 µl du mélange dans la colonne GD. -Centrifuger à haute vitesse pour 2 min. -Jeter le liquide contenu dans le tube de collection 2ml et introduire le mélange restant dans la colonne GD. - Centrifuger à haute vitesse pour 2 min. -Jeter le liquide et placer la colonne GD de nouveau dans le tube de collection de 2 ml.
Etape 3 : Lavage	<ul style="list-style-type: none"> -Ajouter 400 µl du tampon de lavage à la colonne GD. - Centrifuger à haute vitesse pour 30 sec. -Jeter le liquide et placer la colonne GD de nouveau dans le tube de collection de 2 ml. -Ajouter 600 µl du tampon de lavage additionné de l'éthanol - Centrifuger à haute vitesse pour 30 sec. -Jeter le liquide et placer la colonne GD de nouveau dans le tube de collection de 2 ml. -Centrifuger encore une fois pendant 3 min afin de sécher la colonne.
Etape 4 : Elution de l'acide nucléique	<ul style="list-style-type: none"> -Transférer le résidu sec de la colonne GD dans un tube propre de 1,5 ml. -Additionner 100 µl du tampon d'élution préalablement chauffé. -Laisser le temps nécessaire jusqu'à ce que le tampon sera suffisamment absorbé par la matrice. Centrifuger à haute vitesse pendant 30 sec pour éluer l'ADN purifié.

Protocole de DGGE

Le système DGGE se compose des éléments suivants:

1. Un entretoise en forme de U
2. Un peigne (20, 32 ou 48 puits)
3. 2 plaques de verre
4. 7 Vis en nylon
5. Un générateur de gradient de gel
6. Une cassette de tampon
7. Mélangeur
8. Des Fils-électriques



Figure F-1 : Une photo montrant les éléments de l'électrophorèse DGGE

1. Préparer le système TAMPON :

- Placer le système de tampon sur une surface horizontale et vérifiez l'absence de dégâts visibles.
- S'assurer que la valve inférieure sur le côté de l'appareil est fermée.
- Remplir le réservoir avec un tampon à la marque. Vous aurez besoin d'environ 17 litres.
- Brancher le système et mettre l'alimentation (interrupteur bleu).
- Fermer le couvercle pour éviter l'évaporation.

2. Assemblée de la cassette d'électrophorèse :

-Placer le devant de la cassette face sur la table avec la borne positive (rouge) à droite et la borne négative (noire) à votre gauche.

-Desserrer les vis en nylon blanc de quelques tours.

- Placer l'unité de pression en verre acrylique dans la cassette, boutons circulaires orientés vers l'intérieur.

3. Préparation de la cassette d'électrophorèse :

Req : Assurez-vous que la cassette est propre avant de commencer la préparation de la pour l'électrophorèse. Nettoyer les plaques de verre, l'entretoise en forme de U et le peigne avec un détergent et rincer à l'eau déminéralisée.

-Placer la plaque de verre avec de grandes encoches confrontée à plat sur une table propre.

-Nettoyer la surface de la plaque de verre avec de l'éthanol 96%.

-Nettoyer l'entretoise en forme de U avec de l'éthanol 96% sur les deux côtés.

- Placer l'entretoise en forme de U sur la plaque de verre. S'assurer que la bande à la base de l'entretoise est montée sur le fond de la plaque de verre et centrée.

- Les trois côtés de la pièce d'écartement en forme de U doivent entrer en contact avec la plaque de verre.

-Mettre la plaque de verre avec des petites encoches face cachée sur la table à côté de l'autre et de nettoyer la surface avec de l'éthanol 96%.

- Placer le côté propre sur l'entretoise en forme U avec des petites encoches en bas

- S'assurer que les sommets des deux plaques de verre sont nivelés.

- Introduire la plaque sandwich verre soigneusement dans la cassette d'électrophorèse.
- La plaque de verre avec de grandes encoches doit être orientée vers l'intérieur de la cassette.
- L'élément d'espacement en forme de U doit glisser sans heurts dans les fentes de chaque côté de la cassette. NE PAS FORCER! Si le sandwich ne glisse pas facilement vérifier si les vis sont assez lâche.
- La plaque sandwich en verre doit être inséré de toucher le fond de la cassette. L'entretoise en forme de U doit être tiré vers le haut aussi loin que possible sans soulever la plaque sandwich en verre. Serrer les vis un peu pour fixer la position de l'entretoise en forme de U.
- Insérer le peigne de quelques millimètres dans la plaque sandwich verre Serrer les 7 vis.
- La cassette est maintenant prête pour la coulée de gel.

4. Préparation du gel de séparation :

Pour préparer un gel de gradient dénaturant, les solutions suivantes sont nécessaires:

- Solution "A" avec une forte concentration d'urée et de formamide (60%).
- Solution "B" avec une faible concentration d'urée et de formamide (40%).

Le tableau G-1 illustre la composition de la solution de dénaturation.

Tableau F-1 : la composition de la solution de dénaturation.

	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
TAE 50x (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Acry/Bis* (ml)	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
Formamide (ml)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Urea (g)	0	4,2	8,4	12,6	16,8	21	25,2	29,4	33,6	37,8	42

distilled water

Ajuster jusqu'à 100 ml

- Préparer 24ml de solution A et la solution B dans 50 ml tubes séparés.
- Ajouter 50 μ l de PSA** à la fois dans le tube A et le tube B et mélanger.
- Ajouter 5 μ l de Temed dans les deux tubes et mélanger.

5. La coulée du gradient dénaturant:

- Fermer la vanne du mélangeur entre les deux compartiments de la machine à gradient.
- Raccorder la machine à gradient vers la pompe et connecter une aiguille à la sortie de la pompe péristaltique et l'insérer à gauche ou à droite du peigne entre les plaques de verre.
- Verser la solution B dans le compartiment de droite du mélangeur.



Figure F-2 : Une photo montrant l'ajout de la solution dénaturante dans le mélangeur.

- Laisser le gel se polymériser à 20 ° C.

6. Préparation du gel de concentration :

Le gel de concentration doit contenir :

- 4,725 ml of distilled water;
- Acrylate / acrylamide Bis*: 1,128;
- TAE*: 0.120 ml;
- 50µl de la solution PSA** ;
- 5µl de Temed.

- Pipette cette solution dans la plaque sandwich verre.

-Laisser polymériser pendant 30 minutes.

7. Exécution du gel :

-Desserrer les vis jusqu'à ce qu'elles touchent l'unité de pression acrylique.

-Retirer le peigne doucement.

-Appuyer délicatement l'entretoise en U vers le bas.

-Placer la cassette d'électrophorèse lentement dans le réservoir tampon.

-Remplissage du réservoir tampon supérieur avec du tampon en connectant le flux de tampon dans le connecteur bleu sur la cassette d'électrophorèse.

-Ouvrir la valve supérieure sur le côté.

-Brancher les câbles électriques noirs et rouges aux bornes correspondantes sur la cassette.

8. La manipulation du gel après électrophorèse:

-Après électrophorèse, couper l'alimentation électrique et débrancher les fils électriques de la cassette.

-Éteindre le système tampon et débrancher le tube.

-Faire sortir la cassette d'électrophorèse à partir de la cuve tampon et desserrer les vis. La plaque sandwich en verre peut être retirée de la cassette

-Retirer l'entretoise en forme de U. Le gel à gauche sur l'autre plaque de verre, peut maintenant être traité.

Tableau F-2 : Protocole tampon d'électrophorèse pour DGGE:

TAE 50X (1L)		Acrylamide/Bis 40% (37.5:1)	
Tris	242 g	Acrylamide	38.39 g
Acetic acid	57.1 ml	Bis- Acrylamide	1.07 g
EDTA 0.5M pH8	100 ml	Distilled water pure	Complete to 100 ml and

** Solution PSA 20% :

Dissoudre 2 g d'ammonium persulfate dans 10 ml d'eau déminéralisée.