



Faculté des Sciences et Techniques

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES

CHIMIE ET BIOCHIMIE DES PRODUITS NATURELS

Option Biotechnologie et Microbiologie

**POTENTIALITES DE VALORISATION :
ISOLEMENT, CARACTERISATION ET
IDENTIFICATION DE LA MICROFLORE DU
TOURTEAU DE KARITE D'ORIGINE SENEGALAISE**

*Présentée et soutenue le 21 Décembre 2017 par
Malick MBENGUE*

Devant le jury composé de :

Pr. Ibrahima NDOYE, FST, Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Pr. Samba Ndao SYLLA, FST, Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Dr. Saliou FALL, Maître de Recherches, ISRA Dakar

Dr. Sevastianos ROUSSOS, Directeur de Recherches, IRD-Marseille, France

Dr. Marc LABAT, Directeur de Recherches, IRD-Marseille, France

Pr. Abdoulaye SAMB, FST, Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Président

Rapporteur

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de Thèse

Année universitaire 2016-2017

Résumé

Les composés carbonés à structure aromatique sont largement représentés dans la nature. Au sein de cette vaste famille de structures plus ou moins complexes, les composés polyphénoliques jouent un rôle particulier. Certains sous-produits agricoles occasionnant de graves problèmes de pollution ou de stockage au Sénégal et dans toute la zone Soudano-Sahélienne, nous nous sommes intéressés au cours de ces travaux, aux potentialités biotechnologiques de valorisation, ainsi qu'à l'isolement, la caractérisation et à l'identification de la microflore du tourteau de karité d'origine sénégalaise. L'analyse chimique de ce sous-produit a montré la présence majoritaire d'un dérivé benzoïque généralement issu de structures tanniques : l'acide gallique qui est reconnu pour ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires.

Nos travaux ont permis l'isolement à partir d'enrichissements actifs sur tourteaux de karité de quatre souches bactériennes (Gal1, Gal2, Gal3 et Tan1) de morphologies variées et présentant des potentialités de dégradation sur les acides gallique et tannique. La caractérisation de ces souches a été réalisée. Elles présentent des physiologies différentes qui les orientent vers des espèces différentes.

L'analyse phylogénétique a permis de voir que la souche Gal1 avait comme souche la plus proche *Mobilitalea sibirica* DSM 26468T avec un pourcentage de similitude de 94,27 %. Elle a aussi montré que la souche Gal2 avait 99,47 % de similarité avec *Clostridium bifermentans* TYR6 et que Gal13 et Tan1 pourraient être des souches déjà décrites au sein du genre *Clostridium*.

La poursuite de la caractérisation de Gal2 a montré que, c'est un gros bâtonnet droit et immobile. Les cellules sont isolées ou en paire et forment une endospore réfringente à position subterminale. La souche Gal2 est mésophile et la température optimale de croissance est de 30 °C. La croissance est inhibée lorsque la concentration en sel atteint 3,5 %. Le pH optimal de croissance est de 7,7 et Gal2 croît sur une gamme de pH allant de 6,3 à 9,3. L'Hybridation ADN-ADN effectuée avec *Clostridium bifermentans* TYR6 a montré une homologie de 75,3 %.

Quant à la souche Gal1, c'est un bacille mobile, à flagellation péritriche. Les cellules sont isolées avec de fréquentes associations en paire et forment une endospore à position subterminale. Gal1 croît sur une gamme de température allant de 15 à 45 °C avec un optimum de croissance à 30 °C. La croissance est possible sur une gamme de pH allant de 6,5 à 9,3 avec un optimum observé à 7,8. La croissance est inhibée lorsque la concentration en sel atteint 3,5 %. La souche Gal1 est une bactérie anaérobie stricte capable d'utiliser le mannitol, le mannose, le cellobiose, l'arabinose, le fructose, le glucose, le sucrose, le maltose et le lactose. La teneur en (G+C) de l'ADN est de 33,8 %. Ces résultats obtenus après caractérisation morphologique, physiologique et moléculaire ont permis de proposer et de valider la souche Gal1 comme étant un nouveau genre : *Mobilisporobacter senegalensis*, gen. nov, sp. nov.

Mots clés : Tourteaux de karité, potentialités biotechnologiques, Acide gallique, taxonomie, anaérobiose, composés aromatiques, *Mobilisporobacter senegalensis* gen. nov., sp. nov.

Liste des Figures

Figure 1 : Structures de quelques dérivés benzoïques (en C6-C1) retrouvés chez les végétaux.....	7
Figure 2 : Structures de quelques dérivés cinnamiques (en C6-C3) retrouvés chez les végétaux.....	8
Figure 3 : Structures de quelques dérivés phénoliques (en C6) et phényls alcools (<i>en C6-C2</i>) retrouvés chez les végétaux.....	9
Figure 4 : Structures de quelques dérivés phénylpropioniques (en C6-C3) et phénylacétiques (en C6-C2) et d'autres types de structures monoaromatiques retrouvés chez les végétaux.	9
Figure 5 : L'arbre et les fruits de Karité (<i>Vitellaria paradoxa</i>)	10
Figure 6 : Production de tonteaux de Karité et leur déversement dans la nature	12
Figure 7 : Classification des tannins (Natrajan, 2009)	14
Figure 8 : Exemple de structures monomériques (acide gallique), dimériques (acide ellagique) et de tanins hydrolysables	16
Figure 9 : Exemple de structures polymériques de tanins hydrolysables.....	17
Figure 10 : Exemple de structures monomériques de tanin condensé (catéchine, quercétine) et d'un polymère (procyanidines).....	18
Figure 11 : Autooxydation de la catéchine.....	19
Figure 12 : Voie partielle de dégradation anaérobie du gallate et du phloroglucinol par <i>Eubacterium oxidoreducens</i> (Krumholz <i>et al.</i> , 1986).....	24
Figure 13 : Voies de dégradation anaérobie de flavonols, exemple de la quercétine.....	26
Figure 14 : Dégradation anaérobie de la quercétine par <i>Clostridium orbiscindens</i> (Winter <i>et al.</i> , 1991)	27
Figure 15 : Voies de dégradation via le benzoyl-CoA de quelques composés aromatiques (Heider <i>et al.</i> , 1997).....	39
Figure 16 : Voie métabolique de conversion du gallate en phloroglucinol et transhydroxylation du tétrahydroxybenzène (Heider et Fuchs, 1997).....	41
Figure 17 : Voie métabolique de dégradation du phloroglucinol par <i>Pelobacter</i> sp. et <i>Eubacterium oxidoreducens</i> (Heider et Fuchs, 1997a).....	42
Figure 18 : Voies métaboliques de dégradation du résorcinol	43
Figure 19 : Voie métabolique de dégradation des crésols par les bactéries anaérobies (Heider et Fluchs, 1997a).....	45
Figure 20 : Voie de dégradation du toluène par <i>T. aromatica</i> (Biegert <i>et al.</i> , 1996)	48
Figure 21 : Voie métabolique de dégradation du benzoyl-CoA (Heider et Fuchs, 1997)	51
Figure 22 : Position phylogénétique de la souche Gal1	91
Figure 23 : Position phylogénétique de la souche Gal2 parmi les membres du genre <i>Clostridium</i>	92
Figure 24 : Position phylogénétique de la souche Gal3 parmi les membres du genre <i>Clostridium</i>	93
Figure 25 : Position phylogénétique de la souche Tan1 parmi les membres du genre <i>Clostridium</i>	94

Figure 26 : Souche Gal2 observée au microscope optique.....	95
Figure 27 : Souche Gal2 observée au microscope électronique.....	95
Figure 28 : Cinétique de la croissance de la souche Gal2 en fonction de la température.....	95
Figure 29 : Cinétique de la croissance de la souche Gal2 en fonction de la concentration en sel.....	96
Figure 30 : Cinétique de la croissance de la souche Gal2 en fonction du pH.	96
Figure 31: Souche Gal1 observée au microscope optique.....	98
Figure 32 : Souche Gal2 observée au microscope électronique.....	98
Figure 33 : Cinétique de la croissance de Gal1 en fonction de la température.	99
Figure 34 : Cinétique de la croissance de la souche Gal1 en fonction de la concentration en sel.....	99
Figure 35 : Cinétique de la croissance de la souche Gal1 en fonction du pH.	100

Liste des tableaux

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques d'un tourteau de Karité	13
Tableau 2 : Répartition du gradient	55
Tableau 3 : Programme d'amplification de l'ADNr16S	69
Tableau 4 : Pourcentage des composés monoaromatiques identifiés dans les sous-produits.....	77
Tableau 5 : Enrichissement sur tourteaux de Karité.....	78
Tableau 6 : Evolution des enrichissements sur tourteau de karité au cours du temps.....	79
Tableau 7 : Comparaison de Gal2 aux souches les plus proches.	97
Tableau 8 : Comparaison des propriétés morphologiques et physiologiques de la souche Gal1 ^T avec les espèces les plus proches	101
Tableau 9 : Profil Acides Gras cellulaire de la souche Gal1 (méthode TSBA40, méthode de calcul TSBA40).	103

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
I- : <i>ORIGINE ET STRUCTURE DES COMPOSES AROMATIQUES SIMPLES</i>	5
I-1 : Dérivés de type acides benzoïques (C6-C1).....	5
I-2 : Dérivés de types cinnamiques (C6-C3).....	6
II- : <i>KARITE, TOURTEAUX DE KARITE ET TANINS</i>	10
II-1 : Le tourteau de karité	12
II-2 : Les tanins	14
II-2-1 : Définition d'un tanin	14
II-2-2 : Structure des tanins	15
II-2-2-1 : <i>Tanins hydrolysables</i>	15
II-2-2-2 : <i>Tanins condensés</i>	17
II-2-3 : Propriétés des tannantes	18
II-2-4 : Propriétés inhibitrices des tanins	19
II-2-5 : Applications	20
II-2-6 : Biodégradation des tanins	21
II-2-6-1 : <i>Biodégradation des tanins hydrolysables</i>	21
II-2-6-1-1 : <i>Biodégradation aérobie des tanins hydrolysables</i>	21
II-2-6-1-2 : <i>Biodégradation anaérobie des tanins hydrolysables</i>	22
II-2-6-2 : <i>Biodégradation des tanins condensés</i>	24
II-2-6-2-1 : <i>Biodégradation aérobie des tanins condensés</i>	24
II-2-6-2-2 : <i>Biodégradation anaérobie des tanins condensés</i>	25
III- : <i>LA BIODEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE</i>	28
III-1 : La minéralisation de la matière organique.....	29
III-1-1 : Hydrolyse des polymères biologiques	29
III-2 : Biodégradation des composés aromatiques	30
III-2-1 : Biodégradation des composés monoaromatiques en condition aérobie.....	30
III-2-2 : Biodégradation des composés monoaromatiques en condition anaérobie	31

III-2-2-1 : Dégradation complète par les bactéries anaérobies.....	31
III-2-2-1-1 : Les bactéries à respiration anaérobie.....	31
III-2-2-1-2 : Les bactéries fermentaires.....	32
III-2-2-2 : Les bactéries capables d'une transformation des composés aromatiques en anaérobiose sans ouverture du cycle aromatique.....	35
III-2-2-2-1 : Réaction d'oxydation.....	35
III-2-2-2-2 : Réaction de biotransformation réductrice.....	35
III-2-2-2-3 : Clivage des chaînes aliphatiques des acides aminés aromatiques.....	36
III-2-2-2-4 : Décarboxylation des composés aromatiques	37
III-2-2-2-5 : O-déméthylation des composés aromatiques	37
III-2-2-2-6 : Composés aromatiques utilisés comme sources de soufre et d'azote	38
III-2-3 : Biochimie des voies métaboliques de dégradation des composés aromatiques en anaérobiose.....	38
III-2-3-1 : Dégradation des composés phénoliques via le phloroglucinol et le résorcinol.....	40
III-2-3-2 : Réactions de conversion des composés polyphénoliques.....	40
III-2-3-3 : Dégradation du phloroglucinol.....	42
III-2-3-4 : Dégradation du résorcinol.....	43
III-2-4 : Réactions de conversion des composés aromatiques en un intermédiaire central, le benzoyl-CoA.....	44
III-2-4-1 : Conversion du phénol en 4-hydroxybenzoate	44
III-2-4-2 : Conversion des crésols en (méthyl) hydroxybenzoates et en benzoyl-CoA.....	44
III-2-4-4 : Conversion des aminobenzoates en benzoyl-CoA.....	47
III-2-4-5 : Conversion du toluène en benzoyl-CoA	47
III-2-4-6 : Conversion d'éthylbenzène en benzoyl CoA	49
III-2-4-7 : Conversion des xylènes et d'autres alkylbenzène en benzoyl-CoA	49
III-2-4-8 : Conversion du benzène et du naphthalène en benzoyl-CoA	49
III-2-4-9 : Dégradation des acides aminés aromatiques	50
III-2-5 : Réactions impliquées dans la désaromatisation du benzoyl-CoA et sa dégradation.....	51
III-2-5-1 : Réactions de désaromatisation du benzoyl-CoA.....	51
MATERIEL ET METHODES	53

I- : <i>PROTOCOLES ET METHODES D'ANALYSE CHIMIQUE</i>	54
II- : <i>PROTOCOLES ET METHODES D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE</i>	56
II-1 : Préparation des milieux de culture anaérobies	56
II-2 : Solutions utilisées pour la préparation des milieux de culture	57
II-2-1 : La solution d'oligo-éléments de Widdel et Pfenning	57
II-2-2 : La solution d'oligoéléments de Balch et al., 1979	57
II-2-3 : La solution de vitamines de Balch <i>et al.</i> , 1977	58
II-3 : Solutions de substrats carbonés	58
II-3-1 : Solutions mères de composés aromatiques	58
II-3-2 : Solutions mères de donneurs et d'accepteurs d'électrons	59
III- : <i>PROTOCOLE D'ENRICHISSEMENT ET D'ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES</i>	60
III-1 : Le matériel biologique	60
III-1-1 : Origine des échantillons	60
III-2 : Origine des souches	61
III-2-1 : Les souches de collection	61
III-2-2 : Conservation des souches	61
III-3 : Les techniques d'enrichissement microbiologique et aromatique	61
III-4 : Les techniques d'isolement en conditions anaérobies	62
IV- : <i>CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES</i>	63
IV-1 : Etude de la morphologie	63
IV-1-1 : Microscopie optique	63
IV-1-2 : Microscopie électronique	64
IV-2 : Etude des conditions physiologiques de croissance	64
IV-2-1 : Influence de la température	65
IV-2-2 : Influence du pH	65
IV-2-3 : Influence de la concentration en NaCl	65
IV-2-4 : Test de résistance à la chaleur	65
IV-2-5 : Tests de pureté	66
IV-3 : Etude des propriétés métaboliques	66

IV-3-1 : Les accepteurs d'électrons	66
IV-3-2 : Les donneurs d'électrons	66
IV-3-3 : Les galeries Api	67
<i>V- : CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES</i>	67
V-1 : Extraction et purification de l'ADN génomique.....	67
V-2 : Electrophorèse sur gel d'Agarose	67
V-3 : Réaction d'amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (PCR)	68
V-4 : Clonage et séquençage du fragment amplifié	69
V-5 : Séquençage de l'ADNr-16S.....	70
V-6 : Comparaison des profils de restriction RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	71
V-7 : Analyse phylogénétique.....	71
V-8 : Détermination du G + C % de l'ADN génomique.....	72
V-9 : Hybridation ADN/ADN.....	72
<i>VI- DETERMINATION DU PROFIL DES ACIDES GRAS</i>	73
<i>VII- : TECHNIQUES ANALYTIQUES</i>	73
VII-1 : Détermination de la biomasse cellulaire	73
VII-2 : Dosage des sulfures.....	73
VII-3 : Dosage des acides organiques, sucres et alcools.....	74
VII-4 : Dosage des composés aromatiques	75
RESULTATS ET DISCUSSION	76
<i>I- : ANALYSE CHIMIQUE</i>	77
<i>II- : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE</i>	78
II-1 : Résultats obtenus sur tourteaux de karité.....	78
II-1-1 : Enrichissement sur tourteaux de karité	78
ARTICLE 1	81
<i>III- : ETUDES PHYLOGENETIQUES</i>	90
III-1 : Etudes phylogénétiques	90
III-1-1 : Etudes phylogénétiques de Gall	90

III-1-2 : Etudes phylogénétiques de Gal2	91
III-1-3 : Etudes phylogénétiques de Gal3	92
III-1-4 : Etudes phylogénétiques de Tan1	93
IV- : <i>CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE GAL1 ET GAL2</i> ...	95
IV-1 : La souche Gal2.....	95
IV-1-1 : Caractères morphologiques	95
IV-1-2 Température optimale de Gal2.....	95
IV-1-3 : Influence de la concentration en sel.....	96
IV-1-4 : Effet du pH	96
IV-1-5 : Comparaison de la souche Gal2 aux espèces les plus proches	97
IV-2 : La souche Gal1	98
IV-2-1 : Caractères morphologiques	98
IV-2-2 : Température optimale de Gal1	98
IV-2-3 Influence de la concentration en Sel	99
IV-2-4 : Effet du pH	100
IV-2-5 : Utilisation des substrats	100
IV-2-6 : Comparaison de Gal1 avec les souches les plus proches.....	100
IV-2-7 : Profil des Acides Gras de la souche Gal1	102
ARTICLE 2	104
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	112
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116

INTRODUCTION GENERALE

La pollution de l'environnement par les déchets est un problème qui se pose avec de plus en plus d'acuité, aussi bien dans les pays industrialisés que dans ceux qui sont en voie de développement. Au Sénégal et dans toute la zone Soudano-Sahélienne, certains sous-produits agricoles occasionnent de graves problèmes de pollution ou de stockage. Parmi ces sous-produits, figurent les résidus de la fabrication du beurre de karité.

Le beurre de karité est extrait de la noix de *Vitellaria paradoxa* Gaertn C.F., un arbre de la famille des Sapotacées, pouvant atteindre une quinzaine de mètres de haut, qui pousse dans les savanes arborées d'Afrique. Ses fruits sont des baies charnues renfermant une noix dont la teneur en matière grasse se situe entre 43 et 55 % (Bourlet, 1950). Le beurre de karité est très apprécié en cosmétologie, pharmacologie et alimentation, ce qui lui offre de nombreux débouchés sur les marchés internationaux. Cependant, la fabrication de beurre de karité est accompagnée de la production de tourteau. Le tourteau de karité, coproduit du beurre de karité, utilisé essentiellement en cosmétologie, représente un sous-produit solide provenant des industries agroalimentaires de nombreux pays d'Afrique Occidentale, mais aussi de la filière artisanale détenue par les femmes en général. Sa richesse en lipides, notamment en acides gras insaturés, et surtout en composés phénoliques où les tanins représentent 20 %, en fait un déchet polluant de premier plan. Ce substrat bien que présentant des potentialités alimentaires et énergétiques, est systématiquement déversé dans la nature.

La biodégradation de la matière organique fait donc intervenir une grande diversité de microorganismes, aussi bien dans les biotopes naturels qu'artificiels. Dans ce contexte, les interrogations de la microbiologie s'orientent depuis deux décennies vers les voies et moyens de sélectionner des microorganismes possédant des capacités de dégradation élevées, ou des propriétés métaboliques particulières permettant de résoudre les problèmes de pollution dus à l'accumulation de molécules difficiles à dégrader.

Cette démarche revêt une importance particulière dans le traitement des résidus agro-industriels, plus particulièrement des sous-produits de l'agriculture, riches en polymères naturels (lignocellulose, tannins) et aussi en molécules aromatiques dérivées des engrais. L'absence de valorisation du tourteau de karité est liée à la méconnaissance de sa composition chimique, ainsi qu'au manque d'information sur sa dégradation par voie microbiologique.

Ce travail avait comme problématique de mettre en évidence les potentialités biotechnologiques de valorisation des tourteaux de karité d'origine sénégalaise avec

l'identification des structures aromatiques majoritairement présentes dans ce sous-produit agricole, puis par l'isolement et la caractérisation de la microflore qui s'y trouve. Les microorganismes actifs ont été particulièrement recherchés à partir des sites de stockage des tourteaux karité. N'ont été retenus que les enrichissements montrant une activité bactérienne dégradatrice importante sur des structures aromatiques modèles, identifiées préalablement dans les tourteaux de karité.

Dans la première partie de ce travail, sont présentés les résultats sur l'identification et la quantification des principales molécules aromatiques présentes dans ce sous-produit d'origine tropicale, ainsi que leurs potentialités d'utilisation.

La deuxième partie de ce travail rapporte l'obtention d'enrichissements actifs, puis l'isolement, l'identification, la caractérisation de bactéries ayant une activité de dégradation sur ces molécules, avec la description d'un nouveau genre.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I- : ORIGINE ET STRUCTURE DES COMPOSES AROMATIQUES SIMPLES

Les tissus végétaux contiennent un grand nombre de substances à fonction phénolique. La plupart des composés phénoliques ne sont pas présents à l'état libre chez les végétaux, mais sous forme d'esters ou sous forme d'hétérosides. En revanche certains composés phénoliques simples se retrouvent également à l'état libre dans les végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968a). Parmi ces composés aromatiques, les plus fréquents chez les végétaux sont des composés dérivés des acides benzoïques et des acides cinnamiques. Ils sont classifiés dans ce travail comme suit :

- C6-C1 : acide benzoïque et leurs dérivés plus ou moins substitués sur le cycle benzénique (C6)
- C6-C3 : acide cinnamique et leurs dérivés plus ou moins substitués sur le cycle benzénique (C6)

I-1 : Dérivés de type acides benzoïques (C6-C1)

Les acides benzoïques suivants : *p*-hydroxybenzoate, protocatéchuate (3,4-dihydroxybenzoate), vanillate (4-hydroxy-3-méthoxybenzoate), gallate (3,4,5-trihydroxybenzoate), syringate (4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoate) (Figure 1), salicylate (*o*-hydroxybenzoate) et gentisate (2,5-dihydroxybenzoate) sont largement répandus chez les angiospermes et chez les gymnospermes et leur répartition dans les végétaux a été étudiée par plusieurs auteurs. Les acides *p*-hydroxybenzoïque, vanillique et syringique sont des constituants de la lignine dont ils peuvent être libérés par hydrolyse alcaline. Ainsi les plantes qui ne possèdent pas de lignine ne contiennent généralement pas ces trois acides (Ribéreau-Gayon, 1968a ; Macheix *et al.*, 2005).

Par rapport aux autres acides benzoïques, les acides protocatéchuique et gallique ont probablement une origine et des fonctions différentes dans les plantes. Le gallate se trouve rarement à l'état monomérique mais le plus souvent sous forme de son dimère, l'acide ellagique. Cet acide se rencontre dans les feuilles de plusieurs dicotylédones et il est absent chez les monocotylédones, les gymnospermes et les fougères. Les acides ellagique et gallique sont rencontrés dans la structure des tanins hydrolysables et peuvent être libérés par une hydrolyse acide (Scalbert, 1991).

Il existe d'autres acides, de structure voisine à ceux cités précédemment, mais qui ne sont pas des corps à fonction phénol, que l'on peut trouver occasionnellement, dont le *p*-anisate (*p*-méthoxybenzoate), le vétrate (3,4-diméthoxybenzoate) et le 3,4,5-triméthoxybenzoate (Figure 1).

I-2 : Dérivés de types cinnamiques (C6-C3)

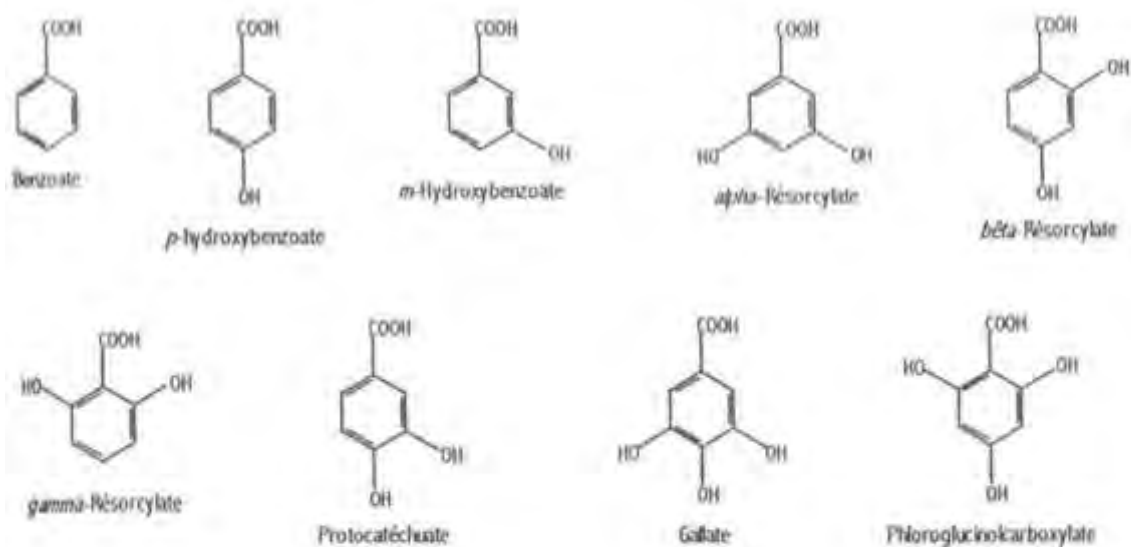
Ces acides, possédant une double liaison, peuvent exister sous deux formes isomères : acide *cis*-cinnamique et l'acide *trans*-cinnamique. Seules les formes *cis* sont capables de se cycliser pour former des coumarines. Les acides cinnamiques naturels sont les isomères *trans* qui sont les plus stables. Cependant, chacun des deux isomères peut se transformer facilement en l'autre isomère, sous l'influence de la lumière, jusqu'à l'obtention d'un équilibre (Ribéreau-Gayon, 1968a).

Les acides *p*-coumarique (4-hydroxycinnamate), caféique (3,4-dihydroxycinnamate), férulique (4-hydroxy-3-méthoxy-cinnamate) et sinapique (4-hydroxy-3,5-diméthoxycinnamate) (Figure 2), sont très répandus dans les végétaux. On rencontre au moins un d'entre eux dans pratiquement tous les végétaux supérieurs. L'acide *p*-coumarique est le composé phénolique le plus fréquemment rencontré. Ces composés sont le plus souvent associés à des sucres dans les tissus végétaux.

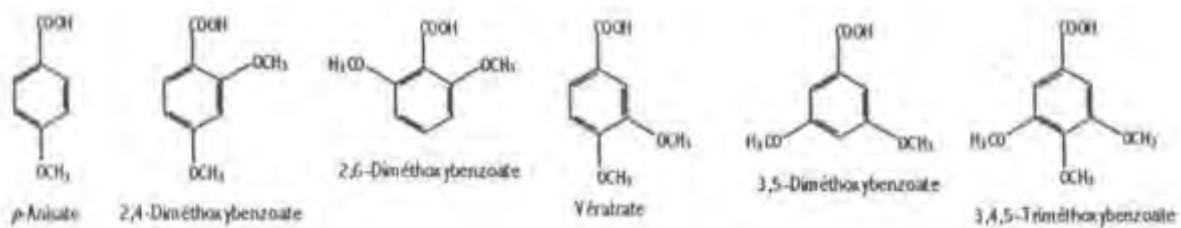
Parmi les dérivés des acides cinnamiques, l'acide caféique (non méthoxylé) est très répandu, mais plus particulièrement chez les espèces ligneuses ; en revanche les acides cinnamiques méthoxylés sont plus fréquents chez les espèces herbacées.

La présence de l'acide cinnamique proprement dit, à savoir sous sa forme non substitué a été signalée. Parmi les dérivés monosubstitués par une fonction hydroxyle, l'acide *o*-coumarique (Figure 2) est moins répandu dans la nature. Cet acide possédant un groupement OH en *ortho* de la chaîne carbonée, se cyclise facilement, pour donner la coumarine qui est en revanche un constituant odorant fréquent chez les végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968a).

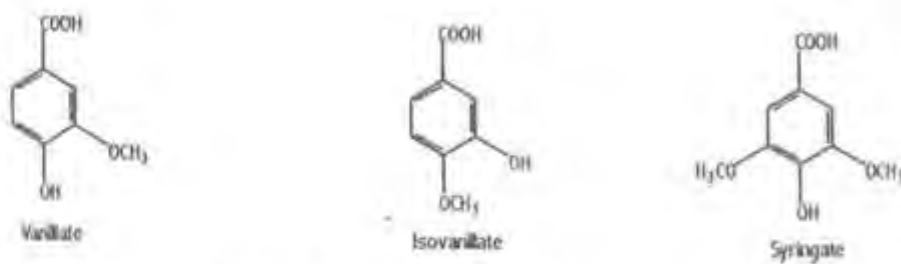
La structure chimique de quelques phénols non-acides et autres composés monoaromatiques dont une majorité a été étudiée dans ce travail est représentée dans les figures 3 et 4.



Acide benzoïque et dérivés hydroxylés



Dérivés benzoïques méthoxylés



Dérivés benzoïques hydroxylés/méthoxylés

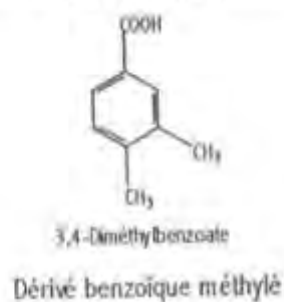
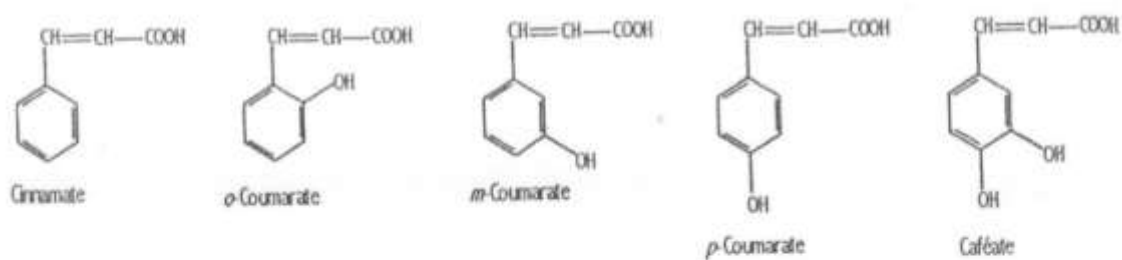
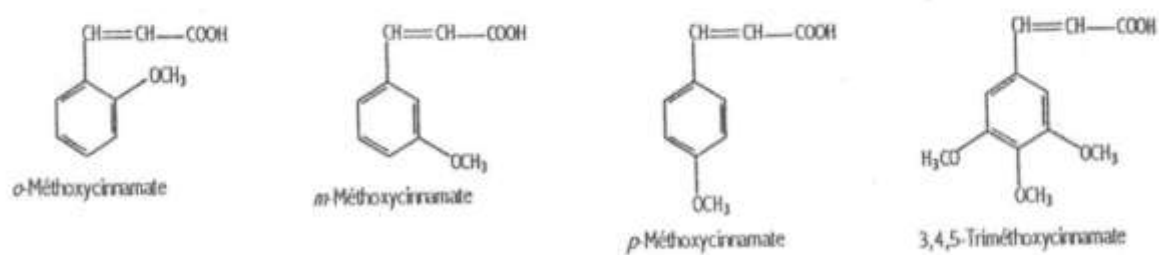


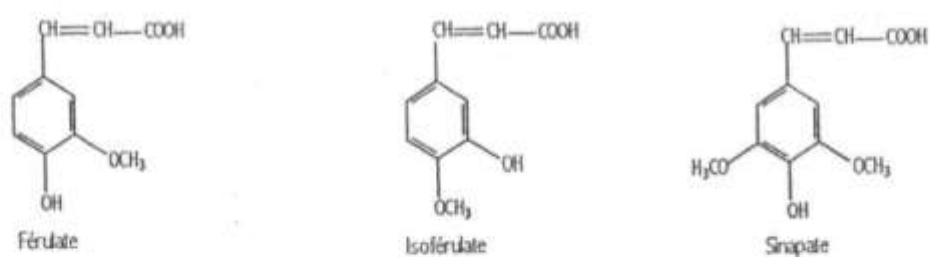
Figure 1 : Structures de quelques dérivés benzoïques (en C6-C1) retrouvés chez les végétaux



Acide cinnamique et dérivés hydroxylés



Dérivés cinnamiques méthoxylés



Dérivés cinnamiques hydroxylés/méthoxylés

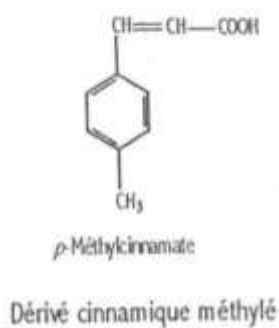


Figure 2 : Structures de quelques dérivés cinnamiques (en C6-C3) retrouvés chez les végétaux

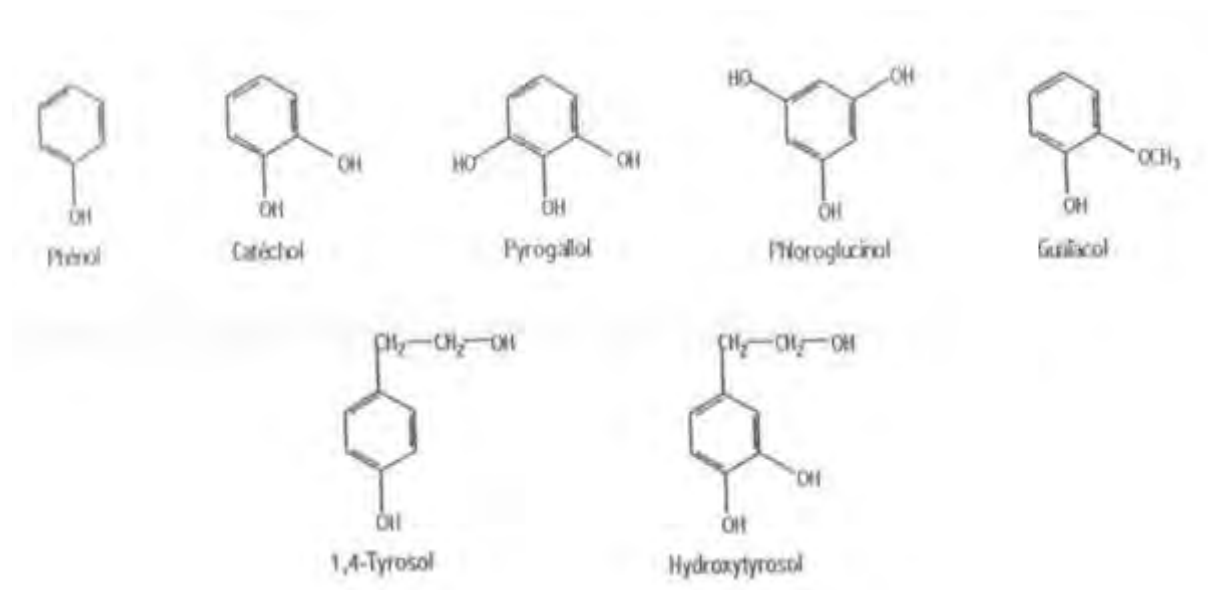


Figure 3 : Structures de quelques dérivés phénoliques (en C6) et phénols alcools (*en C6-C2*) retrouvés chez les végétaux

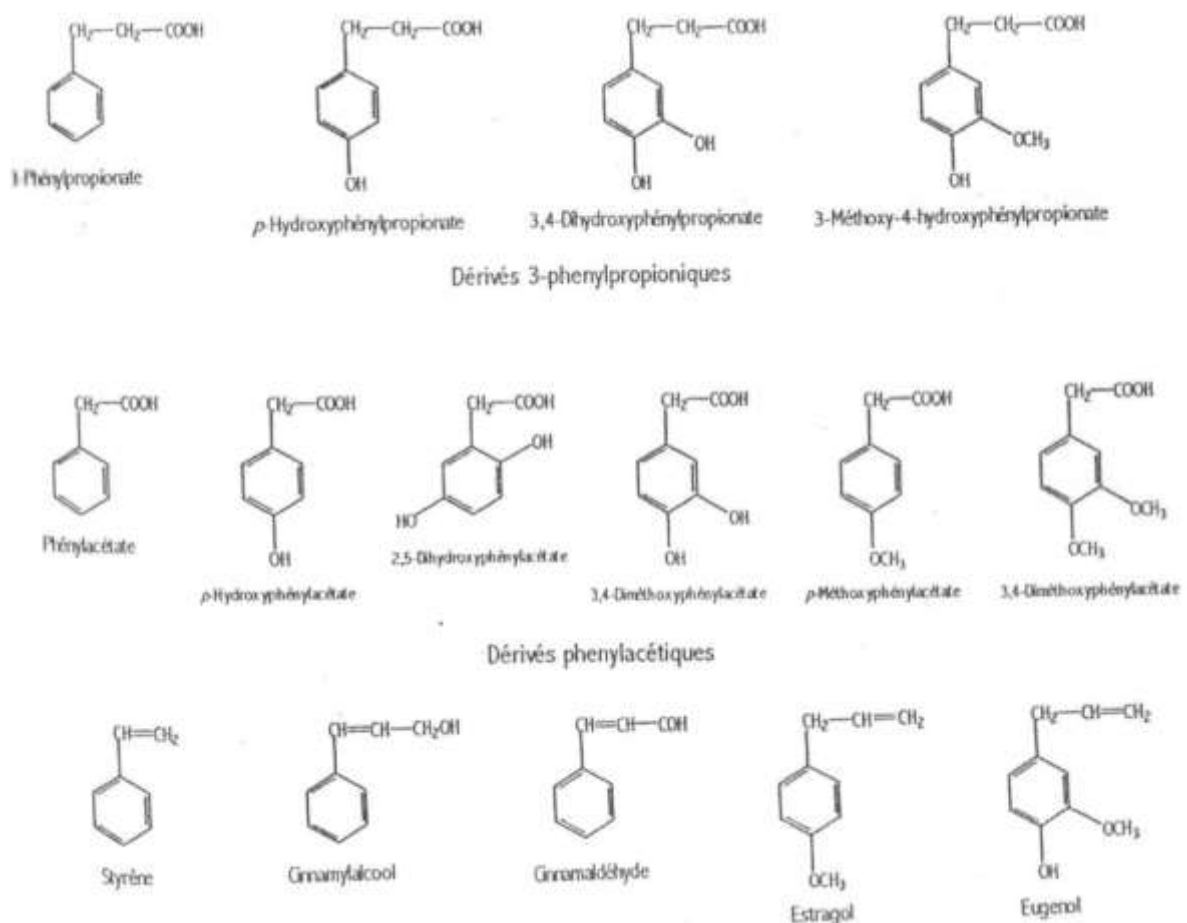


Figure 4 : Structures de quelques dérivés phénylpropioniques (en C6-C3) et phénylacétiques (en C6-C2) et d'autres types de structures monoaromatiques retrouvés chez les végétaux.

II- : KARITE, TOURTEAUX DE KARITE ET TANINS



Figure 5 : L'arbre et les fruits de Karité (*Vitellaria paradoxa*)

Précédemment connu sous le nom de *Butyrospermum paradoxum* subsp. *parkii*, le Karité, *Vitellaria paradoxa* est un arbre de la famille des sapotacées (Lamien *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2014). De manière spontanée, il pousse exclusivement sur plus d'un million de km² de savanes africaines, plus précisément dans la région sahélo-soudanienne et soudano-guinéenne sur les sols silico-argileux. Cet arbre trapu (son tronc droit mesure 1 m de diamètre) peut atteindre jusqu'à 20 m de hauteur. Il peut vivre jusqu'à 150 ans. L'arbre de karité est exploité pour ses ressources, mais plus particulièrement pour l'amande de son fruit qui est une source de revenus appréciables pour les femmes rurales. De cette amande est extrait le beurre de karité, bien prisé à cause de ses multiples propriétés naturelles. Le beurre de karité est largement utilisé en cosmétiques (Glew and Lovett, 2014), la fabrication de détergents (Rousseau *et al.*, 2015) et dans les industries pharmaceutiques (Akihisa *et al.*, 2010).

Il a été estimé que 60.000 tonnes d'amandes sont consommées chaque année, générant environ 30,3 millions kg de tourteau de karité par an (Danikuu *et al.*, 2015). Le tourteau de karité, co-produit du beurre de karité, utilisé essentiellement en cosmétologie, représente un sous-produit solide provenant des industries agroalimentaires de nombreux pays d'Afrique Occidentale, mais aussi de la filière artisanale détenue par les femmes en général. Il existe cinq étapes essentielles pour fabriquer le beurre de karité à partir de l'amande (Anonyme, 1988):

- le nettoyage des amandes pour éliminer tous les corps étrangers durs.
- Le broyage des amandes pour permettre une bonne cuisson.

- Le pressage qui permet la séparation entre la phase liquide et la phase solide.
- Le tamisage et la filtration : la phase liquide obtenue après pressage est tamisée, puis filtrée. L'huile brute ainsi obtenue est conditionnée. Les tourteaux restants sont rejetés.

En Afrique, le beurre de karité est utilisé depuis des siècles dans l'alimentation des populations. Corps gras, il entre dans la composition de plusieurs plats africains. Au Mali, au Burkina Faso, le karité est la principale source de graisses alimentaires pour les populations rurales. Il est utilisé dans la préparation de toutes les sauces de la cuisine locale ainsi que dans les fritures.

En cosmétologie, le karité est utilisé pour les soins des cheveux, c'est un produit idéal pour les soins capillaires des cheveux cassants, secs, abîmés, fragiles et teigneux. Pour les soins du visage, le karité protège, hydrate, ajoute de l'élasticité, diminue les effets de vieillissement et apaise la peau irritée. Pour les lèvres, il hydrate et protège surtout en période de grand froid. On l'utilise aussi comme baume ou brillant à lèvres. Pour les soins de la peau, le karité adoucit, hydrate, nettoie, protège et relaxe la peau. Il est remarquable dans les crèmes anti-vergetures et post-épilatoires ainsi que dans les lotions solaires, les produits de massage et les savons et sert aussi d'excipients de suppositoires.

En pharmacopée, le karité cicatrise la peau dans le traitement des brûlures, des eczémas et des zonas. Il dégage les voies nasales lors d'allergie au rhume. Il entretient les muscles avant et après les activités sportives. Le karité s'applique comme produit de massage en cas de luxation ou entorse et contribue à la guérison des furoncles.

Dans l'agroalimentaire, le beurre de karité doit sa renommée à ses caractéristiques physico-chimiques (composition et point de fusion). Le beurre de karité constitue un équivalent du beurre de cacao, ce qui lui permet d'entrer dans la composition du chocolat, de la confiserie, de la pâtisserie et des margarines végétales (De Muelenaere, 1997 ; Moore, 2008).

La législation internationale vient de permettre récemment à l'industrie chocolatière d'ajouter 5 % de beurre de karité comme matière grasse d'origine végétale autre que le cacao pour l'élaboration du chocolat. Cette législation amplifie les demandes annuelles en beurre de karité et donc également les rejets de tourteaux de karité dans l'environnement. En fait ce co-

produit n'est actuellement pas du tout valorisé que ce soit sur sa zone de production ou de transformation.

II-1 : Le tourteau de karité



Figure 6 : Production de touteaux de Karité et leur déversement dans la nature

Ce substrat bien que présentant des potentialités alimentaires et énergétiques est systématiquement déversé dans la nature. Sa richesse en lipides (notamment des acides gras insaturés) et surtout en composés phénoliques (tanins) en fait un déchet polluant de premier plan (Ouattara, 1994). La biodégradabilité des tourteaux de karité dépend en premier lieu de leur composition chimique (Colin et Munk-Koefoed, 1988). Peu de travaux ont quantifié cette composition. Les paramètres physico-chimiques d'un tourteau de karité, présentées en pourcentage sont reprises dans le tableau 1 suivant. (Ouattara, 1994)

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques d'un tourteau de Karité

Paramètres	Valeurs
pH	5,24
Matières sèches	96,89 %
Solides volatils	77,34 %
Cendres	8,77 %
Matières organiques	92,01 %
Carbone	53,37 %
Azote	2,27 %
Protéines	14,22 %
Sucres	24,56 %
Lipides	22,55 %
Fibres brutes	4,7 %
Tanins hydrolysables	20,03 %
Phosphore	1,72 %
Soufre	0,84 %
Sodium	0,33 %
Potassium	1,63 %
DBO/DCO	> 0,6

Des analyses physico-chimiques effectuées sur le tourteau de karité ont permis de mettre en évidence son utilité sur le plan alimentaire (Ouattara, 1994). Sa richesse en protéines (14,22 %) et en glucides (24,56 %) montre que ce sous-produit peut être valorisé pour l'alimentation du bétail ; mais il faudrait pour cela réduire le taux de tanins. Les composés phénoliques et les potentialités anti-méthanogéniques des tourteaux de karité ne sont pas encore entièrement explorés. Cependant, le tourteau de karité est potentiellement utilisable comme ingrédient dans l'alimentation du bétail, non seulement par sa richesse en énergie et en protéine, mais aussi par sa capacité à supprimer les méthanogènes entériques (Konlan, 2010 ; Bhatta *et al.*, 2012).

Selon la définition de Finck et Goma (1978), tout déchet organique est biodégradable quand il possède un rapport DBO/DCO > 0,6. Des essais de biodégradation anaérobie ont permis de montrer que le tourteau de karité, après de fortes dilutions et

solubilisation, peut être épuré tout en produisant des acides organiques et de l'énergie (méthane). L'apport d'un inoculum exogène d'abattoir municipal et son acclimatation ont permis d'accroître les taux d'épuration par rapport aux résultats obtenus avec l'inoculum endogène (Ouattara, 1994).

II-2 : Les tanins

II-2-1 : Définition d'un tanin

Il n'est pas facile de donner une définition unique pour les tanins, car cette expression englobe un ensemble de corps à fonction phénols qui sont reliés entre eux, non pas par une analogie de structure, mais par un ensemble de propriétés communes. Etymologiquement, les tanins représentent des composés utilisés en tannerie qui ont la propriété de transformer des peaux animales fraîches en cuir imputrescible et peu perméable (Ribéreau-Gayon, 1968b). Cependant, comme le font remarquer Swain et Bate-Smith (1962), le mot tanin est également largement utilisé en chimie végétale pour désigner un grand nombre de substances répandues dans les plantes, dont les propriétés sont voisines de celles des produits industriels, mais dont les aptitudes au tannage des peaux n'ont pas été vérifiées. Ces auteurs définissent les tanins comme étant des composés phénoliques ayant des poids moléculaires compris entre 500 et 3.000 Da et qui sont capables de se combiner aux protéines ou à d'autres polymères végétaux comme la cellulose ou la pectine (Metche et Girardin, 1980).

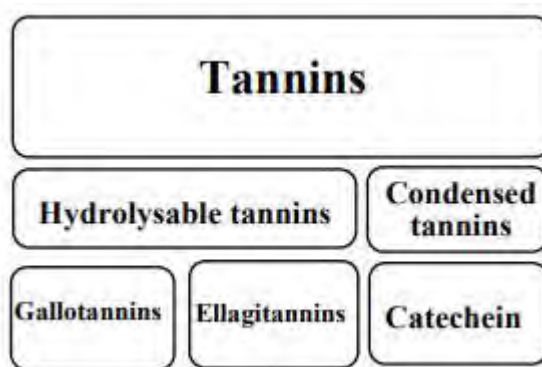


Figure 7 : Classification des tannins (Natrajan, 2009)

II-2-2 : Structure des tanins

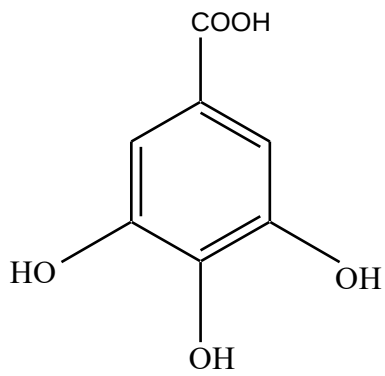
La structure biochimique des divers tanins est encore assez mal connue malgré le développement de travaux analytiques dont une synthèse a été publiée par Haslam (1979). Ainsi on se réfère couramment à une distinction entre tanins hydrolysables et tanins condensés, ce qui correspond à des types structuraux bien différenciés (Gupta et Haslam, 1980 ; Zhao et Hagerman, 1995). On distingue habituellement, chez les végétaux supérieurs, deux groupes de tanins différents par leur structure : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bruneton, 1999).

II-2-2-1 : Tanins hydrolysables

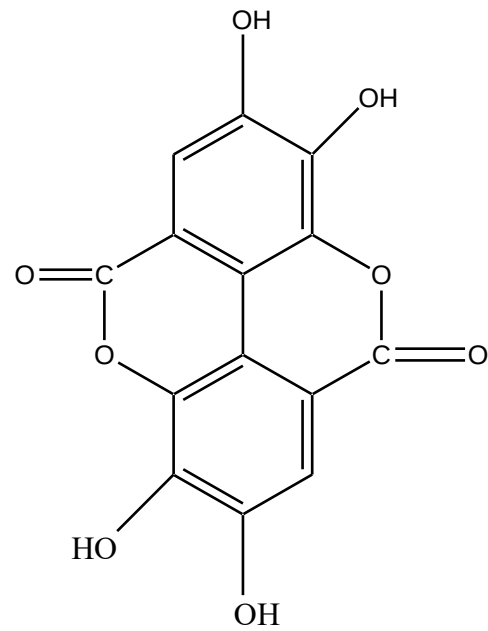
Les tanins hydrolysables sont des molécules complexes qui font intervenir des liaisons de type ester et donnent, par hydrolyse, une fraction glucidique et une fraction phénolique constituée elle-même, soit de l'acide gallique dans le cas de gallotanins, soit de l'acide ellagique (Figure 8), dimère du précédent, dans le cas des ellagitanins (Vivas et al., 1995). Ils existent aussi sous forme de polyesters d'acide gallique (Field *et al.*, 1989) (Figure 9). On les trouve dans les noix et les framboises, ils sont très répandus dans les plantes comestibles (Mueller et Harvey, 2006).

Le tanin hydrolysable commercialement le plus répandu est l'acide tannique, extrait de la noix des galls de *Rhus semialata* et de *Quercus infectoria*. Il contient 21 % d'acide gallique, 7 % d'acide digallique, 3 % de pentagalloyglucose, 1 % d'acide trigallique ; le constituant principal, qui représente environ 70 % de l'ensemble, est le gallotanin proprement dit. Sa structure n'a pas été élucidée ; selon les auteurs, il contiendrait de 4 à 5 ou de 8 à 10 molécules d'acide gallique pour une molécule de glucose (Deschamps, 1985).

Parmi les ellagitanins, on peut surtout citer le tanin de châtaignier (*Castania sativa*) provenant d'extraits d'écorce d'aubier. Le tanin de myrobolan (*Terminalia chebula*) est également l'un des plus connus de ce type (Deschamps, 1985).

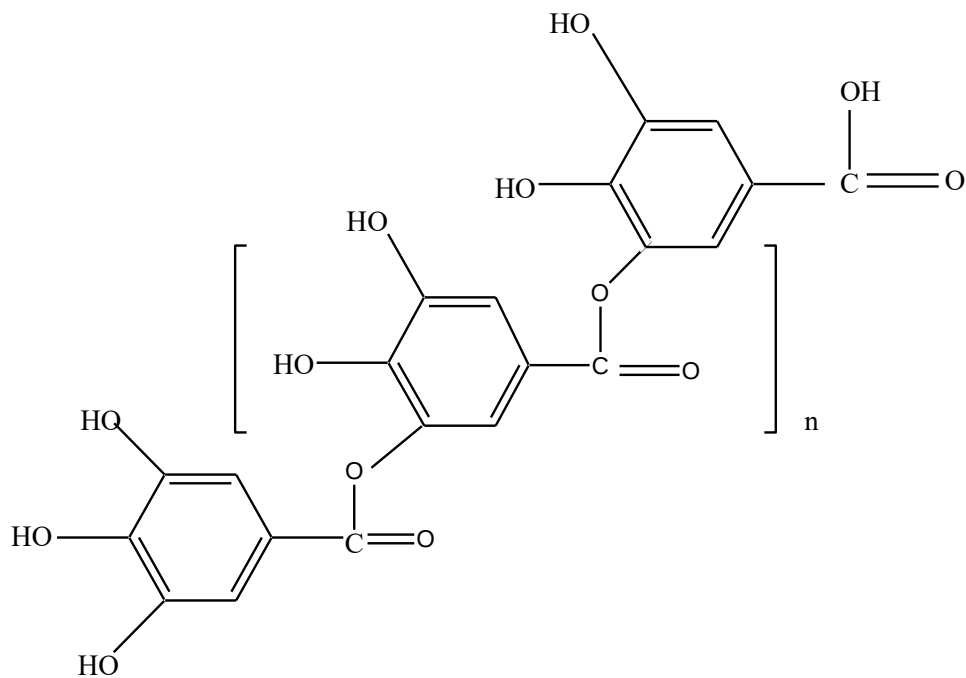


Acide gallique

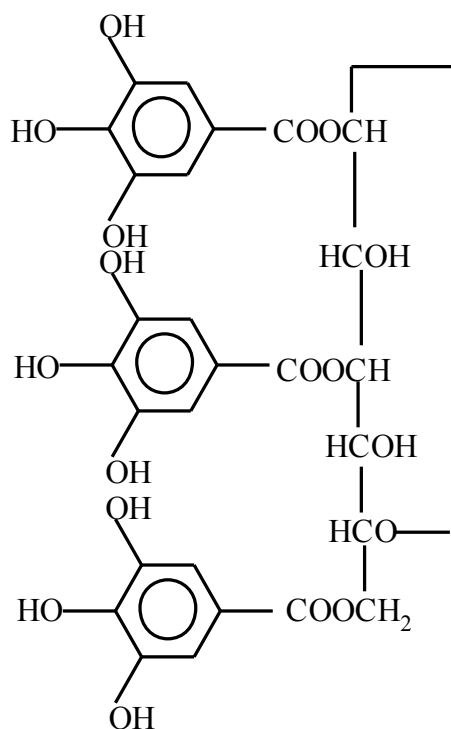


Acide ellagique

Figure 8 : Exemple de structures monomériques (acide gallique), dimériques (acide ellagique) et de tanins hydrolysables



Gallotanin



Corilagine

Figure 9 : Exemple de structures polymériques de tanins hydrolysables

II-2-2-2 : Tanins condensés

Bien que les tanins condensés soient certainement dans les végétaux en quantité plus importante que les tanins hydrolysables, leur connaissance est beaucoup moins avancée. De nombreux éléments de leur structure restent encore à élucider. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre (Boudjouref, 2011). Cependant il semble définitivement démontré que ces tanins condensés sont constitués par la polymérisation de molécules élémentaires qui possèdent la structure générale de flavonoïdes et dont les plus importantes sont les flavanols-3 (ou catéchines) (Figure 10) et les flavanediols-3,4 (ou leucoanthocyanidines) (Hillis, 1985). La copolymérisation des catéchines et des leucoanthocyanidines est également possible ; elle conduit à des biflavanes.

Les propriétés des tanins condensés dépendent de la nature des molécules élémentaires intervenant dans leur composition, du mode d'enchaînement de ces molécules élémentaires et également pour une part importante, de la dimension globale de la molécule de tanin.

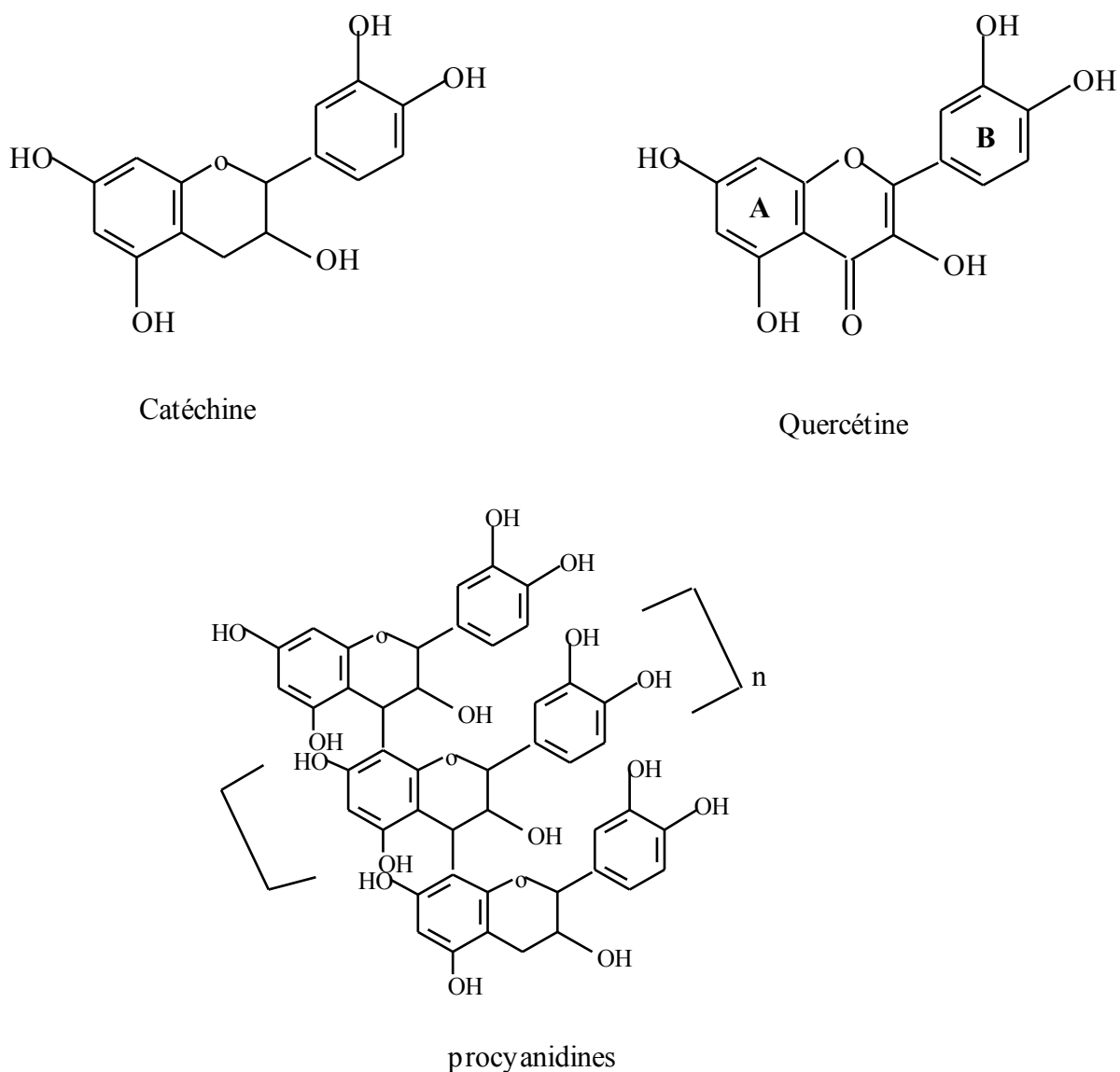


Figure 10 : Exemple de structures monomériques de tanin condensé (catéchine, quercétine) et d'un polymère (procyanidines)

II-2-3 : Propriétés des tannantes

Les principales propriétés de tanins sont liées à leur aptitude à se combiner aux protéines et à d'autres polymères tels que la cellulose et les pectines (Haslam, 1974) ; Spencer *et al.*, 1988 ; Takechi *et al.*, 1985). Cette propriété est également valable pour les autres caractéristiques des tanins, par exemple l'inhibition des enzymes, suite à la combinaison de leur fraction protéique (Scalbert, 1991). L'astringence des produits végétaux est également

due à une précipitation des protéines et des glucoprotéines de la salive (Ozawa *et al.*, 1987 ; Porter et Woodruffe, 1984).

La formation des combinaisons est due à l'établissement de trois types de liaisons (Cheynier *et al.*, 1996 ; Kawamoto *et al.*, 1996 ; Siebert *et al.*, 1996) :

- Liaisons hydrogènes entre les groupements phénoliques des tanins et différents groupes récepteurs (-NH-, -CO-, -OH) des protéines ou d'autres polymères.
- Liaisons ioniques entre des groupements anioniques, constitués par certains cycles benzéniques des tanins, et des groupes cationiques des protéines.
- Liaisons de covalence, provenant de la réaction de fonctions quinones, qui peuvent exister dans la structure des tanins ou apparaître lors de leur oxydation (Figure 11), sur certains groupes actifs des protéines ou d'autres polymères. Les liaisons de ce troisième groupe sont importantes, car ce sont elles qui donnent à la combinaison tanin-protéine (ou tanin-polymère) sa stabilité.

Les tanins ont également des propriétés antioxydantes (Hagerman *et al.*, 2000), anti caries (Mitsunaga, 2000), anti-VIH (Sakagamia *et al.*, 2000) et anti-cancérigènes (Yang *et al.*, 2000).

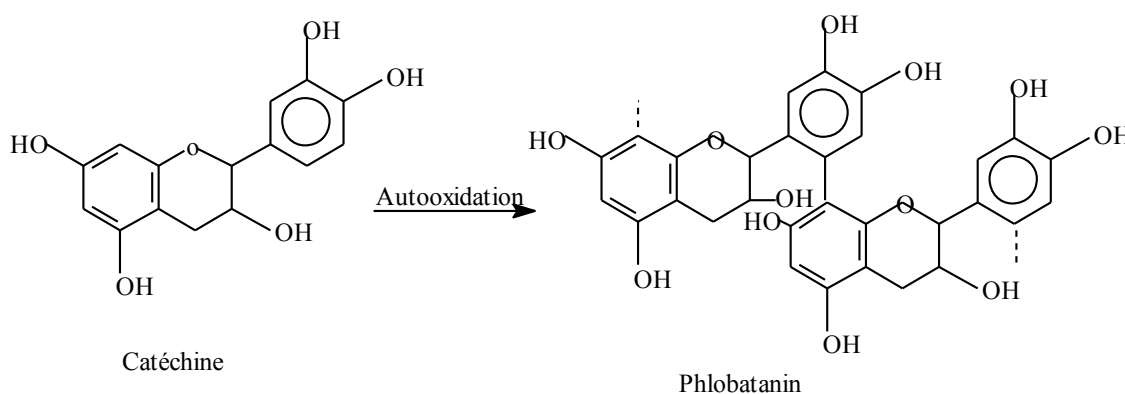


Figure 11 : Autooxydation de la catéchine

II-2-4 : Propriétés inhibitrices des tanins

Les tanins sont connus depuis longtemps pour leurs actions inhibitrices sur la respiration, le métabolisme et la croissance des microorganismes.

Ainsi les tanins de châtaignier et de mimosa inhibent fortement la respiration chez des espèces bactériennes comme *Azotobacter* spp. et *Escherichia coli* (Basaraba, 1966). Les tanins ont également un effet inhibiteur important sur la nitrification dans les sols (Basaraba, 1964), sur les bactéries sulfato-réductrices comme *Desulfovibrio desulfuricans* (Booth, 1960) et sur les bactéries fixatrices d'azote (Basaraba, 1966, Rice et Pancholy, 1973). La présence de concentrations élevées de tanins (1 à 2 %) réduit généralement la décomposition des matières organiques présentes dans les sols (Field et Lettinga, 1992).

De nombreuses espèces bactériennes sont incapables de croître en présence de faibles concentrations d'acide tannique, comme *Clostridium cellulosolvens*, *Cellvibrio fulvus*, *Bacillus subtilis* et *Sporocytophaga myxococcoides*, qui sont respectivement inhibées par des concentrations de 10, 12, 30, et 45 mg/l (Nelson et al., 1995). Ces effets ne se limitent pas seulement aux bactéries ; une inhibition de la croissance ou de la germination des spores a été mise en évidence chez des champignons communs rencontrés sur les végétaux en décomposition comme des *Fusarium*, *Verticillium*, *Aspergillus* et *Alternaria* (Lewis et Papavizas, 1967 ; Mahadevan et Muthukumar, 1980).

En présence de tanin, une modification de la morphologie cellulaire peut être observée. Le tanin condensé par exemple, modifie la morphologie de certaines bactéries anaérobies du rumen comme *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Streptococcus bovis* (Jones et al., 1994).

D'une façon générale, l'effet inhibiteur est plus important avec des tanins condensés qu'avec des tanins hydrolysables et avec des tanins fortement polymérisés plutôt qu'avec des oligomères. Ainsi, d'autres polyphénols ou phénols simples, constituants de nombreux végétaux, sont également inhibiteurs comme les anthocyanes, les flavonoïdes, le catéchol, les phytoalexines, etc. (Mahadevan, 1974 ; Pratt et al., 1960). Même les acides gallique et quinique qui constituent les tanins hydrolysables ou condensés, possèdent une activité antimicrobienne (Davidson et Branden, 1981).

II-2-5 : Applications

Du point de vue industriel, et en dehors de la tannerie, les tanins sont utilisés à plusieurs fins qui ne font pas toujours intervenir leur propriété à se combiner aux protéines. On peut citer par exemple, la protection des filets de pêche ou le contrôle de la viscosité des

boues utilisées dans le forage des puits de pétrole. Les tanins peuvent être utilisés comme adhésifs et plus particulièrement des adhésifs en bois (Aires *et al.*, 2016; Ballerini *et al.*, 2005; Kim, 2009; Roffael *et al.*, 2000). Ils peuvent aussi être utilisés dans le traitement des eaux usées comme coagulants (Beltrán-Heredia *et al.*, 2010; Beltrán-Heredia and Sánchez-Martín, 2009; Sanchez-Martin *et al.*, 2010). Les tanins sont également utilisés pour la protection des canalisations métalliques enfouies dans le sol contre certaines bactéries (corrosion). Les tanins condensés peuvent également être utilisés comme matière première pour la préparation des résines synthétiques du type phénol-formaldéhyde (Deschamps, 1995).

II-2-6 : Biodégradation des tanins

La biodégradation aérobie des tanins et de l'acide tannique a été, dès le début du siècle, mise en évidence chez certains champignons communs comme *Aspergillus niger* ou *Penicillium* spp. (Knudson, 1913). L'identification d'une enzyme appelée tannase [tanin-acylhydrolase (EC 3.1.1.20)] a été mise en évidence chez ces champignons et la majorité des travaux effectués ensuite sur cette tannase et la biodégradation des tanins a été consacrée aux champignons.

II-2-6-1 : Biodégradation des tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des composés rapidement biodégradables en aérobiose. Les liaisons esters entre les monomères sont facilement hydrolysables par la tannase (Deschamps *et al.*, 1989 ; Nelson *et al.*, 1995). Cette activité dite tanin-acyl hydrolase correspond donc à la coupure du gallotanin en acide gallique et en glucose au niveau des liaisons esters entre les radicaux gallate ou digallate et les radicaux hydroxyles du glucose. Le produit d'hydrolyse obtenu renferme donc essentiellement de l'acide gallique et du sucre. La concentration de chaque produit d'hydrolyse dépend de la composition du polymère (Deschamps, 1989).

II-2-6-1-1 : Biodégradation aérobie des tanins hydrolysables

Différents champignons, levures et bactéries sont capables de dégrader plusieurs types de tanins hydrolysables. Les champignons du sol appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*, les levures du genre *Pichia* et les bactéries des genres *Klebsiella*, *Bacillus*,

Corynebacterium et *Achromobacter* sont les plus connus dans la dégradation des tanins hydrolysables. Cette biodégradabilité dépend du type de tanin. Le tanin de châtaignier (*Castanea sativa*), un ellagitannin provenant d'extract d'écorce et d'aubier, est moins biodégradable par les champignons et levures que le gallotannin ou l'acide tannique (Deschamps, 1985).

L'acide gallique, monomère des tanins hydrolysables, est rapidement utilisé comme substrat par les champignons et les bactéries. Des acides aliphatiques simples comme l'acide α -cétoglutarique et l'acide oxalique ont été identifiés comme intermédiaires du clivage du cycle aromatique durant la dégradation microbiologique de l'acide gallique. Dans d'autres études, la décomposition des acides tannique et gallique est trop rapide pour que les intermédiaires métaboliques aient pu être détectés. Avant le clivage du cycle aromatique, l'acide gallique peut être potentiellement décarboxylé pour donner le pyrogallol (Field et Lettinga, 1992 ; Chamkha *et al.* 2002).

II-2-6-1-2 : Biodégradation anaérobie des tanins hydrolysables

L'intérêt de la dégradation anaérobie des tanins hydrolysables résulte de l'augmentation des applications des systèmes anaérobies pour le traitement des rejets liquides contenant des tanins.

Une bioremédiation significative des tanins hydrolysables a été observée en réacteurs durant le traitement anaérobie en continu de certains rejets liquides (Balice *et al.*, 1988). Le gallotannin, présent à des concentrations non toxiques, peut être converti en méthane (Gollakota et Sarada, 1988).

Des bactéries anaérobies capables de dégrader ou de tolérer les tanins ont été isolées à partir des eaux usées de boues (Field et Lettinga, 1987) et d'appareils digestifs de koalas (Osawa, 1992), de chèvres (Brooker *et al.*, 1994 ; Nelson *et al.*, 1995) et de chevaux (Nemoto *et al.*, 1995).

Des entérobactéries, Gram négatives, anaérobies facultatives et capables de dégrader les complexes tanins-protéines ont été également isolées à partir de matières fécales de koalas (Osawa, 1992). Elles constituent un groupe à l'intérieur de la famille des *Pasteurellaceae* (Osawa *et al.*, 1995b). Osawa *et al.*, (1995b) ont proposé un nouveau genre, *Lonepinella koalarum* gen. nov. sp. nov., qui est capable de produire de l'acide gallique à partir d'acide tannique et de le décarboxyler en pyrogallol. Deux espèces types, *Haemophilus*

actinomycetemcomitans et *Haemophilus segnis*, classées dans la famille des *Pasteurellaceae* et isolées de la cavité buccale humaine, possèdent également des activités de type tannase (Nemoto *et al.*, 1995).

Nelson *et al.*, (1995) ont isolé du rumen de chèvre, un diplocoque anaérobie capable de dégrader les tanins hydrolysables. Cette bactérie peut croître en présence de 30 g/l d'acide gallique et produire du pyrogallol comme produit dominant de la fermentation. En revanche, l'acide tannique n'est pas utilisé comme seule source de carbone et d'énergie et sa dégradation dépend de la présence d'un hydrate de carbone fermentescible.

Récemment, Osawa *et al.*, (2000) ont isolé des matières fécales humaines et de certains aliments fermentés, des bactéries anaérobies possédant des activités tannase et gallate décarboxylase. Elles appartiennent à trois espèces du genre *Lactobacillus* : *L. Plantarum*, *L. paraplantarum* et *L. pentosus*. Ce fut la première fois qu'on découvrait que des espèces du genre *Lactobacillus* étaient capables de dégrader des tanins hydrolysables. Cependant, l'alimentation humaine n'est pas liée à des aliments très riches en tanins ; le rôle joué par ces lactobacilles dans la nutrition humaine a été jugée plutôt marginal (Osawa *et al.*, 2000).

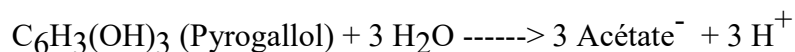
Certaines bactéries responsables de la dégradation anaérobie de trihydroxyphénols, comme l'acide gallique, ont été isolées en culture pure. Les membres de ce groupe sont *Eubacterium oxidoreducens*, *Coprococcus* sp., *Pelobacter acidigallici*, *Pelobacter massiliensis* ainsi que quelques souches appartenant au genre *Clostridium* (Brune et Schink, 1992 ; Kluge *et al.*, 1990 ; Krumholz et Bryant, 1986 ; Patel *et al.*, 1981).

La première étape de la dégradation anaérobie du gallate est une décarboxylation qui donne le pyrogallol. Ce dernier sera isomérisé en phlorogucinol et c'est au niveau de cet intermédiaire aromatique que se fait le clivage du noyau (Krumholz *et al.*, 1987). *Eubacterium oxidoreducens*, par exemple, est capable de décarboxyler le gallate en phloroglucinol, la dégradation se poursuit avec une isomérisation grâce à une transhydrolase qui transforme le pyrogallol en phloroglucinol. Ensuite, il se produit une hydrogénation grâce à une phloroglucinol réductase NADPH dépendante qui conduit à un intermédiaire hexacyclique non aromatique, le dihydrophloroglucinol. L'hydrolyse de ce produit permet l'ouverture du cyclohexane, ce qui conduit à un composé aliphatique en C6 (le 3-hydroxy-5-oxo-hexanoate) oxydable lui même en acétate et butyrate (Krumholz *et al.*, 1986 et 1987) (Figure 12).

Globalement à partir du pyrogallol, le clivage du noyau aromatique aboutit, selon les souches décrites, à de l'acétate ou à un mélange acétate + butyrate, selon :

Pelobacter acidigallici

$\Delta G'^{\circ} = -158,4$ KJ/réaction



Eubacterium oxidoreducens

$\Delta G'^{\circ} = -183,0$ KJ/réaction

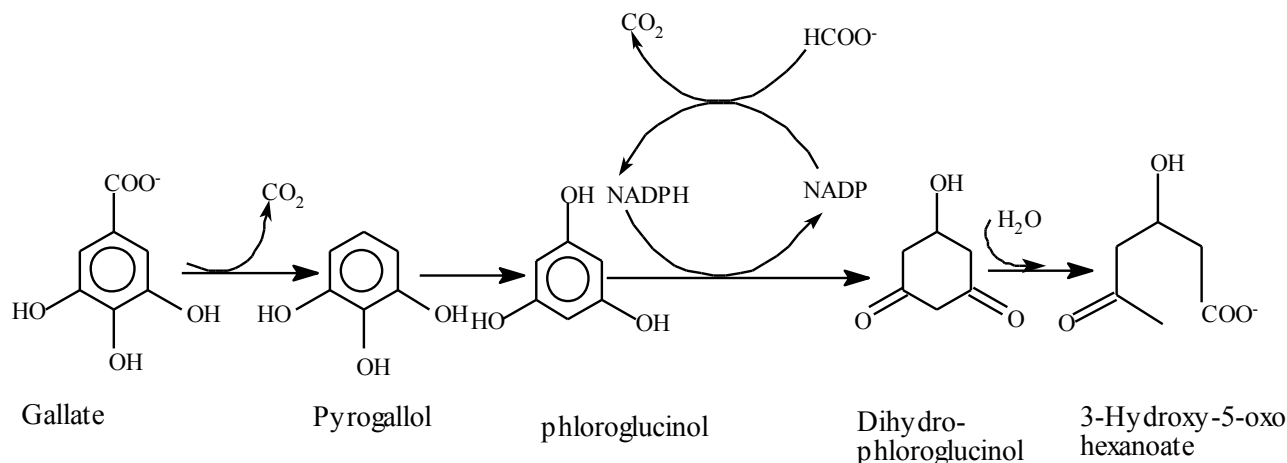
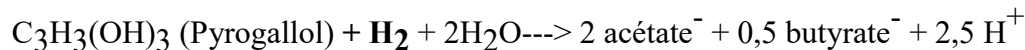


Figure 12 : Voie partielle de dégradation anaérobie du gallate et du phloroglucinol par *Eubacterium oxidoreducens* (Krumholz *et al.*, 1986)

II-2-6-2 : Biodégradation des tanins condensés

Les tanins condensés sont des substrats plus difficilement biodégradables par les microorganismes en aérobose comme en anaérobose. Les unités flavonoïdiques sont liées par des liaisons carbone-carbone directes qui diffèrent des liaisons esters, plus facilement hydrolysables.

II-2-6-2-1 : Biodégradation aérobie des tanins condensés

En 1964, Basabara émit l'hypothèse que certaines bactéries aérobies pourraient utiliser le tanin de mimosa comme source de carbone et d'énergie. Lewis et Starkey (1969) n'ont pu mettre en évidence cette propriété pour les bactéries qu'ils ont isolées, sauf pour un *Pseudomonas* qui ne pouvait dégrader que la catéchine. Par la suite, les travaux de Chandra *et al.*, (1973) à partir d'un tanin condensé extrait de bois de pommier, puis ceux de Grant et Corden (1976) à partir d'un tanin purifié de *Pinus radiata*, ont apporté la preuve que certains champignons étaient capables de dégrader des tanins condensés. Chandra *et al.*, (1973) ont

isolé des *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. terreus* et *Penicillium* sp. actifs sur des tanins condensés. L'aptitude d'une souche de *Penicillium adametzi* à pousser sur un dimère et un trimère de procyanidine ainsi que sur la catéchine comme seule source de carbone, a été également rapportée (Grant et Corden, 1976).

Certains champignons de la pourriture blanche sont également capables de dégrader la lignine et les tanins condensés comme par exemple l'écorce de pin d'Orégon (*Pseudotsuga menziesii*). (Ross et Corden, 1974). La majorité des champignons et levures qui dégradent les tanins condensés appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhodotorula* et *Candida*.

Pour la dégradation aérobie de monomères de tanins condensés, comme la catéchine et autres composés flavonoïdiques, deux modèles de dégradation aérobie ont été décrits.

Le premier modèle est caractérisé par le clivage de l'hétérocycle du flavonoïde pour donner de l'acide phloroglucinol carboxylique (2,4,6,-trihydroxybenzoate) à partir du noyau aromatique A, de l'acide protocatéchuïque (3,4-dihydroxybenzoate) à partir du noyau aromatique B et du CO₂ à partir du carbone 3 de l'hétérocycle.

Le second modèle de dégradation aérobie est caractérisé par une hydroxylation initiale, suivie par le clivage du noyau aromatique A (grâce à des oxygénases non spécifiques), pour donner des acides aliphatiques, et une production d'acide protocatéchuïque réalisée à partir du noyau aromatique B (Field et Lettinga, 1992).

Le clivage final des noyaux aromatiques résulte des activités des différentes monooxygénases et dioxygénases présentes (Gibson et Subramanian, 1984 ; Harayama et Kok, 1992).

II-2-6-2-2 : Biodégradation anaérobie des tanins condensés

La biodégradation anaérobie des tanins condensés a été très peu étudiée jusqu'à présent. Cependant la dégradation des flavonoïdes, précurseurs de tanins condensés, a été montrée et observée essentiellement avec des inoculums acclimatés.

La dégradation anaérobie de monomères de tanins condensés ainsi que de composés flavonoïdiques apparentés présente l'avantage d'éviter les réactions de polymérisation qui

interviennent lors d'une biodégradation aérobie et qui génèrent des composés résistant à l'hydrolyse.

Au cours de la dégradation anaérobie de flavonols, comme la quercétine, l'hétérocycle est clivé pour libérer le phloroglucinol à partir du noyau aromatique A, alors que le 3,4-dihydroxyphénylacétate est produit à partir du noyau aromatique B et le CO_2 à partir du carbone 4 de l'hétérocycle (Field et Lettinga, 1992, Winter *et al.*, 1991). (Figure 13)

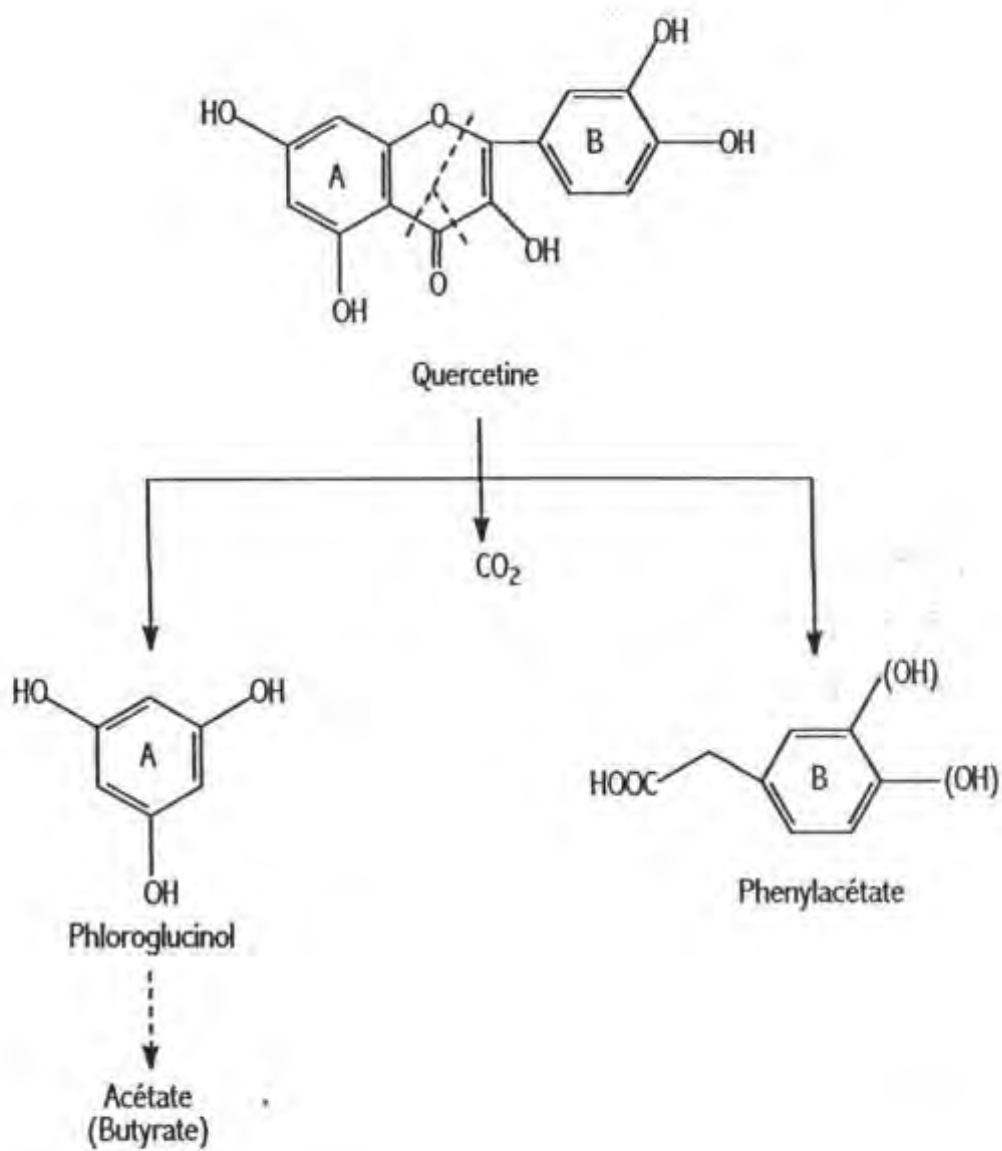


Figure 13 : Voies de dégradation anaérobie de flavonols, exemple de la quercétine

Parmi les souches de bactéries anaérobies strictes décrites, *Clostridium orbiscindens* est capable de cliver la liaison C2-C3 au niveau de la quercétine pour libérer deux produits aromatiques : le phloroglucinol et le 3,4-dihydroxyphénylacétate (Winter *et al.*, 1991) (Figure 14). En revanche, *Eubacterium oxydoreducens* exige la présence d'hydrogène ou de formiate, comme source énergétique complémentaire, pour pouvoir dégrader la quercétine en acétate, butyrate, CO₂ et 3,4-dihydroxyphénylacétate (Krumholz *et al.*, 1986, Krumholz et Bryant, 1986).

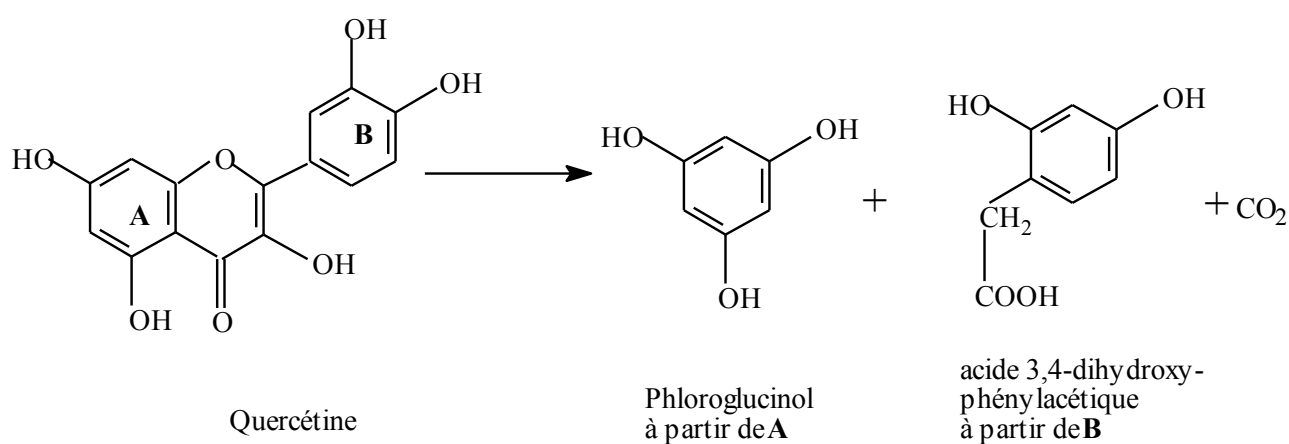


Figure 14 : Dégradation anaérobie de la quercétine par *Clostridium orbiscindens* (Winter *et al.*, 1991)

III- : LA BIODEGRADATION DE LA MATIERE ORGANIQUE

La dégradation de la matière organique permet aux microorganismes d'utiliser une large gamme de composés naturels simples ou monomères organiques comme source de carbone et/ou d'énergie.

Les populations microbiennes susceptibles d'intervenir au cours de ce processus varient en fonction des conditions physico-chimiques du milieu (pH, température, pression osmotique, présence d'oxygène et de lumière) et de la nature du substrat (polymères plus ou moins complexes ; monomères aliphatiques, cycliques ou aromatiques) ; elles sont également capables de former des associations stables dans divers écosystèmes où leur activité aboutit généralement à la production de dioxyde de carbone, de sulfure d'hydrogène et de méthane, source d'énergie non négligeable, en particulier pour les pays en voie de développement.

Dans les biotopes naturels, la présence d'oxygène est limitée lorsque sa consommation excède sa diffusion : c'est le cas de plusieurs environnements tels que les marais, les sédiments marins ou d'eau douce, les décharges et les sols, mais aussi des micro-environnements tels que le tractus digestif des animaux (Brauman *et al.*, 1992 ; Garcia, 1995). Ces conditions anoxiques sont également obtenues dans des systèmes artificiels comme les réacteurs biologiques servant au traitement des déchets organiques, les bacs d'épuration des eaux usées...

En absence d'oxygène, de nombreuses bactéries sont capables d'effectuer une respiration anaérobie pour produire de l'énergie, oxyder la matière organique et réoxyder les accepteurs d'électrons réduits. La quantité d'énergie conservée au cours de ce processus est néanmoins inférieure à celle obtenue en présence d'oxygène, et dépend du potentiel d'oxydo-réduction de l'accepteur d'électrons alternatif de l'oxygène. Quelle que soit la nature de l'accepteur final d'électrons, la quantité d'enthalpie libre issue de la réaction de réduction doit être suffisante pour permettre l'oxydation de la matière organique.

[*]	$O_2 + 2H_2$	$\rightarrow$	$2H_2O$	- 237 kJ/H ₂
[1]	$2Fe^{3+} + H_2$	$\rightarrow$	$2Fe^{2+} + 2H^+$	- 228 kJ/H ₂
[2]	$NO_3^- + 2H^+ + 4H_2$	$\rightarrow$	$NH_4^+ + 3H_2O$	- 150 kJ/H ₂
[3]	$SO_4^{2-} + H^+ + 4H_2$	$\rightarrow$	$HS^- + 4H_2O$	- 38 kJ/H ₂
[4]	$HCO_3^- + H^+ + 4H_2$	$\rightarrow$	$CH_4 + 3H_2O$	- 34 kJ/H ₂

Les conditions standards étant différentes de celles rencontrées dans la nature, les valeurs d'enthalpie libre sont plus faibles que celles reportées par les équations précédentes.

III-1 : La minéralisation de la matière organique

La biodégradation de la matière organique est par conséquent un processus assez complexe. De nombreuses études ont néanmoins permis de distinguer quatre étapes principales : l'hydrolyse des polymères biologiques par les micro-organismes hydrolytiques, l'acidogenèse par fermentation des composés organiques simples (oligomères, monomères), l'acétogenèse à partir des produits de la fermentation (acides organiques, acides gras volatils, alcools, hydrogène et dioxyde de carbone), la méthanogenèse à partir de l'acétate produit, de composés méthylés simples, de certains alcools, ou en présence d'hydrogène et de dioxyde de carbone par les methanoarchaea.

III-1-1 : Hydrolyse des polymères biologiques

L'hydrolyse des macromolécules telles que les protéines, les lipides, la cellulose et les hémicelluloses en oligomères et monomères est réalisée par des micro-organismes hydrolytiques. Ils excrètent au cours de leur métabolisme, des protéases, des lipases, des cellulases et des hémicellulases en conditions aérobie, aéro-anaérobie facultative, ou anaérobie stricte.

Les microorganismes hydrolytiques rencontrés dans les écosystèmes anaérobies appartiennent pour la plupart aux genres *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Prevotella* et *Bacteroides*, de même qu'à certaines espèces aéro-anaérobies facultatives du genre *Bacillus* (Klass, 1984). L'hydrolyse de la cellulose, polymère le plus abondant dans la nature, a été très largement étudiée depuis une vingtaine d'années (Le Ruyet, 1984 ; Ljungdhal et Eriksson, 1985 ; Sun *et al.*, 2016) de même que la protéolyse (Breure *et al.*, 1984) et l'hydrolyse des lipides (McInerney, 1988). Les bactéries possédant des cellulases ont été beaucoup étudiées depuis. *Clostridium thermocellum* une bactérie anaérobie, thermophile, a été décrite comme possédant un système cellulolytique ayant une très grande activité spécifique sur la cellulose cristalline (BioMatNet, 2002). Certains animaux, seulement des ruminants (vaches, chevaux, etc.) contiennent des bactéries symbiotiques avec une enzyme, la cellulase, pouvant

transformer la cellulose en glucose (Mathews *et al.*, 2003). Les cellulosomes de *Clostridium cellulolyticum* sont composés d'une protéine d'assemblage CipC sur laquelle viennent s'adsorber 8 enzymes parmi les 22 déjà connues (Gal *et al.*, 1997 ; Fierobe *et al.*, 2002 ; Tardif *et al.*, Congrès Anaérobie 2003)

III-2 : Biodégradation des composés aromatiques

III-2-1 : Biodégradation des composés monoaromatiques en condition aérobie

Les composés monoaromatiques simples tels que le phénol, le cathéchol et leurs dérivés substitués (benzoïques, cinnamiques, aldéhydiques) peuvent être dégradés en condition aérobie par divers groupes de microorganismes (bactéries, champignons et levures). En fonction du potentiel enzymatique dont ceux-ci disposent, leur métabolisme est orienté vers le clivage des substituants en position *ortho*, *meta* ou *para*.

L'oxygène sert d'activateur aussi bien lors des attaques initiales du noyau benzénique que dans l'étape finale de clivage du cycle, sous le contrôle d'enzymes de type hydroxylases (Heider et Fuchs, 1997 ; Pometto III *et al.*, 1981) :

- les monooxygénases catalysent l'incorporation d'un atome d'oxygène (dérivés monohydroxylés) ou de deux atomes d'oxygène (dérivés non hydroxylés) pour former des composés *ortho* (catéchol) ou *para* (gentisate) dihydroxylés, au cours de la dégradation des mono-phénols et des dérivés benzoïques, respectivement : ces monohydroxylases incorporent un atome d'oxygène dans le noyau benzénique pour former un peroxyde dont la dihydroxylation nécessite l'utilisation d'un coenzyme, le NADH, pour réduire le peroxyde en dihydrodiol.

- le noyau aromatique ainsi fragilisé est clivé sous l'action des dioxygénases qui catalysent l'incorporation simultanée de deux atomes d'oxygène suivant deux modes distincts, selon que la disposition des groupements hydroxyles : lorsque ceux-ci sont en position *ortho* l'un par rapport à l'autre, le clivage est dit intradiol ou *ortho* si la coupure se fait entre deux carbones adjacents portant des groupements hydroxyles et extradiol ou *meta* si la coupure se fait entre deux carbones dont un seul est hydroxylé, le deuxième étant soit non substitué, soit substitué par un groupement différent ; lorsque ceux-ci sont en position *para* l'un par rapport

à l'autre comme dans le cas du gentisate, c'est la coupure de type *meta* entre le carbone carboxylé et le carbone hydroxylé adjacent qui se produit (voie du gentisate) (Diaz *et al.*, 2013).

Le métabolisme d'une large gamme de composés aromatiques naturels passe par cette étape clef que constitue l'ouverture du cycle au niveau du catéchol. C'est le cas des dérivés trihydroxylés de l'acide benzoïque, des composés cinnamiques dont la chaîne latérale insaturée est préalablement oxydée pour former les dérivés benzoïques correspondants, et des composés méthoxylés ayant subi une déméthoxylation en leurs dérivés catéchol correspondants qui subissent un clivage par les mêmes types de voies, décrites depuis une trentaine d'années (Dagley, 1978 ; Sutherland *et al.*, 1983 ; Crawford *et al.*, 1973).

Les chaînes carbonées issues de l'ouverture du cycle sont transformées en produits du métabolisme intermédiaire et le carbone benzénique est introduit dans le cycle de Krebs ou dans le métabolisme de l'acétate.

III-2-2 : Biodégradation des composés monoaromatiques en condition anaérobie

III-2-2-1 : Dégradation complète par les bactéries anaérobies

La stabilité structurale des composés aromatiques liée à l'importante résonance du cycle benzénique a été considérée pendant longtemps comme un facteur empêchant toute dégradation en l'absence d'oxygène. Les premiers travaux en contradiction avec cette affirmation remontent à Tarvin et Buswell (1934) qui ont montré que des composés aromatiques tels que le benzoate pouvaient pourtant être complètement dégradés en conditions anaérobies en gaz carbonique et méthane. L'activité des bactéries anaérobies qui dégradent les composés aromatiques est souvent liée à la présence d'accepteurs d'électrons exogènes comme les nitrates et les sulfates, respectivement dans le cas des bactéries nitrato- ou sulfato-réductrices, ou endogènes dans le cas des bactéries fermentaires et des bactéries syntrophes associées aux bactéries méthanogènes.

III-2-2-1-1 : Les bactéries à respiration anaérobie

De nombreuses bactéries sont capables d'effectuer une respiration anaérobie pour conserver l'énergie et réoxyder les accepteurs d'électrons réduits en l'absence d'oxygène. La

conservation d'énergie dépend du potentiel d'oxydoréduction de l'accepteur d'électrons utilisé, et selon le type d'accepteur d'électrons, une quantité d'énergie plus ou moins importante peut être conservée. La respiration anaérobie au niveau des habitats naturels a lieu dans des couches profondes ou des niches écologiques exemptes d'oxygène. La hiérarchie des accepteurs d'électrons utilisés en l'absence d'oxygène commence avec le nitrate (+433 mV) et se poursuit à travers l'oxydation des ions métalliques comme le fer ferrique (Fe^{3+}) ou le Mn^{4+} (+200 mV), jusqu'au sulfate (-200 mV). La dégradation complète des composés aromatiques couplée à la respiration anaérobie a lieu dans des conditions bien définies qui respectent l'ordre du potentiel rédox des accepteurs d'électrons.

III-2-2-1-2 : Les bactéries fermentaires

La dégradation des composés aromatiques par fermentation est régie par deux conditions :

- la fermentation est réalisée par une culture pure : dans ce cas, les composés aromatiques sont hautement hydroxylés (phloroglucinol, pyrogallol et gallate), et leur potentiel d'oxydoréduction est proche de celui des produits de leur métabolisme (acétate et butyrate). Pour des potentiels d'oxydoréduction intermédiaires, la fermentation en culture pure n'est possible que lorsque les conditions thermodynamiques le permettent (Heider et Fuchs, 1997).

- la fermentation est réalisée par une co-culture : dans ce cas, les composés aromatiques sont peu ou pas hydroxylés (benzoate). Certaines de ces bactéries ont la capacité de disposer de leur surplus d'équivalents réducteurs grâce à un transfert interspèce d'hydrogène. Ces bactéries, qualifiées de syntrophes exigent la présence d'un partenaire capable de consommer l'hydrogène produit pour rendre la réaction thermodynamiquement possible (Wallrabenstein et Schink, 1994).

Les bactéries fermentaires dégradant les composés aromatiques sont phylogénétiquement diverses et appartiennent au moins à deux groupes. Ces bactéries utilisent les composés aromatiques comme source de carbone et d'énergie pour les convertir

essentiellement en acétate, butyrate, CO₂ et H₂. Les produits du métabolisme peuvent être utilisés par la bactérie hydrogénotrophe de la co-culture.

Fermentation des composés aromatiques en culture pure

Les bactéries fermentaires dépendent de la balance du potentiel d'oxydoréduction entre les substrats et les produits de dégradation. Deux stratégies sont rencontrées :

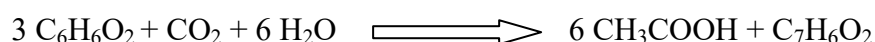
- Un premier groupe de bactéries fermentaires, dont les substrats se limitent aux composés polyphénoliques et qui contiennent deux ou trois groupements hydroxyle en position *meta* comme c'est le cas du phloroglucinol, du résorcinol et de l'acide gallique. Ces composés phénoliques sont hautement oxydés et peuvent être dégradés en acide organiques ; les membres de ce groupe sont quelques espèces des genres *Clostridium* et *Coprococcus* (Patel *et al.*, 1981) et les espèces *Eubacterium oxidoreducens* (Krumholz *et al.*, 1986), *Pelobacter acidigallici* (Brune et Schink, 1992) et *Pelobacter massiliensis* (Schnell *et al.*, 1991). Les espèces des genres *Streptococcus gallolyticus* sont capables d'hydrolyser l'acide tannique pour libérer l'acide gallique qui est par la suite décarboxylé en pyrogallol (Chamkha *et al.*, 2001).

Le genre *Pelobacter* appartient à la sous classe δ des protéobactéries, alors que les autres appartiennent au groupe des bactéries Gram positives à faible GC %. Les substrats sont transformés en phloroglucinol, le cycle aromatique de ces composés est directement réduit. Le produit majeur de la dégradation peut être soit l'acétate seul, soit à la fois de l'acétate et du butyrate. Dans ce groupe, trois autres bactéries fermentaires ont été décrites ; ces bactéries dégradent les composés aromatiques méthoxylés polyphénoliques, ce sont *Holofoga foetida* (Liesak *et al.*, 1994), *Sporobacter termitidis* (Grech-Mora *et al.*, 1996), et *Sporobacterium olearium* (Mechichi *et al.*, 1999). Les groupements méthoxy sont transformés en méthanediol ou en diméthylsulfure, alors que le produit méthoxylé est dégradé via la voie du phloroglucinol en acétate par *H. foetida* et *S. termitidis*, et en acétate et butyrate par *S. olearium*.

- Un second groupe de bactéries fermentaires, capables de dégrader les composés aromatiques qui ne possèdent pas de groupement hydroxyle en position *meta*. L'espèce

Syntrophus gentianae peut être citée comme exemple. C'est une bactérie fermentaire Gram négative appartenant à la sous classe des δ protéobactéries (Szewzyk et Schink, 1989) ; Wallrabenstaein *et al.*, 1995). Cette bactérie dégrade l'hydroquinone via la voie du benzoyl-CoA, ce qui lui permet de produire trois acétyl-CoA qui seront utilisés pour la génération d'ATP et donneront par la suite de l'acétate. La balance des charges est équilibrée par la production d'une mole de benzoate (Gorny et Schink, 1994).

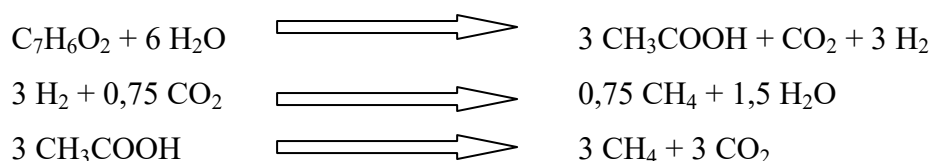
La fermentation de l'hydroquinone est décrite par l'équation suivante :



Syntrophus gentianae est aussi capable de dégrader le benzoate en co-culture avec une bactérie méthanogène (Szewzyk et Schink, 1989). Une nouvelle bactérie fermentaire, *Sporotomaculum hydroxybenzoicum*, isolée à partir du tractus digestif des termites et capable de dégrader le 3-hydroxybenzoate a été récemment décrite (Brauman *et al.*, 1998). Cette bactérie appartient phylogénétiquement au groupe des bactéries sulfato-réductrices Gram positives sporulées du genre *Desulfotomaculum*, mais elle n'utilise aucun accepteur d'électron soufré.

Fermentation des composés aromatiques en co-culture

Les co-cultures syntrophiques capables de dégrader les composés aromatiques comprennent généralement une bactérie fermentaire et une bactérie consommatrice d'hydrogène produit comme cela a été décrit dans les paragraphes précédents. Comme exemple de bactéries hydrogénotrophes, on peut citer les bactéries méthanogènes, les bactéries sulfato-réductrices ou les bactéries homoacétogènes. Dans les conditions syntrophiques, le benzoate est dégradé selon les équations suivantes :



Cette symbiose métabolique qualifiée de syntrophie a été découverte pour la première fois avec des bactéries méthanogènes. Les substrats utilisés par les bactéries

méthanogènes sont limités aux composés en C1 ou C2 tels que l'acétate, le formate et H₂-CO₂. La dégradation des composés aromatiques est alors effectuée par la bactérie fermentaire. Les consortiums méthanogènes semblent utiliser même les substrats les plus récalcitrants à la biodégradation, tels que les benzènes et les substrats chlorés. Les bactéries syntrophes qui oxydent le benzoate sont *Syntrophus buswellii* (Monfort *et al.*, 1984), *S. gentianae* (Wallrabenstein *et al.*, 1995), *S. buswellii* strain GA (Auburger *et al.*, 1995), *S. aciditrophicus* (Jackson *et al.*, 1999). Ces bactéries appartiennent à la sous classe δ des protéobactéries.

La plupart de ces bactéries syntrophes qui dégradent le benzoate sont capables de croître en culture pure en utilisant le crotonate comme seul substrat carboné.

III-2-2-2 : Les bactéries capables d'une transformation des composés aromatiques en anaérobiose sans ouverture du cycle aromatique.

Les structures aromatiques complexes sont essentiellement réduites en composés aromatiques simples et facilement dégradés par des microorganismes en aérobiose ou en anaérobiose. Les réactions impliquées sont des réactions d'oxydation, de réduction, de clivage des chaînes aliphatiques des acides aminés aromatiques, de décarboxylation, de déméthoxylation et d'utilisation des composés aromatiques comme source de soufre ou de l'azote.

III-2-2-2-1 : Réaction d'oxydation

Certaines bactéries acétogènes sont capables de coupler l'acétogénèse à l'oxydation des composés aromatiques ayant une fonction aldéhyde (Göbner *et al.*, 1994). La fonction aldéhydique peut être localisée sur un composé méthoxylé telle que la vanilline. Les composés aromatiques possédant une chaîne aliphatique à trois carbones ou plus sont oxydés en benzoyl-CoA ou phénylacétyl-CoA par β -oxydation par les bactéries qui dégradent les acides gras (Elder et Kelly, 1994 ; Metzler, 1977).

III-2-2-2-2 : Réaction de biotransformation réductrice

Les réactions de biotransformation réductrice sont impliquées dans la chaîne de respiration anaérobie ou font partie des voies fermentaires de dégradation des composés

aromatiques. Le processus est exergonique et dans certains cas il sert à la conservation d'énergie. La déshalogénéation réductrice des composés haloaromatiques a été observée la première fois en culture pure chez les bactéries thiosulfato-réductrices et sulfito-réductrices. Ces bactéries sont phylogénétiquement liées à différents groupes de bactéries sulfato-réductrices mais elles sont incapables d'utiliser les sulfates comme accepteur d'électrons. Elles sont cependant capables d'utiliser les composés haloaromatiques pour la respiration anaérobie. Les espèces décrites capables de réaliser ces genres de métabolismes sont la bactérie gram négative *Desulfomonile (Dmo.) tiedjei* et d'autres espèces de bactéries Gram positives du genre *Desulfobacterium*. *Desulfomonile tiedjei* est un membre de la sous classe δ des Protéobactéries et est phylogénétiquement liée aux bactéries sulfato-réductrices Gram négatives. Cette bactérie est aussi capable d'utiliser le benzoate et les méthoxybenzoates avec le thiosulfate comme accepteur d'électrons. *Desulfomonile tiedjei* a été isolée au départ comme organisme capable de déchlorer le 3-chlorobenzoate à partir d'un consortium méthanogène constitué d'une bactérie fermentaire qui dégrade le benzoate et d'un *Methanospirillum* qui consomme H_2 et CO_2 produits par les bactéries fermentaires (Mohn *et al.*, 1992). Le 3-chlorobenzoate est utilisé comme accepteur d'électrons lors de la respiration anaérobie par *Dmo. Tiedjei*.

Desulfobacterium dehalogenans est capable de réaliser une déchloration réductrice du 2,4-dichlorophénol et du 3-chloro-4-hydroxyphénylacétate ainsi qu'une ortho déchloration d'une large gamme de chlorophénols (Utkin *et al.*, 1994).

Certaines bactéries acétogènes peuvent également réaliser des réactions de réduction de quelques dérivés cinnamiques (férulate et caféate). Dans ce cas, le substrat est le groupement acrylique. Les bactéries acétogènes telles que *Acetobacterium woodii* et *Peptostreptococcus productus* réduisent (et déméthoxylent) ces composés en 3,4-dihydroxyphénylpropionate (hydrocaféate) (Misoph *et al.*, 1996 ; Tschech et Pfennig, 1984).

III-2-2-2-3 : Clivage des chaînes aliphatiques des acides aminés aromatiques

Plusieurs bactéries sont capables d'utiliser la chaîne aliphatique des acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) comme source de carbone. Les bactéries fermentaires Gram positives du genre *Clostridium* (*C. difficile* ou *C. tetani*) libèrent le phénol à partir de la tyrosine et l'indole à partir du tryptophane (Barker, 1981). La chaîne aliphatique des acides aminés aromatiques est libérée sous forme de pyruvate et d'ammoniaque, permettant à ces

bactéries de les utiliser respectivement comme source de carbone et d'énergie ainsi que comme source d'azote.

III-2-2-2-4 : Décarboxylation des composés aromatiques

La décarboxylation des composés aromatiques a été observée pour la première fois chez *Clostridium hydroxybenzoicum*, bactérie isolée à partir d'un enrichissement qui dégrade les chlorophénols (Zhang *et al.*, 1994). Cette bactérie décarboxyle le 4-hydroxybenzoate en phénol et le 3,4-dihydroxybenzoate en catéchol mais elle nécessite une autre source de carbone et d'énergie comme le glucose pour croître. Le produit de décarboxylation n'est pas métabolisé par cette bactérie. La culture mixte initiale s'est montrée capable de réaliser la dégradation du phénol après sa décarboxylation en 4-hydroxybenzoate. Au cours de cette réaction, c'est *C. hydroxybenzoicum* qui est responsable de cette décarboxylation. Les enzymes catalysant la réaction de décarboxylation et de carboxylation ont été isolées chez *C. hydroxybenzoicum*. Il s'agit de deux isoenzymes sensibles à l'oxygène qui catalysent la décarboxylation du phénol à un niveau plus bas que la décarboxylation du 4-hydroxybenzoate.

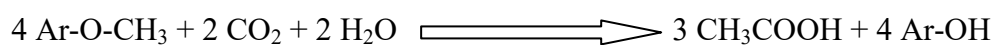
La décarboxylation du phénylacétate en toluène et de l'hydroxyphénylacétate en *p*-crésol est effectuée par les bactéries du genre *Clostridium* qui fermentent les acides.

La décarboxylation du gallate est assurée par des bactéries du genre *Streptococcus* (*S. gallolyticus*) isolée du tractus bovin. Le produit de décarboxylation, le pyrogallol, n'est pas dégradé par cette bactérie. La décarboxylation est cependant une réaction clef dans la dégradation du gallate par *Eubacterium oxidoreducens*, *Pelobacter acidigallici* ou par *Sporobacter termitidis* et *Holofaga foetida*, après déméthoxylation du syringate ou du triméthoxybenzoate. *Streptococcus gallolyticus* est capable aussi capable de décarboxyler le gallate en pyrogallol.(Chamkha *et al.*, 2001)

III-2-2-2-5 : O-déméthylation des composés aromatiques

L'utilisation des composés aromatiques méthoxylés par des bactéries comme source de carbone a été montrée pour la première fois par Bache et Pfenning (1981). Ces bactéries appartiennent aux genres *Acetobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium* et *Sporomusa* et la

plupart sont des bactéries homoacétogènes qui utilisent les groupements méthoxylés pour produire de l'acétate selon la réaction suivante :



Les composés aromatiques *o*-méthylés sont convertis par cette réaction en leurs analogues hydroxylés qui sont facilement dégradables par d'autres espèces que celles qui les *o*-déméthylent (DeWeerd *et al.*, 1988, Stupperich *et al.*, 1996). D'autres bactéries capables de déméthoxyler des composés aromatiques sans pour autant cliver leur cycle benzénique, ont été isolées récemment à partir d'un digesteur anaérobie de margines d'huile d'olives. Ces bactéries sont *Eubacterium aggregans* (Mechichi *et al.*, 1998), et *Clostridium methoxybenzovorans* (Mechichi *et al.*, 1999).

III-2-2-2-6 : Composés aromatiques utilisés comme sources de soufre et d'azote

Les composés aromatiques sulfonés existent naturellement dans l'humus (van Loon *et al.*, 1993). Dans l'industrie, ils sont utilisés comme surfactants ou comme solutions tampons. Il a été récemment montré que les composés aromatiques sulfonés sont métabolisés en anaérobiose. Ils peuvent servir de source de soufre ou de carbone et d'énergie. Une bactérie du genre *Clostridium* capable d'utiliser les sulfonates en anaérobiose, a été isolée mais les produits de dégradation des sulfonates par cette bactérie ne sont pas encore identifiés (Denger *et al.*, 1996).

Les substitutions contenant des atomes d'azote peuvent être utilisées comme sources d'azote par les bactéries anaérobies. Ceci a été montré pour le trinitrotoluène qui sert de source de carbone ou d'azote pour une bactérie du genre *Desulfovibrio* après nitroréduction en triaminotoluène et désamination réductrice (Boopathy et Kupa, 1992 ; Preuss *et al.*, 1993).

III-2-3 : Biochimie des voies métaboliques de dégradation des composés aromatiques en anaérobiose.

La dégradation anaérobie des composés aromatiques est généralement un processus comportant deux phases. Dans la première phase, les composés aromatiques sont convertis en

un intermédiaire central qui est susceptible d'être désaromatisé (métabolisme périphérique) (Boll *et al.*, 2014). Ces intermédiaires centraux sont soit les composés polyphénoliques, phloroglucinol et résorcinol, qui sont générés à partir d'un nombre très réduit de composés aromatiques, soit le benzoyl-CoA, qui est l'intermédiaire central de la dégradation anaérobie de la plupart des composés aromatiques (Figure 15).

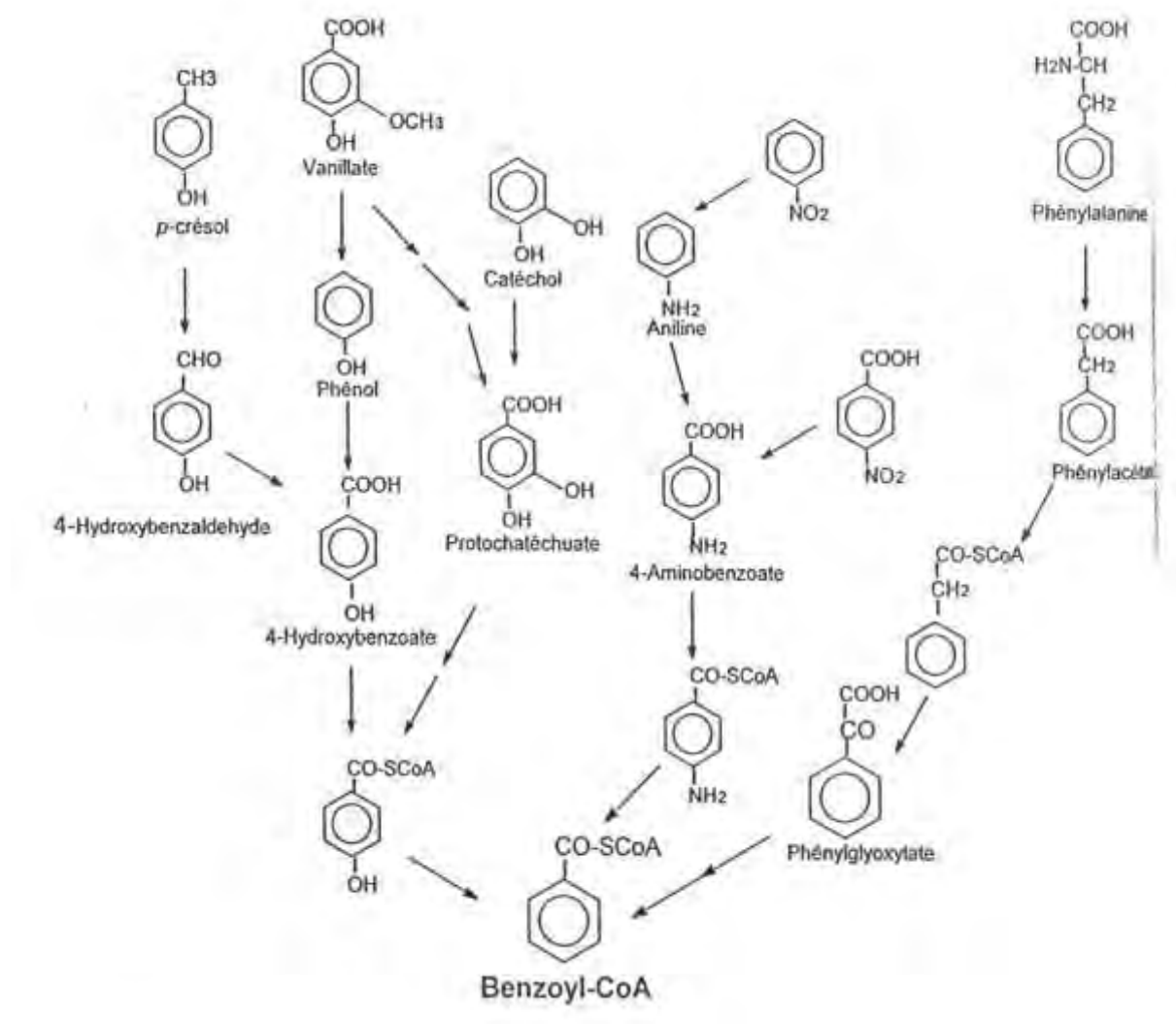


Figure 15 : Voies de dégradation via le benzoyl-CoA de quelques composés aromatiques (Heider *et al.*, 1997)

La seconde phase de la dégradation anaérobie des composés aromatiques est la réduction de ces intermédiaires pour donner des composés non aromatiques qui seront dégradés par la suite en acétyl-CoA et en CO₂ (métabolisme central).

III-2-3-1 : Dégradation des composés phénoliques via le phloroglucinol et le résorcinol

Un grand nombre de composés monoaromatiques trihydroxylés existent dans les tissus végétaux sous forme de flavonoïdes et de tannins. Ces composés contenant 2 ou 3 groupements hydroxyle en position *meta* sont dégradés sans être activés en CoA-thioster car les fonctions hydroxyle diminuent le caractère aromatique de ces molécules. En raison de leur degré d'oxydation élevé, les composés polyphénoliques peuvent être dégradés par des cultures de souches pures de bactéries à respiration anaérobie ou des bactéries fermentaires du genre *Pelobacter*, *Eubacterium* et *Clostridium*. Les bactéries fermentaires ne minéralisent pas totalement ces composés mais elles accumulent de l'acétate et du butyrate comme produits finaux de dégradation. Les substrats clés de cette voie métabolique sont le phloroglucinol et le résorcinol (Philipp *et al.*, 2012 ; Pacheco-Sánchez *et al.*, 2017).

III-2-3-2 : Réactions de conversion des composés polyphénoliques

Les tri- et tétrahydroxybenzènes sont convertis en phloroglucinol et en résorcinol par des transhydrolases, des enzymes catalysant le transfert intermoléculaire du groupement hydroxy d'une molécule donneuse à une molécule acceptrice. Les isomères *ortho* et *para*-dihydroxybenzène (catéchol et hydroquinone) qui sont dégradés via la voie du benzoyl-CoA, ne sont pas transhydroxylés par cette enzyme (Brune *et al.*, 1992). Les transhydrolases ont été purifiées et caractérisées à partir des espèces *Eubacterium oxidoreducens* et *Pelobacter acidigallici* sous forme d'un hétérodimère de 133 kDa avec des sous unités de 100 kDa et 31 kDa. La réaction de transhydrolation nécessite du 1,2,3,5-tétrahydroxybenzène comme co-substrat, qui sert de donneur de groupement hydroxyle pour l'enzyme à partir de la position 2, il est régénéré par hydroxylation du pyrogallol en position 5 (Reichenbecher *et al.*, 1994 ; Reichenbecher *et al.*, 1996) (Figure16). Le gallate est converti via le pyrogallol en phloroglucinol comme intermédiaire aromatique final. L'enzyme responsable de la décarboxylation du gallate a été détectée chez *Eubacterium oxidoreducens*, *Pelobacter acidigallici* (Krumholz *et al.*, 1987 ; Brune et Schink, 1992) et *Holophaga foetida* (Kreft et Shink, 1993).

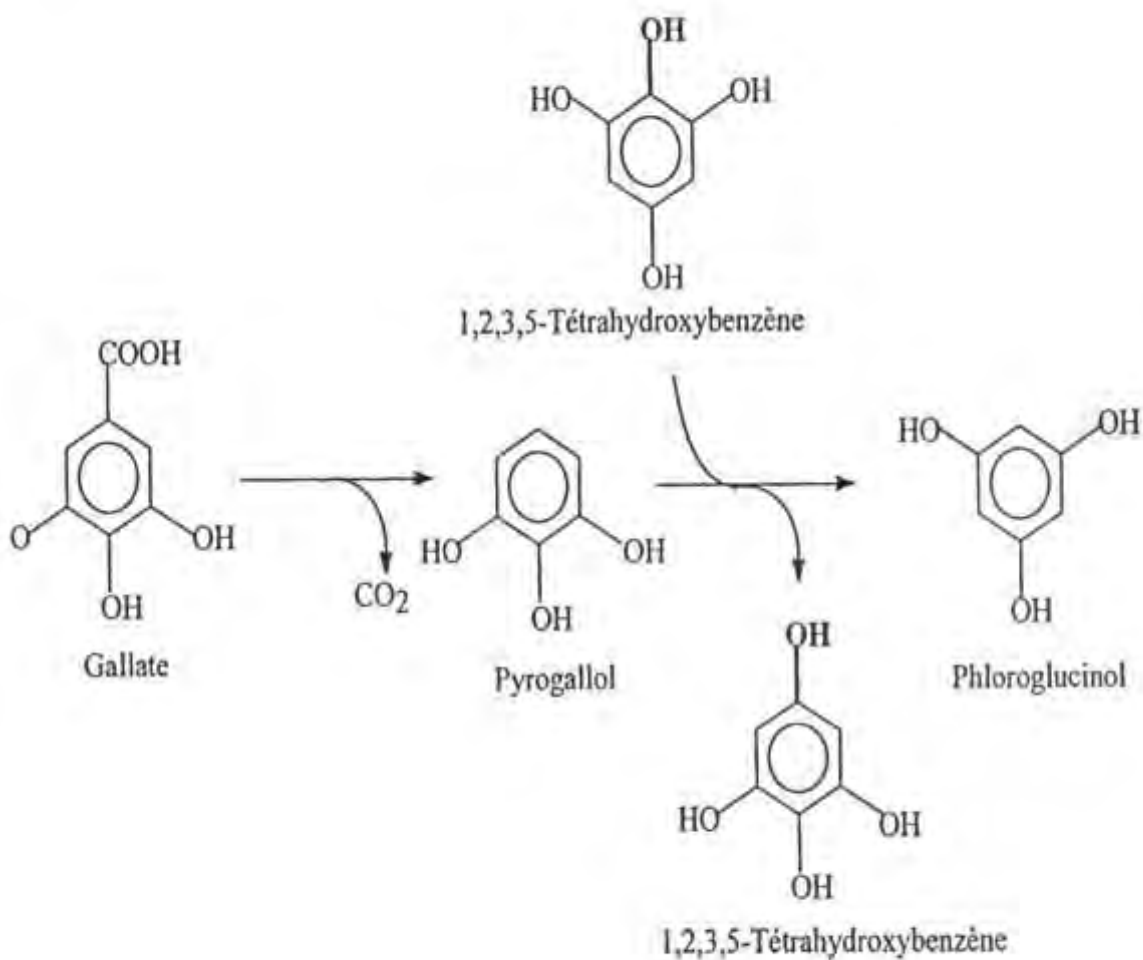


Figure 16 : Voie métabolique de conversion du gallate en phloroglucinol et transhydroxylation du tétrahydroxybenzène (Heider et Fuchs, 1997)

Les dihydroxybenzoates contenant un groupement hydroxyle en position *meta* (les acides résorcyliques) sont décarboxylés pour être métabolisés par la suite via le résorcinol. Les isoenzymes de la décarboxylation des différentes résorcyates (2,4-dihydroxybenzoate et 2,6-dihydroxybenzoate) ont été détectées dans des co-cultures de *Clostridium* après croissance sur leurs substrats respectifs. Le produit de décarboxylation est dégradé via la voie du résorcinol (Kluge *et al.*, 1990). (Figure 12)

III-2-3-3 : Dégradation du phloroglucinol

La dégradation du phloroglucinol est initiée par une phloroglucinol réductase NADPH-dépendante. Cette enzyme a été purifiée et caractérisée chez *Eubacterium oxidoreducens*. Il s'agit d'un homodimère non sensible à l'air, de 78 kDa, qui réduit le phloroglucinol en 1,3-dioxo-5-hydroxy-cyclohexane (Brune et shink, 1992). Le cycle du cyclohexane est ouvert par la suite par une dihydrophloroglucinol hydrolase pour donner le 3-hydroxy-5-oxo-hexanoate (Krumholz et Bryant, 1987 ; Brune et shink, 1992). Ce produit aliphatique est oxydé en triacétate par une déshydrogénase NADP-dépendante, ce qui permet de régénérer le NADPH nécessaire pour la réduction initiale du phloroglucinol (Brune et shink, 1992).

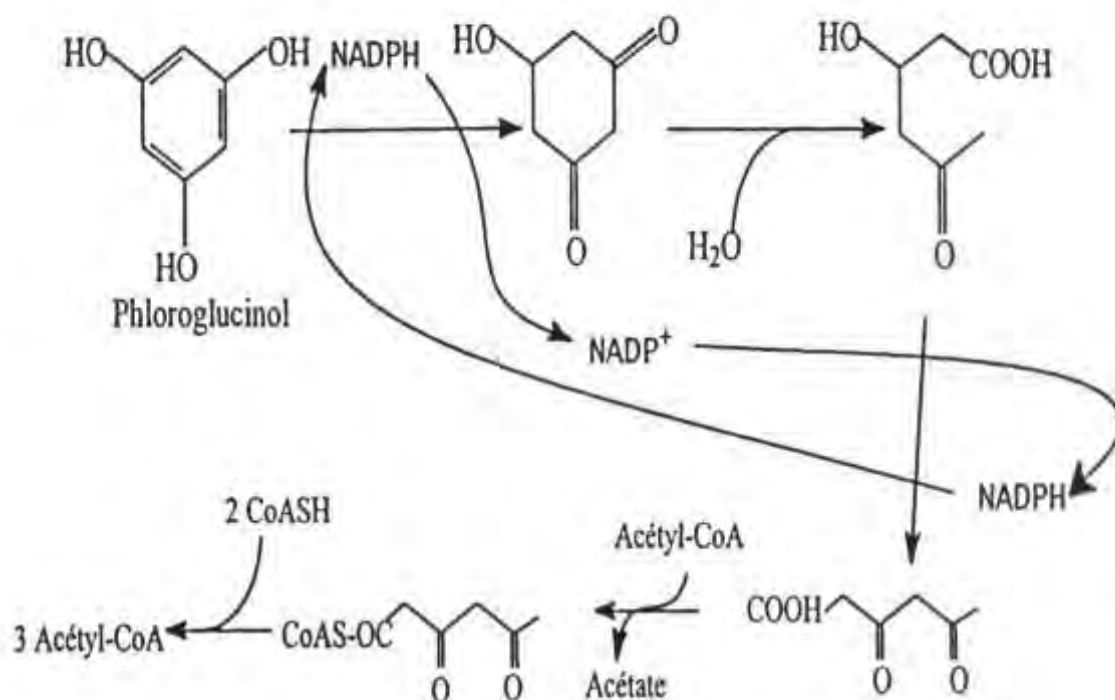


Figure 17 : Voie métabolique de dégradation du phloroglucinol par *Pelobacter* sp. et *Eubacterium oxidoreducens* (Heider et Fuchs, 1997a)

III-2-3-4 : Dégradation du résorcinol

La dégradation du résorcinol (Figure 18) peut être aussi initiée par une réduction du noyau aromatique chez des bactéries fermentaires. L'enzyme responsable de la réduction du résorcinol semble dépendre d'un réducteur plus fort que les pyridines nucléotides. Cette enzyme, détectée dans les extraits d'un *Clostridium*, est sensible à l'oxygène et dépend de la réduction du méthyl viologène qui est considéré comme son donneur d'électron. Le produit de réduction du résorcinol, le 1,3-dioxo-cyclohexane, est immédiatement hydrolysé en un intermédiaire aliphatique: le 5- oxohexénoate dont la dégradation est effectuée par β -oxydation en acétyl CoA et butyryl-CoA (Kluge *et al.*, 1990).

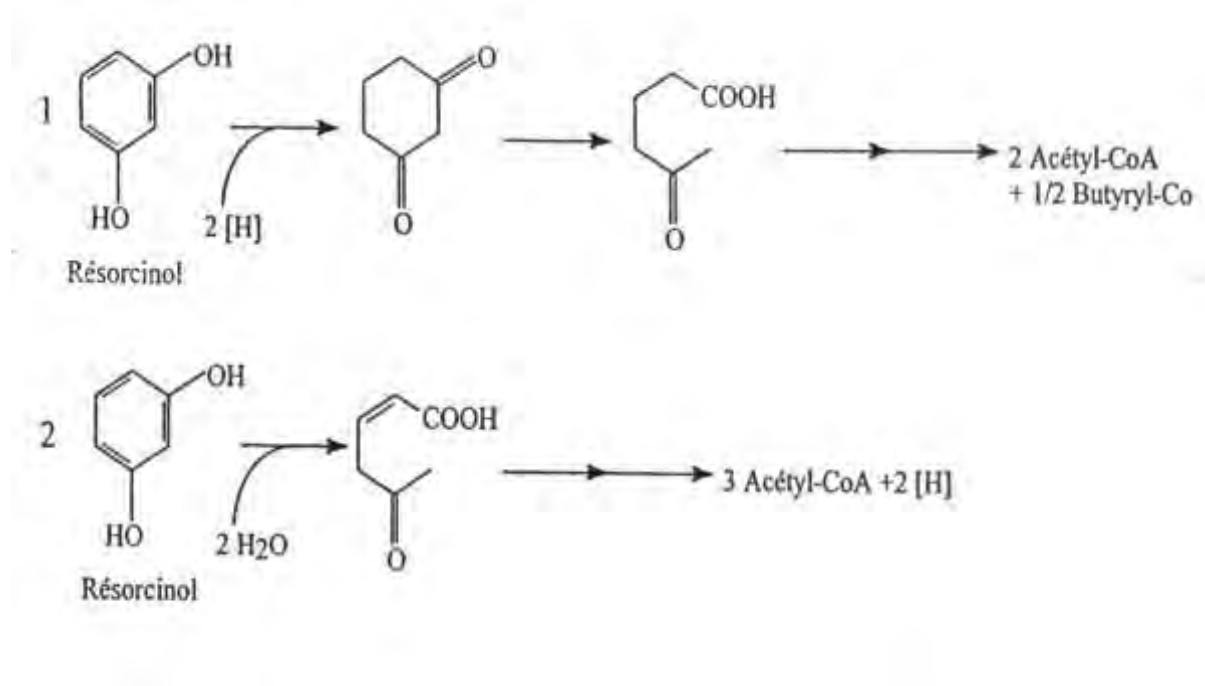


Figure 18 : Voies métaboliques de dégradation du résorcinol

- 1) fermentation du résorcinol par *Clostridium* sp. (Kluge *et al.*, 1990)
- 2) voie hydrolytique de dégradation du résorcinol utilisée par une bactérie dénitrifiante *Alcaligenes* sp. (Heider et Fuchs, 1997).

III-2-4 : Réactions de conversion des composés aromatiques en un intermédiaire central, le benzoyl-CoA.

III-2-4-1 : Conversion du phénol en 4-hydroxybenzoate

Le phénol est un composé très abondant dans la nature à cause de son utilisation excessive dans l'industrie. Il est aussi produit naturellement par la biotransformation de certains de composés aromatiques par les microorganismes. Le phénol peut être dégradé en anaérobiose par plusieurs bactéries dénitrifiantes, réductrices du fer, sulfato-réductrices et par des consortiums méthanogènes. La voie métabolique de dégradation du phénol a été étudiée chez la bactérie dénitrifiante *Thauera aromatica*, une bactérie isolée à l'origine à partir du phénol comme source de carbone (Tschech et Fuchs, 1987). La voie de dégradation est initiée par une réaction de carboxylation inhabituelle du cycle aromatique.

La croissance sur phénol est dépendante de la présence du bicarbonate dans le milieu. La carboxylation du phénol est effectuée en position *para* par rapport au groupement hydroxyle et se fait en deux étapes :

La première étape est la formation d'un phényl phosphate à partir du phénol et d'un donneur de phosphate qui reste encore inconnu. La réaction de phosphorylation fait intervenir une phénol kinase (Lack et Fuchs, 1994).

La seconde étape est la carboxylation du phényl phosphate. Lack et Fuchs (1992) ont montré que cette réaction est catalysée par une phényl phosphate carboxylase. Cette voie enzymatique est dépendante de la présence des ions K^+ et Mn^{2+} ; elle catalyse aussi l'échange du groupement carboxylique avec le CO_2 libre (Lack *et al.*, 1991).

III-2-4-2 : Conversion des crésols en (méthyl) hydroxybenzoates et en benzoyl-CoA

Les trois isomères du crésol (*ortho*, *meta*, *para*) peuvent être dégradés en anaérobiose par des bactéries dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou par des consortiums méthanogènes (Rabus *et al.*, 2015). Cependant les voies de dégradation de ces trois isomères sont différentes.

L'*o*-crésol subit une carboxylation en position *para* par rapport au groupement hydroxy pour donner le 3-méthyl-4-hydroxybenzoate qui est par la suite activé en CoA-thioester. Le 3-méthyl-4-hydroxybenzoyl-CoA est déshydroxylé par réduction en 3-méthylbenzoyl-CoA (Rudolphi *et al.*, 1991) (Figure 19). Une voie métabolique comparable,

comme indiqué par la formation du 3-méthyl-4-hydroxybenzoate à partir de l'*o*-crésol, a été démontrée chez une culture mixte méthanogène (Bisaillon *et al.*, 1991).

La dégradation du *m*-crésol par les bactéries sulfato-réductrices est initiée par une carboxylation du *m*-crésol pour donner le 2-méthyl-4-hydroxybenzoate (Roberts *et al.*, 1990 ; Ramanand et Sulfita, 1993) qui sera par la suite déméthylé en 4-hydroxybenzoate.

La dégradation anaérobie du *p*-crésol est effectuée dans tous les cas via l'oxydation du groupement méthyl (Bossert et Young, 1986 ; Hopper *et al.*, 1991). L'enzyme périplasmique catalysant cette réaction a été caractérisée. Elle contient un FAD lié par une liaison covalente et un cytochrome C et catalyse les deux étapes d'hydroxylation du groupement méthyle en 4-hydroxybenzaldéhyde (Hopper *et al.*, 1991).

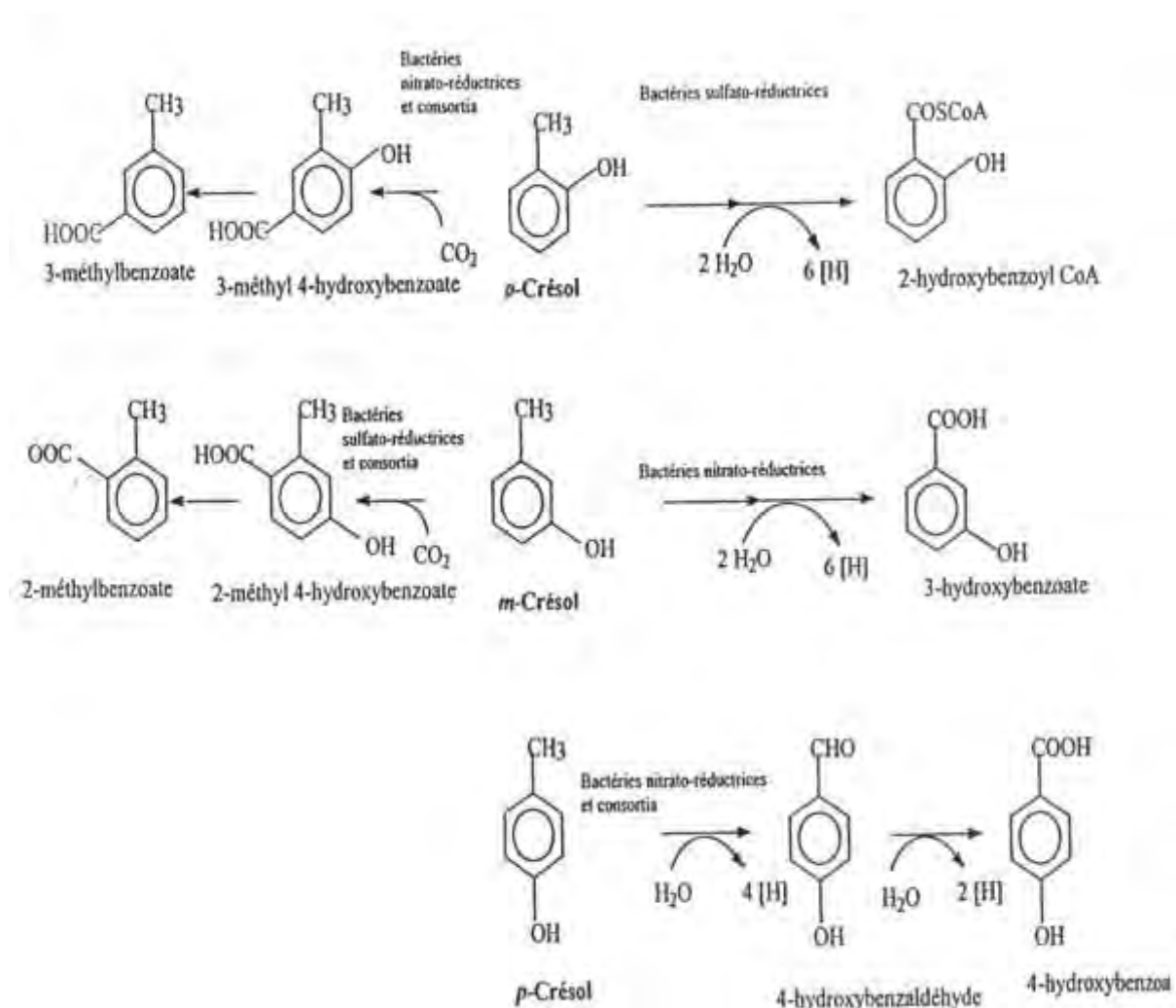


Figure 19 : Voie métabolique de dégradation des crésols par les bactéries anaérobies (Heider et Fluchs, 1997a)

III-2-4-3 : Conversion du benzoate en benzoyl CoA

Un grand nombre de composés aromatiques hydroxylés existent naturellement comme intermédiaires lors de la dégradation d'autres composés aromatiques (2-,3- et 4-hydroxybenzoate). Ils peuvent être dégradés par plusieurs bactéries anaérobies. La dégradation de ces composés par les bactéries fait intervenir des perméases spécifiques pour les transporter à travers la membrane cytoplasmique, à cause de leur forte hydrophilie.

Les trois isomères de l'hydroxybenzoate sont dégradés après transformation en benzoyl-CoA. Leur groupement carboxyliques subissent d'abord une activation en coenzyme A-thioester ; le produit est par la suite déshydroxylé par réduction (Bonting *et al.*, 1995 ; Bonting et Fuchs 1996 ; Heising *et al.*, 1991). Cette voie a été démontrée pour la première fois sur le 4-hydroxybenzoate ; ce composé est un intermédiaire de la dégradation du phénol et du *p*-crésol par *T. aromatica*. Le 4-hydroxybenzoate est activé en 4-hydroxybenzoyl-CoA par une coenzyme A ligase spécifique et par la suite, réduit en benzoyl-CoA par une 4-hydroxybenzoyl-CoA réductase. Cette enzyme a été identifiée chez *T. aromatica*.

Les gènes responsables de la dégradation du 4-hydroxybenzoate sont affectés par l'oxygène et la disponibilité du substrat. L'enzyme n'est présente que chez des cellules qui ont été cultivées en anaérobiose sur du 4-hydroxybenzoate ou du substrat dont la dégradation s'effectue via le 4-hydroxybenzoate.

Le 2-hydroxybenzoate et le 3-hydroxybenzoate sont aussi des substrats pour les bactéries dénitrifiantes. Il a été montré que l'activation de ces hydroxybenzoates est catalysée par des CoA ligases spécifiques, mais les résultats concernant les hydroxybenzoyl CoA réductases spécifiques de ces substrats sont encore incomplets (Gorny et Schink, 1994a ; Gorny et Schink, 1994b).

La dégradation des dihydrobenzoates tels que les résorcyates est réalisée via la décarboxylation en résorcinol, alors que d'autres dihydroxybenzoates contenant un groupement hydroxy dans les positions *ortho* ou *para* (exemple : protocatéchuate et gentisate, intermédiaires de la dégradation du catéchol et de l'hydroquinone) sont activés en CoA thioesters, deshydroxylés par réduction et par la suite métabolisés via le benzoyl-CoA.

III-2-4-4 : Conversion des aminobenzoates en benzoyl-CoA

Les amino benzoates sont des intermédiaires de la dégradation ou de la synthèse de plusieurs composés tels que le tryptophane et le folate. Ils sont dégradés en anaérobiose et dans tous les cas, étudiés ; le groupement amine est éliminé du cycle par réduction après activation du composé par thioestérification. Une coenzyme A ligase spécifique du 2-aminobenzoate a été caractérisée à partir d'*Acetobacterium evansii* (Altenschmidt *et al.*, 1991). Il s'agit d'une enzyme monomérique de 60 kDa qui présente une forte activité sur le 2-aminobenzoate, mais aucune activité sur les autres aminobenzoates n'a été détectée.

La désamination réductrice du 2-aminobenzoyl-CoA a été montrée aussi chez d'autres espèces des genres *Thauera* et *Azoarcus* (Lochmeyer *et al.*, 1992). Le 4-aminobenzoate est un intermédiaire de dégradation de l'aniline par *Desulfobacterium anilini* alors que le 3-aminobenzoate peut être utilisé comme substrat par les bactéries du genre *Desulfobacterium*. Ces composés sont activés par thioestérification et les thioesters sont désaminés pour donner le benzoyl-CoA (Schnell et Schink, 1991 ; Schnell et Schink, 1992).

III-2-4-5 : Conversion du toluène en benzoyl-CoA

Le toluène est l'un des composés aromatiques les plus aptes à la dégradation en anaérobiose. Les microorganismes capables de dégrader le toluène sont les bactéries dénitrifiantes, les bactéries réductrices du fer, les bactéries sulfato-réductrices et les consortiums méthanogènes.

La voie métabolique de dégradation du toluène a été élucidée chez la bactérie dénitrifiante *T. aromatica*. La première étape de dégradation implique la condensation du groupement méthyle avec du fumarate pour donner un composé intermédiaire, le benzylsuccinate (Biegert *et al.*, 1996). La réaction est catalysée par une nouvelle enzyme très sensible à l'oxygène : la benzylsuccinate synthase.

La synthèse du benzylsuccinate est une réaction exergonique (-50 kJ.mol^{-1}). Le benzylsuccinate est par la suite oxydé en benzyl-CoA en présence de coenzyme A et de nitrate

comme oxydant. La voie de conversion du benzylsuccinate en benzyl-CoA peut être une β -oxydation via le Z-phénylitaconate ou CoA-thioester (Figure 20).

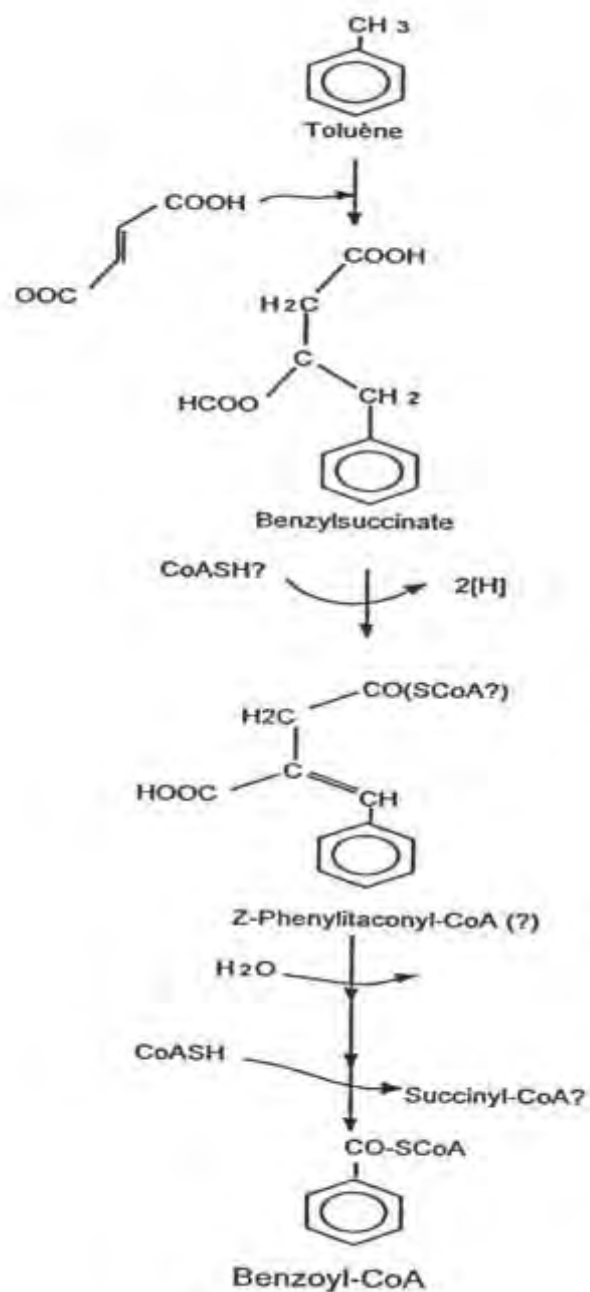


Figure 20 : Voie de dégradation du toluène par *T. aromatica* (Biegert *et al.*, 1996)

III-2-4-6 : Conversion d'éthylbenzène en benzoyl CoA

L'éthylbenzène est utilisé comme substrat par certaines bactéries dénitrifiantes du groupe *Thauera/Azoarcus* telles que les EB1 et EbN1. Ces bactéries dégradent aussi le 1-phényléthanol et l'acétophénone. La dégradation de tous ces composés dépend de la présence du CO₂, ce qui laisse la carboxylation de l'acétophénone comme seconde étape de la voie métabolique (Rabus et Widdel, 1995 ; Ball *et al.*, 1996).

Une suspension cellulaire de la souche EB1 cultivée sur éthylbenzène est capable de convertir d'abord l'éthylbenzène en 1-phényléthanol puis en acétophénone qui est transformé enfin en présence de CO₂ en 3-oxophénylpropionate et en benzoyl-CoA (Ball *et al.*, 1996).

III-2-4-7 : Conversion des xylènes et d'autres alkylbenzène en benzoyl-CoA

La dégradation des trois isomères du xylène a été montrée dans des cultures de bactéries dénitrifiantes et de bactéries sulfato-réductrices (Reuter *et al.*, 1994 ; Rabus et Widdel 1996 ; Rabus *et al.*, 1996 ; Häner *et al.*, 1995). La conversion cométabolique de l'*o*-xylène en son intermédiaire correspondant le 2-méthylbenzylsuccinate, a été montrée chez une souche de bactérie dénitrifiante qui dégrade le toluène (Evans *et al.*, 1992).

III-2-4-8 : Conversion du benzène et du naphtalène en benzoyl-CoA

Les composés aromatiques non substitués sont hautement récalcitrants à la dégradation en conditions anaérobies. Cependant des études ont montré que ces composés peuvent être dégradés en anaérobiose par des cultures mixtes en condition méthanogène, ou en condition de respiration anaérobie du fer et du sulfate. Le phénol a été détecté comme intermédiaire lors de la dégradation du benzène par un enrichissement méthanogène (Vogel et Grbic-Galic, 1986).

Parmi les composés aromatiques non substitués, le naphtalène et le phénanthrène sont les seuls composés polycycliques qui peuvent être dégradés en anaérobiose (Coates *et al.*, 1996 ; Al-Bashir *et al.*, 1990 ; Bregnard *et al.*, 1996). La dégradation du benzène peut avoir lieu dans des conditions nitrato-réductrices (Burland et Edwards 1999).

III-2-4-9 : Dégradation des acides aminés aromatiques

La dégradation des trois acides aminés aromatiques, phénylalanine, tyrosine et tryptophane, est possible en anaérobiose et plusieurs bactéries dénitrifiantes et sulfato-réductrices sont capables de les minéraliser totalement en CO₂. Cependant plusieurs bactéries anaérobies strictes transforment les acides aminés aromatiques par fermentation en composés aromatiques plus simples.

Les bactéries dénitrifiantes capables de dégrader les acides aminés aromatiques sont du genre *Thauera* et *Azoarcus*. La voie métabolique de dégradation de la phénylalanine a été établie. La première étape de cette voie est l'oxydation en phénylpyruvate par une transaminase 2-oxoglutarate dépendante. Le phénylpyruvate subit par la suite, une décarboxylation en phénylacétaldéhyde. Ce composé est oxydé en phénylacétate par une aldéhyde déshydrogénase NAD-dépendante.

Enfin le phénylacétate est dégradé par alpha oxydation (Mohamed *et al.*, 1993). La dégradation de la tyrosine procède selon une voie similaire chez ces bactéries, en produisant le 4-hydroxyphénylacétate comme intermédiaire alors que la dégradation du tryptophane fait intervenir le 2-aminobenzoate comme intermédiaire (Seyfried *et al.*, 1991).

L'oxydation des acides aminés aromatiques via les intermédiaires aryl-pyruvates en aryl-acétates est courante pour la fermentation des acides aminés chez les bactéries Gram positives (réaction de Stikland) et les archaebactéries hyperthermophiles. Les enzymes impliquées dans la fermentation des acides aminés aromatiques par les archaebactéries sont largement étudiées (Adams et Kletzin, 1996), alors que la voie d'oxydation utilisée par les bactéries Gram positives reste encore non identifiée (Baker, 1981).

La première étape de la dégradation des aromatiques semble être identique à toutes les voies de dégradation. C'est l'oxydation en aryl-pyruvate par des transaminases 2-oxoglutarate dépendante (Evans, 1977 ; Andreotti *et al.*, 1995). *Pyrococcus* et *Thermococcus* sp. oxydent les trois aryl-pyruvates en leurs dérivés aryl-acétyl-CoA par une oxydoréductase à ferrédoxine couplée (Mai et Adams, 1994) et utilisent le CoA pour la régénération de l'ATP par les coenzymes A ligase spécifiques des aryl-acétates (Mai et Adams, 1996).

III-2-5 : Réactions impliquées dans la désaromatisation du benzoyl-CoA et sa dégradation.

III-2-5-1 : Réactions de désaromatisation du benzoyl-CoA

La réaction de désaromatisation (Figure 21) consiste en une réduction du benzoyl-CoA en cyclohexa-1,5-diène-carboxyl-CoA, catalysée par une benzoyl-CoA réductase. Cette enzyme a été détectée chez *R. palustris*, *T. aromatica* et *A. evansii* (Koch et Fuchs, 1992 ; Koch *et al.*, 1993 ; Boll *et al.*, 1997) et purifiée à partir de culture de *T. aromatica* (Boll *et al.*, 1997 ; Buckel et Keese, 1995). Il s'agit d'une enzyme hétérotétramérique de 160 kDa, très sensible à l'oxygène et qui semble contenir deux clusters de $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ deux clusters de $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ et un cofacteur FAD par molécule.

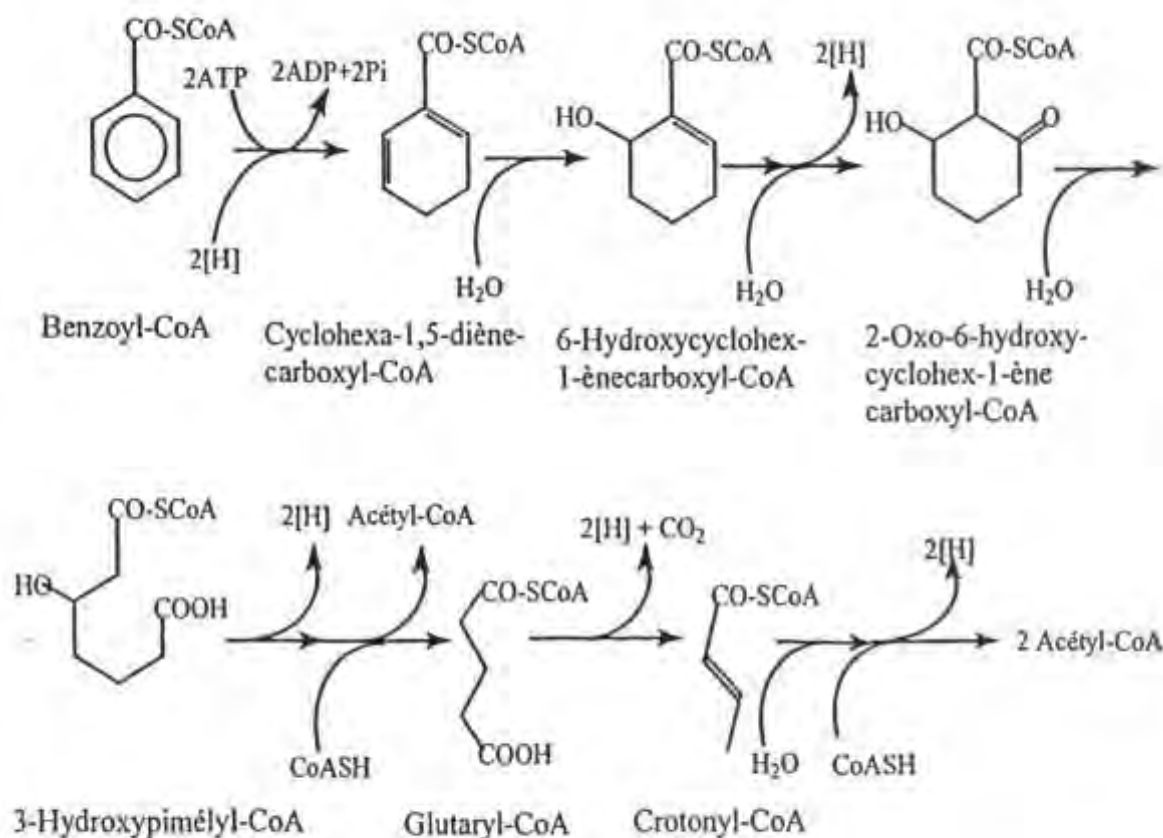


Figure 21 : Voie métabolique de dégradation du benzoyl-CoA (Heider et Fuchs, 1997)

III-2-5-2 : Voies métaboliques de dégradation des produits désaromatisés

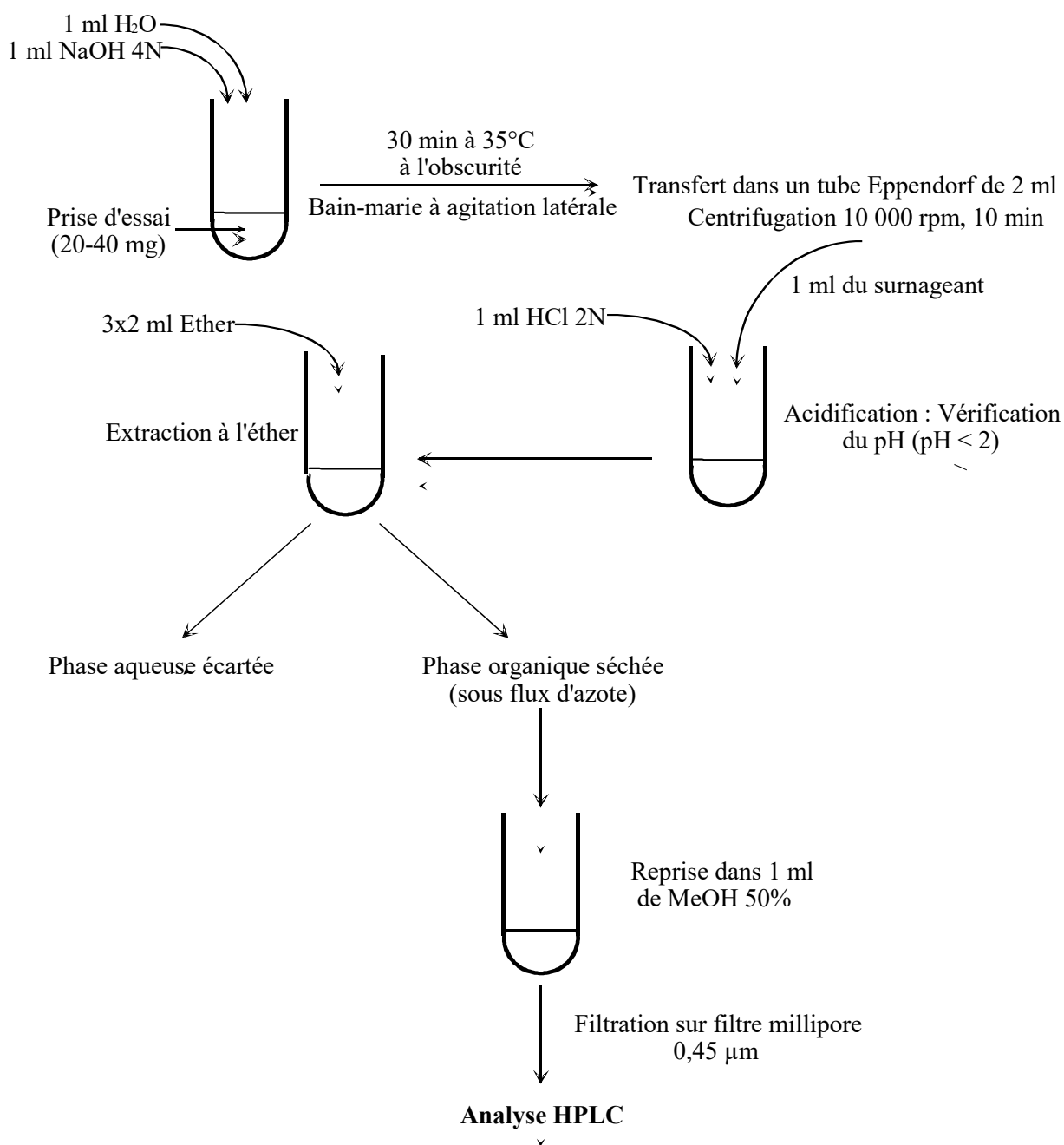
Le produit de réduction du benzoyl-CoA, le cyclohexa-1,5-diène-1-carboxyl CoA, est transformé par des réactions d'hydratation et de déshydrogénation en 2-oxo-6-hydroxycyclohexane-1-carboxy-CoA. Le cycle non aromatique de ce composé cyclique subit une ouverture grâce à une hydrolase (Pelletier et Harwood, 1996) pour donner le composé aliphatique, le 3-hydroxypimélyl-CoA, qui subit une β -oxydation pour donner l'acétyl-CoA et le glutaryl-CoA. Une glutaryl-CoA NAD-spécifique catalyse l'oxydation et la décarboxylation simultanées du glutaryl-CoA en CO₂ et crotonyl-CoA, ce dernier étant dégradé en deux acétyl-CoA (Härtel *et al.*, 1993). L'acétyl-CoA est oxydé via le cycle des acides tricarboxyliques et donne le carbone cellulaire via le cycle glyoxalate chez les bactéries dénitrifiantes. Plusieurs bactéries anaérobies strictes, comme par exemple les bactéries sulfato-réductrices, utilisent des voies oxydatives acétyl-CoA synthase/CO déshydrogénase et la plupart des bactéries fermentaires n'oxydent pas l'acétyl-CoA. L'acétate est finalement excrété comme produit final de dégradation.

MATERIEL ET METHODES

I- : PROTOCOLES ET METHODES D'ANALYSE CHIMIQUE

La chaîne d'expérimentation mise en place au cours de cette formation a permis l'élaboration d'un protocole adapté à l'extraction des structures aromatiques recherchées. L'organigramme simplifié du protocole qui a été adopté est reporté ci-dessous.

Protocole d'extraction élaboré pour ce travail



Le suivi analytique des composés à identifier a été réalisé par analyse HPLC sur un modèle HP 1100 (Hewlett Packard) équipé d'un détecteur multi-longueur d'onde qui permet de suivre les Densités Optiques (DO) à 220, 240, 280, 300 et 320 nm, et d'un système automatique de gestion tridimensionnelle des flacons et d'injection des échantillons (Hewlett Packard).

La séparation est assurée grâce à une colonne C₁₈ Symmetry Waters (4,6mm x 100mm, 3,5µm de taille de particule) maintenue à 30° C. La phase mobile est constituée par un mélange de deux solvants A: (eau mQ + acide acétique 0,05%) et B: (acétonitrile pur) qui sont utilisés avec un débit de 0,70 ml/min selon un gradient défini dans le tableau 2 suivant.

Tableau 2 : Répartition du gradient

Gradient		Temps (min)
Solvant A (%)	Solvant B (%)	
95	5	0
95	5	2
90	10	8
80	20	25
30	70	45
0	100	46
0	100	50
95	5	51
95	5	60

La méthode des standards externes a été utilisée pour l'identification et la détermination quantitative des composés aromatiques à identifier. Les valeurs des temps de rétention et les réponses de chaque substance standard externe ont été obtenues par plusieurs essais de calibration. Les étalons suivants ont été utilisés : acide p-coumarique, acide caféique, acide férulique, acide chlorogénique et acide gallique (HPLC grade Sigma-Aldrich).

II- : PROTOCOLES ET METHODES D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

II-1 : Préparation des milieux de culture anaérobies

Les techniques utilisées sont celles décrites par Hungate (1969), et développées par Miller et Wolin (1974), puis par Balch et Wolfe (1976).

Composition

La composition d'un litre de milieu minimum est la suivante : K_2HPO_4 , 0.2 g ; NH_4Cl , 0.3 g ; NaCl, 1 g ; KCl, 0.5 g ; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.4 g ; $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0.15 g ; Chlorhydrate de Cystéine, 0.5 g ; Extraits de levure, 0.5 g ; solution d'oligoéléments (Widdel et Pfennig, 1981), 1 ml ; solution de résazurine (0.1%), 1 ml. Le pH est ajusté à 7. Il est enrichi à 0.5 % (p/v) avec de l'extrait de levure et des casamino acides pour les cultures en masse.

Les milieux liquides

Les produits entrant dans la composition du milieu liquide sont pesés, puis introduits dans un erlenmeyer contenant de l'eau distillée (75% du volume à préparer) sous agitation magnétique. Après avoir complété le volume du milieu avec de l'eau distillée, le pH est mesuré (pH-mètre modèle PHN 81 ; Tacussel électronique, France) et ajusté à l'aide de solutions de NaOH 10N et 1N.

Les milieux sont ensuite dégazés par ébullition et répartis après refroidissement sous flux d'azote exempt d'oxygène, dans des tubes de Hungate ou des flacons immédiatement fermés à l'aide de bouchons en caoutchouc. La stérilisation de ces tubes et flacons se fait par autoclavage à 110° C pendant 45 minutes, et est précédée d'un second dégazage sous flux d'un mélange de gaz N_2/CO_2 (80 : 20) (v/v) à l'aide d'une rampe de dégazage.

Juste avant inoculation, des solutions anaérobies stériles de tampon $NaHCO_3$ à 10% (p/v) et de réducteur $Na_2S \cdot 9H_2O$ à 2% (w/v) sont rajoutées chacune à 4% (v/v) dans le milieu de culture ; il en est de même pour les solutions de substrats et d'accepteurs d'électrons à 2%

(v/v) respectivement, lorsque ceux-ci ne sont pas directement incorporés dans le milieu de culture.

Les milieux solides

Les milieux solides sont obtenus en distribuant des aliquots de 4 ml de milieux liquides anaérobies dans des tubes de Hungate contenant chacun 0,1g d'agar noble (Laboratoires Difco, Detroit MI, Etats-Unis). Le dégazage, la stérilisation et l'addition des solutions de tampon, réducteur et substrat se font dans les mêmes conditions que celles des milieux liquides.

II-2 : Solutions utilisées pour la préparation des milieux de culture

II-2-1 : La solution d'oligo-éléments de Widdel et Pfennig

Elle est conservée en chambre froide à +4° C.

Elle provient d'une modification de la solution d'oligo-éléments de Widdel et Pfennig (1981) par Imhoff-Stockle et Pfennig (1983). La composition d'un litre de cette solution est la suivante : HCl (37%) ; 6,7 ml ; FeCl₂ . 4H₂O, 1500 mg ; H₃BO₃, 6 mg ; MnCl₂ . 4H₂O, 100 mg ; CoCl₂ . 6H₂O, 190 mg ; ZnCl₂, 70 mg ; NiCl₂ . 6H₂O, 24 mg ; CuCl₂ . 2H₂O, 2 mg ; Na₂MoO₄ . 2H₂O, 36 mg. Le chlorure de fer est préalablement solubilisé dans la solution d'acide chlorhydrique ; cette solution est diluée avec de l'eau distillée avant addition des autres composés.

II-2-2 : La solution d'oligoéléments de Balch et al., 1979

Elle a été décrite par Balch et al. en 1979. Elle contient pour un litre de volume : Acide Nitriloacétique (NTA), 1.5 g ; MgCl₂ . 6H₂O, 2.5 g ; MnCl₂ . 4H₂O, 0.6 g ; NaCl, 1 g ; FeCl₂ . 4H₂O, 100 mg ; CoCl₂ . 6H₂O, 100 mg ; CaCl₂ . 2H₂O, 100 mg ; ZnCl₂, 100 mg ; CuCl₂ . 2H₂O, 10 mg ; AlCl₃, 10 mg ; H₃BO₃, 10 mg ; Na₂MoO₄ . 2H₂O, 10 mg. Le pH est ajusté à 6.5 avec une solution de KOH 10 N.

II-2-3 : La solution de vitamines de Balch *et al.*, 1977.

La composition de cette solution est la suivante (pour 100 ml) : 25 mg acide *p*-aminobenzoïque, 10 mg *d*-biotine, 0.5 mg cyanocobalamine, 25 mg thiamine-HCl, 25 mg riboflavine, 50 mg pyridoxal-HCl, 25 mg DL-pantothénate de calcium, 25 mg acide nicotinique (niacine), 10 mg acide folique et 25 mg acide lipoïque. La solution de vitamines de Balch *et al.*, (1977) est stérilisée par filtration sur un filtre Millipore (porosité : 0,22 µm) et est utilisée diluée 50 fois. 0,1 ml de cette solution diluée est ajouté dans 5 ml du milieu de culture afin de tester l'exigence en vitamines des souches.

II-3 : Solutions de substrats carbonés

II-3-1 : Solutions mères de composés aromatiques

Tous les composés aromatiques ont été préparés en anaérobiose, stérilisés par filtration (filtre Millipore, porosité : 0,22µm), et conservés en flacons pénicilline sous N₂ à température ambiante et à l'abri de la lumière (flacons recouverts de papier aluminium). Les composés aromatiques acides ont été neutralisés à pH 7 avec NaOH. Les solutions mères sont préparées à une concentration finale de 250mM. Les aromatiques sont ajoutés avant inoculation à 5mM. Les aromatiques suivants ont été préparés : benzoate, acides benzoïques hydroxylés [3- et 4-hydroxybenzoate, 3,4 dihydroxybenzoate (acide protocatéchuate), 3,5-, 2,4-, 2,6-dihydroxybenzoates (α -, β -, γ - resorcyates), 2,4,6-trihydroxybenzoate (phloroglucinolcarboxylate) and 3,4,5-trihydroxybenzoate (gallate)]; acides benzoïques méthoxylés [4-méthoxybenzoate (*p*-anisate), 2,4-, 2,6-, 3,5-diméthoxybenzoates, 3,4-diméthoxybenzoates (vétrate), et 3,4,5-triméthoxybenzoate]; acides benzoïques hydroxylés/méthoxylés (4-hydroxy-3-méthoxybenzoate (vanillate), 3-hydroxy-4-méthoxybenzoate (isovanillate) et 4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoate (syringate)]; 3,4-diméthylbenzoate; acides cinnamiques [cinnamate, *o*-, *m*, *p*-hydroxycinnamates (coumarates), 3,4-dihydroxycinnamate (caféate), *o*-, *m*, *p*-méthoxycinnamates, 3,4,5-triméthoxycinnamates (TMC), 4-hydroxy-3-méthoxycinnamate (férulate), 3-hydroxy-4-méthoxycinnamate (isoférulate) et *p*-méthylcinnamate]; acides phénylpropioniques [3-phénylpropionate (hydroxycinnamate), et 3,4-dihydroxyphénylpropionate (hydrocaféate)]; acides phénylacétiques [phénylacetate, *p*-hydroxyphénylacetate, 2,5-, 3,4-dihydroxyphénylacetates, *p*-méthoxyphénylacetate, et 3,4-diméthoxyphénylacetate]; cinnamyl alcool, cinnamaldéhyde,

styrène, estragole (4-allylanisole), eugénol (4-allyl-2-méthoxyphénol), gallate méthyl ester, acide tannique et phénols non-acides [phénol, 2-hydroxyphénol (catéchol), 3,4,5-trihydroxybenzène (pyrogallol), 2,4,6-trihydroxybenzène (phloroglucinol), 2-méthoxyphénol (guaïacol), *p*-hydroxyphényléthanol (1-4-tyrosol)].

II-3-2 : Solutions mères de donneurs et d'accepteurs d'électrons

Les substrats carbonés et les accepteurs d'électrons sont pesés dans des flacons propres, puis des quantités adéquates d'eau distillée préalablement désaérée par ébullition sous flux d'azote y sont rajoutées ; les composés sous forme acide sont neutralisés avec des quantités équivalentes de NaOH. Après homogénéisation des solutions, les flacons bouchés et scellés sont dégazés sous flux d'azote et stérilisés à 110° C pendant 45 minutes, exception faite des sucres et des acides aminés qui sont stérilisés par filtration (Acrodisc 0.22 µm, Laboratoire Gelman, Ann Arbor MI, Etats-Unis).

Afin d'obtenir la concentration finale (C_f) désirée, les concentrations des solutions mères (C_{SM}) sont calculées de telle sorte que le volume à injecter (V_i) dans les tubes varie entre 0.05 et 0.5 ml : $C_{SM} = (V_{MC} \times C_f) / V_i$, V_{MC} étant le volume final du milieu de culture inoculé. En conséquence, les solutions d'acides gras et d'accepteurs d'électrons ont été préparées à 1 M, les sucres, les alcools et les acides aminés à 0.5 M, les dérivés peptidiques à 10% (p/v) pour la bactopectone (hydrolysate enzymatique de protéines), le biotrypcase (hydrolysate pancréatique de caséine), l'extrait de levure (extrait de cellules de levure autolysées) d'une part, et d'autre part à 5% (p/v) pour les casamino acides (Hydrolysate acide de caséine). Tous les flacons sont conservés à température ambiante.

Les polymères organiques et les composés insolubles comme la cellulose, le carboxyméthylcellulose, l'amidon, le xylane, la gélatine, et le soufre élémentaire sont directement pesés dans les tubes avant la distribution et la stérilisation du milieu, de telle sorte que leur concentration finale n'excède pas 5 g/l.

Les substrats gazeux tels que l'hydrogène et le dioxyde de carbone sont stérilement injectés dans la phase gazeuse des tubes ou flacons à une pression de 2 Bars, juste après l'inoculation. Les tubes sont incubés horizontalement afin d'augmenter l'interface entre le milieu liquide et la phase gazeuse.

III- : PROTOCOLE D'ENRICHISSEMENT ET D'ISOLEMENT DES SOUCHES BACTERIENNES

III-1 : Le matériel biologique

III-1-1 : Origine des échantillons

Le tourteau de karité (co-produit du beurre de karité, utilisé essentiellement en cosmétologie) représente un sous-produit solide provenant des industries agroalimentaires de plusieurs pays d'Afrique.

L'arbre du karité n'est disponible qu'en Afrique, du Sud du Sénégal au nord du Bénin, mais surtout au Burkina Faso et au Mali. Le tourteau de karité, résidu solide très riche en structures aromatiques de type polyphénols et tannins est massivement rejeté dans l'environnement. Bien que présentant d'énormes potentialités alimentaires et énergétiques (protéines: 14,22% - glucides: 24,56%), ce substrat est systématiquement déversé dans la nature. Sa richesse en lipides, notamment en acides gras insaturés, et surtout en composés phénoliques où les tanins représentent 20 %, en fait un déchet polluant de premier plan.

Pour ce sous-produit oléagineux, trois types différents de sous-produits du karité peuvent être obtenus :

- tourteaux de coque
- tourteaux d'amande
- déchets issus de la purification du beurre de karité

Les noix brutes préalablement séchées sont bouillies à grand feu dans une marmite ou dans un demi-fût, pendant 20 min en fonction de la contenance. Cette opération facilite la séparation de l'amande et de la coque. Les femmes utilisent le pilon et le mortier pour casser les noix et se servent d'un van pour séparer les amandes de karité de leur enveloppe, ainsi sont obtenus les tourteaux de coque.

Les tourteaux d'amande sont obtenus après extraction de la « crème » de karité brut par un système de barattage suivi d'un lavage.

Les déchets issus de la purification sont les résidus obtenus après traitement. Ils sont obtenus après la cuisson du beurre de karité brut, obtenu lors de la première extraction pour l'enlèvement des impuretés.

La « crème » est d'abord bouillie à grand feu dans une marmite. Ensuite l'intensité du feu est diminuée. La cuisson continue jusqu'à ce qu'une mousse blanche apparaisse.

L'absence d'exploitant industriel en place pose le problème du stockage du résidu car les femmes fabricantes rejettent les tourteaux après l'extraction du beurre.

III-2 : Origine des souches

III-2-1 : Les souches de collection

Il s'agit de souches pures de microorganismes, référencées et soigneusement gardées dans des institutions spécialisées telles que la « Collection de l'Institut Pasteur » (CIP, Paris, France), la « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen GmbH » (DSMZ, Braunschweig, Allemagne) et de l'« American Type Culture Collection » (ATCC, Manassas VI, Etats-Unis). Elles sont mises en vente sous forme généralement lyophilisée (parfois sous forme de cultures liquides) et doivent être resuspendues dans un volume adéquat de milieu de culture préconisé par ces institutions avant d'être repiquées sur le milieu de culture utilisé en routine.

III-2-2 : Conservation des souches

Les souches sont repiquées chaque mois et les cultures en phase exponentielle de croissance sont placées à +4° C en chambre froide. Elles sont également conservées par congélation à - 80° C : à cet effet, des cultures en phase exponentielle de croissance sont injectées à 90% (v/v) dans une solution stérile de glycérol à 20% dans l'eau.

III-3 : Les techniques d'enrichissement microbiologique et aromatique

Pour les tourteaux de karité, un enrichissement en présence des aromatiques identifiés en son sein a été réalisé.

L'enrichissement a été fait en milieu liquide dans des tubes de milieux de culture anaérobie. Pour chaque tube de 5ml ; 0,2ml de tampon (NaHCO_3 10%), 0,2ml de réducteur ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 2%) sont ajoutés, puis l'aromatique concerné a été rajouté à 5mM. Pour chaque

aromatique, deux tubes de milieux sont préparés : un qui ne contient que l'aromatique et un autre où en présence de l'aromatique, les tourteaux de karité sont ajoutés pour environ 15mg pour un tube de 5ml de culture.

Un milieu de culture témoin tamponné et réduit mais ne contenant pas d'aromatique est réalisé pour chaque enrichissement.

Les tubes sont ensuite placés dans une étuve thermostatée à 35° C.

Afin de suivre la dégradation des composés aromatiques, une première analyse HPLC a été effectuée au temps T0 (Temps initial) et une autre est réalisée au bout de trois semaines.

III-4 : Les techniques d'isolement en conditions anaérobies

Les isollements sont réalisés par la méthode des « roll-tubes » (Hungate, 1969). Des dilutions en cascades de facteur 10 sont réalisées en milieu liquide à partir d'un tube d'enrichissement positif et les cultures sont incubées jusqu'à l'apparition d'une turbidité stable et visible à l'œil nu ; cette opération est répétée avec la dernière dilution positive, jusqu'à la troisième série de dilutions dont chaque tube sert d'inoculum pour les roll-tubes. Les milieux solides sont chauffés dans un four à micro-ondes pour faire fondre l'agar, puis refroidis à 50° C dans un bain-marie thermostaté afin de maintenir la gélose en surfusion. Ils sont inoculés, placés horizontalement sur un tour (« tube spinner », Bellco Glass Inc, Vineland, Etats-Unis), puis mis en rotation afin de répartir de manière homogène par force centrifuge, le milieu gélosé sur toute la surface interne des tubes; ceux-ci sont refroidis pendant leur rotation avec de la glace et les cellules bactériennes sont ainsi dispersées dans la gélose solidifiée.

Après incubation, le prélèvement d'une colonie isolée se fait dans une « chambre anaérobie » (Laboratoires Plas, Lansing MI, Etats-Unis) purgée et remplie d'une atmosphère d'hydrogène : l'extrémité légèrement recourbée d'une pipette Pasteur stérile est appliquée sur la colonie à prélever ; cette dernière est aspirée à l'intérieur de la pipette grâce à une propipette préalablement adaptée à l'extrémité supérieure. La colonie est expulsée en milieu liquide puis le tube est refermé et vigoureusement agité afin de disloquer la colonie et les particules d'agar. La suspension ainsi réalisée sert de point de départ pour une nouvelle culture sur milieux solides.

Afin d'obtenir une souche pure, ce procédé est répété jusqu'à ce que l'observation microscopique des tubes de dilution ne présente qu'un seul morphotype bactérien.

Tests de confirmation de la dégradation des composés aromatiques par les souches isolées

La capacité des souches à dégrader le composé aromatique sur lequel elle a été isolée et les autres composés aromatiques est confirmée en suivant le même protocole que précédemment sauf que là le sous-produit n'est pas rajouté au milieu de culture. En lieu et place, 0,5ml d'inoculum de la souche à tester est rajouté.

Le suivi de la dégradation est réalisé à T0 (initial), T1 (1 jour), T2 (2 jours), T3 (1 semaine), T4 (2 semaines), et TF (final = 1 mois). Pour chaque temps, 0,5ml est prélevé des tubes de culture pour les besoins de l'analyse par HPLC.

IV- : CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE DES SOUCHES

IV-1 : Etude de la morphologie

IV-1-1 : Microscopie optique

❖ Appareillage

- Microscope à contraste de phase : Nikon Optiphot (Nikon, Tokyo, Japon)
- Appareil photo Nikon FX-35

❖ Conditions opératoires

La forme des cellules, leur mobilité, l'éventuelle présence et la position des spores sont observées au microscope optique à contraste de phase. La taille des cellules est mesurée sur des photographies prises au microscope : les cellules sont concentrées par centrifugation à 12000 rpm pendant 5 minutes (Centrifugeuse Biofuge 13, Heraeus SEPATECH, LesUlis, France) et le culot obtenu est resuspendu dans 100 µl de surnageant. Une goutte de ce mélange est montée entre lame et lamelle, puis étalée en faisant glisser la lamelle sur la

longueur de la lame : la préparation ainsi faite empêche la mobilité des cellules et les mouvements browniens.

IV-1-2 : Microscopie électronique

Les préparations et photographies des coupes cellulaires ultraminesces ont été réalisées par Le Dr. P. Thomas dans le laboratoire de Biologie cellulaire de l'Université de la Méditerranée (Marseille).

- Coloration négative

L'observation des cellules est effectuée après coloration par une solution d'acide phosphotungstique à 1%.

- Préparation des coupes et coloration

Les cellules sont fixées pendant 1 heure avec une solution de glutaraldéhyde à 3 % (p/v), préparée dans une solution tampon de cacodylate de sodium (pH 6), contenant du saccharose à 0.7 M. Elles sont ensuite lavées dans du tampon de cacodylate de sodium, mises en présence de 2% d'agarose et colorées avec 4% d'acétate d'uranyl. Le bloc d'agarose contenant les cellules est sectionné en petits cubes. Les coupes sont alors contrastées avec une solution d'acétate d'uranyl à 20% pendant 20 min, puis avec du citrate de plomb à 2% pendant 10 min. Les microphotographies sont effectuées à l'aide d'un microscope électronique Hitachi H600.

IV-2 : Etude des conditions physiologiques de croissance

La détermination des conditions optimales de croissance est basée sur le calcul de la vitesse spécifique de croissance, à partir des mesures périodiques de la densité optique (DO) des cultures dans diverses conditions physico-chimiques (température, pH et salinité).

On appelle vitesse spécifique $\mu_{\max}$ (exprimée en h^{-1}), la vitesse mesurée pendant la phase exponentielle de croissance ; elle correspond à la pente de la droite : $\text{Log}(DO_f) = \mu_{\max}(t_f$

- t_i) + $\text{Log}(\text{DO}_i)$, DO_i et DO_f étant respectivement les densités optiques au début et à la fin de la phase exponentielle tandis que $t_f - t_i$ représente la durée de celle-ci.

Les mesures sont effectuées jusqu'à la stabilisation de la turbidité des tubes inoculés à 10% avec une culture en phase exponentielle de croissance, réalisée dans les mêmes conditions ; la moyenne de cinq échantillons est retenue pour décrire les profils physiologiques (gammes et optima de croissance).

IV-2-1 : Influence de la température

Les milieux de culture fraîchement inoculés sont incubés dans des bains-marie thermostatés à différentes températures allant de 5 à 55 °C avec un intervalle de 5 °C.

IV-2-2 : Influence du pH

En conditions aérobies, le pH du milieu est directement ajusté avec des solutions 1N et 5N de NaOH ou d'HCl, puis distribué dans les tubes de culture destinés à la stérilisation.

En conditions anaérobies, le pH est ajusté dans des flacons contenant 50 ml de milieu de culture stérile, tamponné et réduit. Des aliquots de 5 ml sont ensuite répartis dans des tubes de Hungate stériles, garantissant ainsi l'uniformité du pH pour chaque test. Les cultures sont incubées à la température optimale précédemment déterminée avec une gamme de pH variant de 0.5 entre 4 et 10.

IV-2-3 : Influence de la concentration en NaCl

Le milieu de culture dépourvu de NaCl est réparti dans des flacons contenant des quantités variables de sel pour des concentrations excédant 10 g.l⁻¹, puis le milieu salé est ensuite transféré dans des tubes de culture. Pour des concentrations plus basses, des volumes appropriés d'une solution mère stérile de NaCl à 10% sont injectées dans les tubes juste avant l'inoculation. Les cultures sont incubées dans les conditions optimales de pH et de température précédemment déterminées.

IV-2-4 : Test de résistance à la chaleur

Des cultures bactériennes en phase pré-stationnaire de croissance sont incubées au bain-marie respectivement à 100, 90, 80 et 70 °C. Chaque culture est repiquée toutes les 5

minutes dans un milieu neuf et une éventuelle croissance après incubation à la température optimale témoigne de l'existence d'une forme de résistance à la chaleur ; les spores sont recherchées au microscope optique sur des cultures en phase stationnaire.

IV-2-5 : Tests de pureté

Les souches anaérobies sont repiquées en milieu liquide enrichi en dérivés peptidiques à 0,25 % et en glucose à 20 mM. Après incubation, la pureté des cultures est contrôlée au microscope optique. Les souches anaérobies sont inoculées en gélose profonde (Pfennig et *al.*, 1981), dans un milieu anaérobie contenant (pour un litre) : Peptone, 4 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g ; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2(\text{NH}_4)_2$, 0.5 g ; Na_2SO_4 , 2 g. Le pH est ajusté à 7.3, le milieu est porté à ébullition sous flux d'azote, réparti à chaud dans des tubes de Hungate contenant 0,1 g d'agar, avant d'être autoclavé à 110° C pendant 45 minutes. Le glucose est injecté dans les tubes maintenus en surfusion à une concentration finale de 10 g/l.

IV-3 : Etude des propriétés métaboliques

Chaque test métabolique est réalisé sur trois tubes de milieu de culture inoculés à 10 % et incubés en conditions physiologiques optimales. L'activité métabolique est attestée par la disparition du substrat corrélée à la production de biomasse ou à l'apparition de métabolites secondaires.

IV-3-1 : Les accepteurs d'électrons

Les accepteurs exogènes d'électrons sont testés à la concentration finale de 20 mM dans le milieu de culture contenant le substrat privilégié, sauf pour le nitrite et le sulfite, testés à 2 mM et pour le soufre élémentaire utilisé par ajout direct en poudre à 2% dans le tube concerné.

IV-3-2 : Les donneurs d'électrons

Les acides gras volatils sont testés à une concentration finale de 20 mM, les hydrates de carbone, les alcools et les acides aminés à 10 mM, et les composés aromatiques à 5 mM, en présence ou en l'absence d'accepteur d'électrons. Ces concentrations sont doublées lorsque le substrat est un mélange racémique.

IV-3-3 : Les galeries Api

Une caractérisation biochimique complémentaire des souches a été effectuée en utilisant des galeries Api 20A, API 50CH et en suivant les instructions du fabricant (BioMérieux, La Balme-les-Grottes, France).

V- : CARACTERISATION MOLECULAIRE DES SOUCHES

V-1 : Extraction et purification de l'ADN génomique

Les cellules sont récoltées par centrifugation de 25 ml de culture. L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit « Wizard Genomic DNA extraction kit » (Promega) selon le protocole fourni. Ce protocole d'extraction est basé sur le principe de la lyse alcaline. Après extraction, l'ADN, resuspendu dans 50 µl de Tris-HCl 10mM, pH 8,5, a été conservé à -20° C.

La pureté de l'ADN obtenu est contrôlée par migration électrophorétique dans un gel d'agarose (1% w/v).

V-2 : Electrophorèse sur gel d'Agarose

L'électrophorèse permet de séparer des fragments d'ADN sous l'action d'un champ électrique.

❖ Appareillage

- i-Mupid (Eurogentec)

❖ Gel et Réactifs

- Gel d'agarose (Sigma) à 1% dans du tampon TAE 1X
- Solution stérile (20 min à 120 °C) de tampon TAE 1X (4,84 g Tris Base ; 1,142 ml Acide Acétique Glacial ; 0,2 ml EDTA 0,5 M/pH 8 ; qsp 1000 ml Eau MilliQ)
- Marqueur de poids moléculaire 200 pb-10000 pb : Smart Ladder (Eurogentec).

❖ Conditions opératoires

A pH neutre, les fragments d'ADN sont chargés négativement et migrent vers l'anode. Le produit PCR est déposé sur le gel, puis soumis à l'action d'un champ électrique de 100 mV pendant 30 minutes. Grâce à la présence dans le gel, du Bromure d'Ethidium (BET) qui s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence orange de 254 à 365 nm, les bandes de migration sont visualisées sous un rayonnement UV à l'aide d'un transilluminateur (TEX-35 M.).

V-3 : Réaction d'amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 16S (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne, connue sous le nom de « PCR » (Polymerase Chain Reaction) qui a été initialement décrite par Mullis et al. en 1985, puis développée par H. A. Herlich, permet d'amplifier une région spécifique de l'ADN génomique.

❖ Appareillage

- Perkin Elmer Applied Biosystems : GeneAmp PCR system 2400
- Mastercycler 96 Gradient Eppendorf.

❖ Mélange réactionnel (impérativement stérile)

▪ Tampon (10x)	5 µl
▪ dNTPs (10 mM)	0,5 µl
▪ MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
▪ Matrice d'ADN génomique	50 ng
▪ Amorce n°1 (50 pmol/µl)	0,5 µl
▪ Amorce n°2 (50 pmol/µl)	0,5 µl
▪ <i>Taq</i> DNA polymérase (3U/µl)	0,2 µl
▪ H ₂ O distillée stérile (qsp)	50 µl

❖ Conditions opératoires

La réaction d'amplification consiste en une première étape de dénaturation de l'ADN génomique suivi par une succession d'étapes de dénaturation, appariement et élongation, au cours desquels le fragment d'intérêt est multiplié un très grand nombre de fois sous l'action de la polymérase. Au cours de l'appariement, les sondes oligonucléotidiques viennent se fixer spécifiquement au niveau du gène codant pour l'ARNr 16S. La *Taq* DNA polymérase, isolée de la bactérie *Thermus aquaticus*, en présence des quatre dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) va permettre une élongation des amorces fixées. La réaction est terminée par une dernière étape dont le but est de terminer toutes les élongations en cours. Le programme est détaillé dans le tableau 3 suivant.

Tableau 3 : Programme d'amplification de l'ADNr16S

Caractéristique de l'étape	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation	95° C	2 min	1
Dénaturation	95° C	30 sec	30
Appariement	55° C	30 sec	
Elongation	72° C	2 min	
Elongation	72° C	5 min	1

V-4 : Clonage et séquençage du fragment amplifié

Après PCR, 5µl du mélange sont déposés sur un gel d'agarose (1% w/v) afin de contrôler la spécificité de l'amplification. Dans les cas étudiés, une seule bande a pu être détectée sur gel. L'ADN amplifié a alors été purifié directement à partir du mélange PCR à l'aide du kit « Nucleospin DNA purification Kit » (Macherey-Nagel) selon le protocole décrit. Le fragment purifié a été resuspendu dans 25µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8,5.

Le fragment obtenu par PCR a été cloné dans le vecteur pGEM-T-easy (Promega) selon le protocole décrit (3µl d'insert, 5 µl de tampon 2X, 1 µl de plasmide à 50 ng/µl et 1µl de T4 DNA ligase à 3,5 U/µl). Puis, 5 µl de ce mélange de ligature ont été utilisés pour

transformer 200 µl de cellules d'*Escherichia coli* DH5α rendues chimiquement compétentes par traitement au chlorure de calcium. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 30 min dans la glace, puis 45 sec à 42° C et enfin 2 min dans la glace. La résistance à l'ampicilline, présente sur le vecteur, s'exprime au cours d'une étape d'expression phénotypique au cours de laquelle les cellules sont incubées avec 800µl de milieu LB pendant 1h à 37° C sous une agitation de 150 rpm.

La sélection des clones recombinants s'effectue sur la nuit en étalant 200 µl de ce mélange sur des boîtes LB+Agar contenant 100µg/ml d'ampicilline, 120µg/ml d'IPTG et 40 µg/ml de X-Gal. La sélection des clones dérivés du pGEM se fait par le test blanc/bleu. Ce vecteur possède le gène *lacZ*, codant pour le peptide α de la β-galactosidase qui n'est pas synthétisé par la souche d'*E. coli* DH5α. Cette enzyme est capable de dégrader le substrat X-Gal (dérivé du galactose possédant un groupement chromophore bleu, X) en présence d'un inducteur du promoteur du gène *lacZ*, l'IPTG (Isopropyl-β,D-thiogalactoside). Le groupement chromophore est alors libéré, et les colonies sont bleues. Les fragments sont clonés à l'intérieur du gène *lacZ*. Si le plasmide a effectivement intégré l'insert, la séquence codante du gène est interrompue et le peptide α n'est plus synthétisé. Il n'y a donc plus de dégradation du substrat. Les clones qui nous intéressent sur milieu LB-Amp-Xgal-IPTG sont donc les clones blancs.

Le plasmide issu du clone sélectionné est purifié par une technique de lyse alcaline à l'aide du kit « Wizard Miniprep DNA purification kit » (Promega) selon le protocole fourni. Le fragment inséré dans ce plasmide a ensuite été séquencé à l'aide des oligonucleotides T7 et Sp6 présents sur le plasmide de chaque côté du site d'insertion (Génome Express).

V-5 : Séquençage de l'ADNr-16S

La détermination de la séquence de l'ADNr 16S a été réalisée par Génome Express, Grenoble (France).

La réaction de séquençage est effectuée par amplification PCR dans un volume final de 20 µl en utilisant 100 ng de produits PCR (ou 500 ng de plasmides), 5 pmoles de primer et 8 µl de « BigDyeTerminators premix » selon le protocole fourni par Applied Biosystems. Après une première étape de chauffage à 96° C pendant 3 min, la réaction s'est poursuivie comme suit : 30 cycles à 96° C pendant 30 sec, 55° C pendant 30 sec et 60° C pendant 4 min (9700 thermal cycler Perkin Elmer). L'excès de « BigDyeTerminators » a été éliminé à l'aide

de colonnes d'exclusion. Les échantillons ont été séchés dans une centrifugeuse sous vide et dissous dans 1,6 µl de tampon Formamide déionisée, EDTA pH 8,0 (5 : 1) (v/v). Les échantillons ont été chargés ensuite sur le séquenceur Applied Biosystems 375XL et la migration s'est effectuée pendant 12 heures dans un gel d'acrylamide contenant 4,5 % de dénaturant.

V-6 : Comparaison des profils de restriction RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

La RFLP consiste à digérer les fragments PCR correspondants aux ADNr 16S par des enzymes de restriction et de comparer les profils de restriction obtenus sur un gel d'agarose. Les enzymes de restriction suivantes ont été utilisées : *AluI*, *Sau3A*, *HaeIII*, *HpaII*, *RsaI*. La composition du mélange réactionnel est le suivant :

▪ ADNr 16S	5µl
▪ enzyme de restriction à 10U/µl	1µl
▪ Tampon (10x)	1µl
▪ H ₂ O distillée stérile (qsp)	10µl

Le mélange réactionnel est incubé pendant 1 heure 30 min à la température adéquate d'activité. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%.

V-7 : Analyse phylogénétique

L'analyse phylogénétique, réalisée par comparaison de la séquence obtenue avec des séquences d'ADN codant pour d'autres sous-unités 16S de l'ARN ribosomal (ADNr 16S) a été réalisée.

Les résultats de la séquence ont été importés dans BioEdit v5.0.9 (Hall, 1999) et la séquence complète du fragment a été reconstituée. Cette séquence a été alignée à l'aide du programme d'alignement de séquence du RDP (Ribosomal database Project) (Maidak et al., 2001). La séquence consensus a été manuellement ajustée pour correspondre au modèle des structures secondaires de l'ADNr 16S (Winker & Woese, 1991).

Une recherche sur BLAST (blastn, non redondant) (Altschul et al., 1997) avec la séquence complète par l'intermédiaire de GenBank (Benson, 1999) a permis d'identifier

l'organisme le plus proche. Les séquences utilisées dans l'analyse phylogénétique proviennent de RDP et de GenBank. Les positions dans la séquence et les ambiguïtés d'alignement ont été omises, et les distances d'évolution au niveau des paires ont été calculées en utilisant la méthode de Jukes et Cantor (1969). Les dendrogrammes ont été construits en utilisant la méthode du Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987). La confiance dans la topologie de l'arbre a été déterminée en utilisant des arbres qui sont 100 Bootstrapped (Felstein, 1985) en utilisant le programme TREECON.

V-8 : Détermination du G + C % de l'ADN génomique

Les cellules sont cassées à l'aide d'une presse de French et l'ADN, extrait et purifié sur une résine d'hydroxyapatite selon la méthode de Cashion et al. (1977). Il est ensuite hydrolysé par la nucléase P1, déphosphorylé par une phosphatase alcaline selon la méthode de Mesbah et al. (1989). Les acides nucléiques sont dosés par HPLC, après étalonnage de l'appareil avec des solutions standard de désoxy-adénosine monophosphate (dAMP), de désoxy-thymine monophosphate (dTMP), de désoxy-guanosine monophosphate (dGMP), de désoxy-cytosine monophosphate (dCMP) selon la méthode de Mesbah et al. (1989). L'étalonnage est contrôlé avec un hydrolysate de l'ADN du phage λ dont le G+C% est de 49.9%.

Pour ces travaux de thèse, le pourcentage en guanine et cytosine de l'ADN génomique a été réalisé par la DSMZ.

V-9 : Hybridation ADN/ADN

L'ADN génomique est isolé par chromatographie sur une colonne d'hydroxyapatite selon la méthode de Cashion *et al.* (1977). L'hybridation ADN-ADN a été réalisée selon la méthode de De Ley et al. (1970), avec les modifications décrites par Huss *et al.* (1983) et Escara et Hutton (1980), en utilisant un spectrophotomètre (Gilford System model 2600) équipé d'un thermoprogrammeur et d'un enregistreur (Gilford model 2527-R). Les taux de renaturation ont été calculés en utilisant le programme TRANSFER.BAS (Jahnke, 1992). Pour ces travaux de thèse, les analyses ont été effectuées par la DSMZ.

VI- DETERMINATION DU PROFIL DES ACIDES GRAS

La composition en acides gras a été déterminée au service de la DSMZ ((Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Allemagne) en utilisant 2610 ml de culture liquide (Sasser, 1990). La composition en acides gras cellulaires est déterminée sur le milieu anaérobie auquel l'extrait de levure est ajouté (0,5%) et les cultures ont été arrêtées à la fin de la phase exponentielle de culture et envoyées au DSMZ pour l'analyse des acides gras. Les acides gras ont été extraits en utilisant la méthode de Miller (1982) modifiée par Kuykendall *et al.*, 1988 et le profil d'acides gras cellulaires a été analysé par Chromatographie en Phase Gazeuse en utilisant le système d'identification microbienne (MIDI).

VII- : TECHNIQUES ANALYTIQUES

VII-1 : Détermination de la biomasse cellulaire

❖ Appareillage

- Spectrophotomètre Shimadzu UV-160 A (shimadzu Co., Kyoto, Japon)

❖ Conditions opératoires

La croissance est suivie par mesure de la densité optique des cultures au spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 580 nm. Pour les expériences menées en tubes de Hungate, les mesures sont faites directement en insérant les tubes dans le spectrophotomètre, évitant ainsi le virage au rose du milieu de culture.

VII-2 : Dosage des sulfures

La méthode utilisée est celle décrite par Cord-Ruwisch (1985).

❖ Appareillage

- Spectrophotomètre Shimadzu UV-160 A (shimadzu Co., Kyoto, Japon)

❖ Conditions opératoires

- Réactif : 4 ml d'une solution [HCl 50 mM-CuSO₄ 5 mM]
- Echantillon : 0.1 ml de suspension bactérienne

La densité optique du mélange est mesurée très rapidement à 480 nm : en milieu acide, les sulfures solubles réagissent avec le sulfate de cuivre pour former une solution colloïdale de sulfure de cuivre ($\text{CuSO}_4 + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{CuS} + \text{H}_2\text{SO}_4$) dont la coloration brune instable est proportionnelle à la concentration en ions S^{2-} .

VII-3 : Dosage des acides organiques, sucres et alcools

La technique utilisée est la chromatographie à haute pression en phase liquide (HPLC).

❖ Appareillage

- Pompe Spectra série P 100 (Thermo Separation Products, Californie, USA).
- Vanne d'injection : Rhéodyne 7125, munie d'une boucle d'injection de 20 μl
- Colonne ORH 801 (Interaction Chemicals, Inc., Mountain View, Ca., USA)
- Four Croco-Cil 970
- Détecteur réfractomètre différentiel RID 6A (Shimadzu CO., Kyoto, Japon)
- Intégrateur Chromatopac C-R6A (Shimadzu CO., Kyoto, Japon)

❖ Conditions opératoires

- Eluant : solution H₂SO₄ 0.01 N soumise à une sonication de 3 minutes
- Débit de l'éluant : 0,6 ml/min
- Température de la colonne : 35° C

L'appareil est étalonné à l'aide de solutions standard permettant de définir pour chaque produit à doser, le temps de rétention ainsi que la corrélation entre la surface d'intégration et la concentration.

Avant d'être injectés, les échantillons biologiques sont centrifugés à 13000 rpm pendant 15 minutes (biofuge 13, Heräeus) ; le surnageant est dilué à 40% dans l'éluant afin de le rendre compatible avec les gammes étalons.

VII-4 : Dosage des composés aromatiques

Les composés aromatiques sont analysés et dosés par chromatographie haute pression en phase liquide (HPLC).

❖ Appareillage

- Chromatographe (Hewlett Packard) model 1100
- Colonne C₁₈ SYMMETRY (Waters Chromatography), 4,6x100 mm, taille de particule 3,5 µm
- Ordinateur (Hewlett Packard) équipé d'un logiciel Chemstation

❖ Conditions opératoires

- Débit de la pompe binaire : 0,75 ml/min
- Température de la colonne : 30° C
- Longueurs d'onde : 240, 260, 280, 300, 320
- Volume injecté : 25 µl

Une phase mobile formée de deux solvants, eau mQ + acide acétique à 0,05 % et de l'acétonitrile pur. La concentration d'acétonitrile est d'abord maintenue à 5 % pendant 5 min ; un gradient de concentration est ensuite appliqué jusqu'à atteindre 45 % après 25 min ; un lavage avec de l'acétonitrile à 100 % est réalisé pendant 5 min après chaque analyse. La colonne est enfin ré-équilibrée avec de l'acétonitrile à 5 % pendant au moins 5 min, avant l'injection suivante.

L'appareil est étalonné à l'aide de solutions standard permettant de définir pour chaque produit à doser, le temps de rétention ainsi que la corrélation entre la surface d'intégration et la concentration.

RESULTATS ET DISCUSSION

I- : ANALYSE CHIMIQUE

Les tourteaux de karité montrent la présence majoritaire d'un dérivé benzoïque généralement issu de structures tanniques: l'acide gallique.

Les valeurs contenues dans le tableau 4 ci-dessous représentent les moyennes de trois analyses.

Tableau 4 : Pourcentage des composés monoaromatiques identifiés dans les sous-produits

	Acide <i>p</i>-Coumarique (g/100g produit sec)	Acide Férulique (g/100g produit sec)	Acide Gallique (g/100g produit sec)
Tourteaux de karité	0	0	1,30

Des tests d'extraction complémentaires au méthanol pur (99,8%), ont été réalisés et ont donné des bilans et rendements d'extraction différents selon les sous-produits testés.

Pour les tourteaux de karité, on disposait de trois échantillons :

- tourteaux de coque
- tourteaux d'amande
- déchets issus de la purification du beurre de karité

Les tourteaux de coque sont plus faciles à valoriser comme combustibles, les déchets issus de la purification doivent subir une extraction à l'hexane pour l'enlèvement du beurre résiduel afin d'être utilisés comme les tourteaux d'amande. L'extraction directe au méthanol pur pour ces tourteaux d'amande ne permet pas la libération des composés aromatiques présents. Cependant cette extraction alcoolique présente un intérêt particulier, car après cette étape, une hydrolyse de ce sous-produit, suivie d'une extraction alcoolique du résidu solide

obtenu devient plus efficace et donne de meilleurs rendements pour les structures aromatiques recherchées.

Les résultats obtenus par l'analyse chimique ont permis d'initier la bio-transformation microbienne des structures aromatiques les plus porteuses pour la production de molécules à haute valeur ajoutée.

II- : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

II-1 : Résultats obtenus sur tourteaux de karité

II-1-1 : Enrichissement sur tourteaux de karité

Compte tenu des résultats obtenus sur tourteaux de karité grâce à l'analyse chimique, où on a noté la forte présence d'acide gallique. Les enrichissements sur ce sous-produit ont été orientés dans la recherche de bactéries ayant des activités de types estérases, dans le but de pouvoir libérer ce précurseur aromatique qui est l'acide gallique, reconnu pour son pouvoir antioxydant et pour ses propriétés anti-inflammatoires.

L'enrichissement sur tourteaux de karité a donné les résultats résumés dans le tableau 5 suivant :

Tableau 5 : Enrichissement sur tourteaux de Karité

Caractéristiques	Temps initial		Temps final (après 3 semaines)	
	% aromatique	% de dégradation	% aromatique	% de dégradation
MC témoin	X	X	X	X
MC + gallate	100	0	100	0
MC + tourteaux de karité	X	X	X	X
MC + gallate + tourteaux de karité	103,4	0	100	0

MC : milieu de culture

X : absence d'activité bactérienne de dégradation

Pour ces enrichissements sur tourteaux de karité, dans un premier temps, aucune activité de dégradation des molécules aromatiques n'a été observée après trois semaines de

culture. Cependant, il était intéressant de signaler que l'observation à l'état frais des enrichissements montrait la présence de consortiums bactériens actifs. Cependant, cette activité n'était pas de type estérase. Ainsi, ces enrichissements ont été poursuivis sur une très longue période dans le but de mettre en évidence les activités présentes. Ceci a permis une bonne adaptation des consortiums bactériens présents.

Au bout de plusieurs repiquages successifs suivis chaque semaine, des résultats intéressants ont pu être observés et sont présentés dans le tableau 6 suivant.

Tableau 6 : Evolution des enrichissements sur tourteau de karité au cours du temps

Caractéristiques	T0	T1	T2 (après 1 semaine)	% de dégradation
MC témoin	-	-	-	-
MC + acide gallique	-	-	-	0
MC + acide tannique	-	-	-	0
MC + acide gallique + inoculum	-	+	+	100
MC + acide tannique + inoculum	-	+	+	100

MC : milieu de culture

Inoculum : provenant de l'enrichissement de base des tourteaux de karité

- : absence d'activité bactérienne de dégradation

+ : observation d'activité bactérienne de dégradation

Les tubes inoculés à partir de l'enrichissement de départ, et observés après une semaine ont montré une dégradation des composés aromatiques (acides tannique et gallique). On remarque une dégradation d'environ 100% pour les deux dérivés étudiés qui ont été inoculés, ce qui montre qu'une activité bactérienne est responsable de cette transformation.

L'isolement sur chaque composé aromatique avec la technique des roll tubes a permis d'isoler 4 souches permettant de tester leur capacité à dégrader les acides gallique et tannique en culture pure.

	Souches isolées		
Sur acide gallique	Gal1	Gal2	Gal3

	Souche isolée
Sur acide tannique	Tan1

Les résultats obtenus sur cette partie ont permis la publication d'un article dans **la Revue AS (Afrique SCIENCE)**.

ARTICLE 1

**Potentialités biotechnologiques de valorisation des tourteaux de
Karité d'origine tropicale (Afrique SCIENCE)**

Potentialités biotechnologiques de valorisation des tourteaux de karité d'origine tropicale

Malick MBENGUE^{1*}, Abdoulaye THIOYE¹, Emmanuel TINE¹, Abdoulaye SAMB²
et Marc LABAT³

¹ Laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Génie Industriel, Ecole Supérieure Polytechnique,
Université Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar-Fann, Dakar, Sénégal

² Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop,
BP 5005 Dakar-Fann, Dakar, Sénégal

³ Aix-Marseille Université, Université de Toulon, CNRS/INSU, IRD, UMR 235, MIO, UM 110,
163 avenue de Luminy, case 925, F-13288, Marseille, Cedex 09, France

* Correspondance, courriel : mbenguemalick@hotmail.com

Résumé

De nombreux sous-produits agro-industriels posent d'énormes problèmes de pollution à cause de l'accumulation des composés toxiques dans toute la zone soudano-sahélienne et plus particulièrement au Sénégal. Certains de ces problèmes sont causés par les composés aromatiques de par leur toxicité et leur très faible biodégradabilité. Parmi ces sous-produits, le tourteau de karité est l'un des plus préoccupants. Malgré sa richesse énergétique et ses potentialités nutritionnelles, ce déchet solide, polluant à cause de sa richesse en acide gras insaturés et en polyphénols (tanins), est systématiquement déversé dans la nature. L'identification et la détermination de la concentration dans ce résidu de composés aromatiques et leurs concentrations montrent de grandes potentialités d'extraction de précurseurs aromatiques notamment l'acide gallique et sa biotransformation en molécules à haute valeur ajoutée comme les antioxydants naturels et les arômes.

Mots-clés : *tourteaux de karité, polyphénols, composés aromatiques, acide gallique.*

Abstract

Biotechnological potentials of tropical origin shea cake valorization

Many agro-industrial products pose serious pollution problems due to the accumulation of toxic compounds throughout the Sudano-Sahelian area and particularly in Senegal. Some of these problems are caused by aromatics compounds due to their toxicity and low biodegradability. Among these byproducts, shea cake is one of the most concerned. Despite its energetic wealth and its nutritional potentials, this solid waste pollutant is systematically dumped in nature because of its high unsaturated fatty acid and polyphenols (tannins). The identification and determination into this residue of aromatic compounds and their concentrations show large potential extraction of aromatic precursors such as gallic acid and their biotransformation into high added value molecules, such as natural antioxidants and aromas.

Keywords : *shea cake, polyphenols, aromatic compounds, gallic acid.*

Malick MBENGUE et al.

1. Introduction

Le beurre de karité est extrait de la noix de *Vitellaria paradoxa* Gaertn C.F., un arbre de la famille des *Sapotacées*, pouvant atteindre une quinzaine de mètres de haut, qui pousse dans les savanes arborées d'Afrique. *Vitellaria paradoxa* pousse très bien sur un large éventail de sols, y compris les sols très dégradés, arides, semi arides et rocailleux [1]. Ses fruits sont des baies charnues renfermant une noix dont la teneur en matière grasse se situe entre 43 et 55 % [2]. Le beurre de karité est très apprécié en cosmétologie, pharmacologie et alimentation, ce qui lui offre de nombreux débouchés sur les marchés internationaux. L'augmentation de la production de beurre de karité est due à sa capacité à substituer le beurre de cacao dans la production de chocolat [3]. Cependant, la fabrication de beurre de karité est accompagnée de la production de tourteau. Il a été estimé que 60 000 tonnes d'amandes sont consommées chaque année, générant environ 30,3 millions kg de tourteau de karité par an [4]. Le tourteau de karité, coproduit du beurre de karité utilisé essentiellement en cosmétologie, représente un sous-produit solide provenant des industries agroalimentaires de nombreux pays d'Afrique Occidentale, mais aussi de la filière artisanale détenue en général par les femmes. Malgré sa richesse énergétique et ses potentialités nutritionnelles, ce déchet solide est systématiquement déversé dans la nature (*Figure 1*). Le tourteau de karité est un déchet polluant de premier plan à cause de sa richesse en lipides, particulièrement en acides gras insaturés, ainsi qu'en composés phénoliques incluant 20 % (w/w) de tannins. Les tannins sont toxiques pour les organismes aquatiques, inhibant les microorganismes et les enzymes impliqués dans la dégradation des polluants organiques [5]. Les tanins sont des composés bioactifs, ils sont vulnérables à la polymérisation ainsi qu'à l'oxydation dans l'air. Ces réactions se traduisent par la formation de composés de haut poids moléculaire ayant de grandes capacités de liaison avec les protéines pour former des complexes non digestibles [6]. Ainsi, ils sont considérés comme étant des polluants environnementaux récalcitrants à la biodégradation [7]. L'objectif de cette étude est d'identifier et de quantifier les structures aromatiques présentes dans les tourteaux de Karité, de mettre en évidence un consortium de microorganismes capable de dégrader les composés phénols toxiques présents dans les tourteaux de karité et enfin, en vue d'une valorisation de ce coproduit du beurre de karité, de montrer les potentialités biotechnologiques que peuvent offrir les structures aromatiques identifiées.

2. Matériel et méthodes

2-1. Collecte et préparation des échantillons

Les tourteaux de Karité ont été prélevés à Saraya, région de Kédougou, dans le sud-est du Sénégal. Un échantillon de 20 à 40 mg est pesé dans un tube à essai et un volume de 1 mL d'eau distillée est ajouté avec 1 mL d'hydroxyde de sodium 4 N. Le tube est ensuite fermé et incubé à 35 °C dans un bain-marie et à l'abri de la lumière.

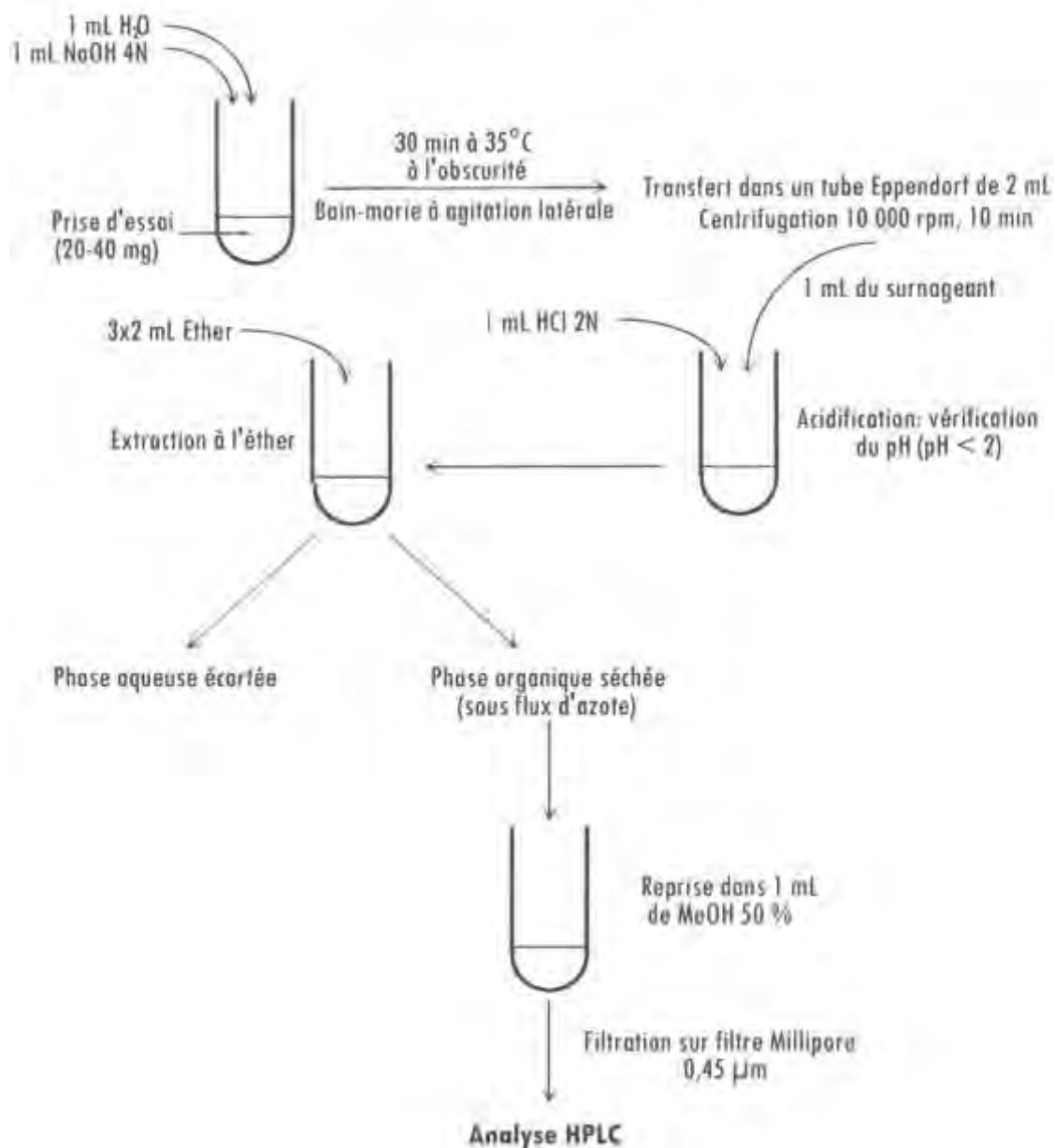
2-2. Centrifugation

Après 30 min d'incubation, l'échantillon est centrifugé à 10 000 tours par minute pendant 10 minutes. Dans chaque cas, 1 mL du surnageant est transféré dans un autre tube à essai.

2-3. Extraction des composés aromatiques

L'extraction est effectuée avec du diéthyl éther après ajout de 1 mL d'acide chlorhydrique 2 N. La phase organique est ensuite séchée sous flux d'azote et est à nouveau mise en suspension dans un 1 mL de méthanol à 50 % (w/w).

• **Protocole d'extraction élaboré pour ce travail**



2-4. Analyse chromatographique des composés aromatiques

Les fractions aliquotes sont par la suite filtrées à l'aide de filtres Millipore 0,45 µm de porosité et soumises à une analyse spécifique par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Les composés aromatiques ont été mesurés avec un modèle HP (Hewlett Packard) 1100 équipé d'un détecteur multi-longueurs d'onde et opérant à 220, 280, 326 nm, avec un injecteur automatique offrant 100 positions d'échantillons.

2-4-1. Séparation

La séparation a été réalisée grâce à une colonne C_{18} Symmetry (4,6 x 100 mm, 3,5 μ m de taille de particules) (Waters Chromatography) maintenue à 30°C. La phase mobile, constituée d'un mélange de deux solvants (eau mQ dans 0,01 % (v/v) d'acide acétique glacial et de l'acétonitrile pur), a été utilisée à un débit de 0,7 mL min⁻¹. Pour la séparation des composés aromatiques, 5 % du solvant acétonitrile est initialement élué pendant 2 min, ensuite la concentration est augmentée à 10 % sur une période de 6 min, puis de 20 % pendant 17 min, et finalement de 70 % pendant 20 min. La colonne est ensuite lavée pendant 5 min avec de l'acétonitrile à 100 % et est rééquilibrée avec 5 % d'acétonitrile pour encore 10 min avant la prochaine injection.

Tableau 1 : Répartition du gradient

Gradient		Temps (min)
Solvant A (%)	Solvant B (%)	
95	5	0
95	5	2
90	10	8
80	20	25
30	70	45
0	100	46
0	100	50
95	5	51
95	5	60

2-4-2. Quantification et identification des composés phénoliques

La méthode des standards externes a été utilisée pour la détermination, l'identification et la quantification des composés phénoliques. Les valeurs des temps de rétention et les facteurs de réponse pour chaque standard externe ont été obtenus par des essais de calibration chromatographique. Les dérivés cinnamiques et benzoïques ont été utilisés comme standards externes comme décrits par [8].

2-5. Enrichissement sur tourteau de karité

L'enrichissement a été réalisé en milieu liquide dans des tubes de milieux de culture anaérobie. Pour chaque tube de 5 mL, 0,2 mL de tampon (NaHCO_3 10 %), 0,2 mL de réducteur ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 2 %) sont ajoutés, puis l'aromatique concerné a été rajouté à 5mM. Pour chaque composé aromatique, deux tubes de milieux sont préparés : un qui ne contient que l'aromatique et un autre où en présence de l'aromatique, le sous-produit correspondant est ajouté pour environ 15 mg pour un tube de 5 mL de culture. Pour chaque enrichissement, les résultats sont comparés à un milieu de culture témoin, tamponné et réduit dans les mêmes conditions, mais ne contenant pas d'aromatique. Les tubes sont ensuite placés dans une étuve thermostatée à 35 °C. Afin de suivre la dégradation des composés aromatiques, une première analyse HPLC a été effectuée au temps T0 (Temps initial) et une autre est réalisée au bout de trois semaines.

3. Résultats et discussion

Les résultats de l'identification et de la quantification des composés phénoliques ont montré l'absence de dérivés cinnamiques (comme l'acide p-coumarique et l'acide férulique) dans les tourteaux de karité. En revanche, la présence d'acide gallique (dérivé benzoïque) a été notée à une concentration importante, de l'ordre de 1,30 g/100 g de tourteaux (w/w) (**Tableau 2**). Les valeurs obtenues représentent la moyenne de trois analyses.

Tableau 2 : Identification et quantification des composés phénoliques dans les tourteaux de karité

	Acide p-coumarique (g/100 g produit w/w)	Acide férulique (g/100 g produit w/w)	Acide gallique (g/100 g produit w/w)
Tourteau de karité	0	0	1,30

L'enrichissement sur tourteaux de karité a donné les résultats résumés dans le **Tableau 3**:

Tableau 3 : Résultats de l'enrichissement sur tourteau de karité

Caractéristiques	Temps initial		Temps final (après trois semaines)	
	% aromatique	% de dégradation	% aromatique	% dégradation
MC témoin	X	X	X	X
MC + acide gallique	100	0	100	0
MC + tourteaux de karité	X	X	X	X
MC + acide gallique + tourteaux de karité	100	0	100	0

MC : milieu de culture ; X : absence d'activité bactérienne de dégradation

Pour ces enrichissements sur tourteaux de karité, dans un premier temps, aucune activité de dégradation des molécules aromatiques n'a été observée, même après trois semaines de culture. Cependant, il est intéressant de signaler que l'observation à l'état frais des enrichissements montrait la présence de consortiums bactériens actifs. Ainsi, ces enrichissements ont été poursuivis sur une longue période dans le but de mettre en évidence les activités présentes. Au bout de plusieurs repiquages successifs suivis chaque semaine, des transformations métaboliques ont pu être observées et les résultats sont présentés dans le **Tableau** suivant (**Tableau 4**)

Tableau 4 : Enrichissement sur tourteaux de karité après plusieurs semaines

Caractéristiques	T0	T1	T2 (après 4 semaines)	% de dégradation
MC témoin	x	x	x	0
MC + acide gallique	x	x	x	0
MC + acide tannique	x	x	x	0
MC + acide gallique + inoculum	x	+	+	100
MC + acide tannique + inoculum	x	+	+	100

MC : milieu de culture ; Inoculum : provenant de l'enrichissement de base de tourteaux de Karité ;
 x : absence d'activité bactérienne de dégradation ; + : observation d'activité bactérienne de dégradation

Les tubes inoculés à partir de l'enrichissement de départ, et observés après une semaine ont montré une dégradation des composés aromatiques (acides gallique et tannique). On remarque une dégradation d'environ 100 % pour les deux dérivés qui ont été inoculés, ce qui montre qu'une activité bactérienne est à l'origine de cette transformation. Ces résultats montrent qu'il existe dans les tourteaux de karité un consortium de microorganismes bactériens capable d'utiliser les acides gallique et tannique comme source de carbone. Ces bactéries pourraient constituer une source de production d'acide gallique à partir des tourteaux de karité riche en tannins. L'acide gallique (3, 4, 5- trihydroxy-acide-benzoïque) est un précurseur essentiel pour plusieurs métabolites secondaires des plantes, particulièrement les gallotannins et les ellagitannins [9-11]. L'acide gallique présente une large variété d'activités biologiques y compris une activité antioxydante [12]. L'acide gallique a une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses [13], et possède des propriétés anti-inflammatoires [14], anti-mutagéniques [15], hépato-protectrices [16], neuro-protectrices [17], anti-tumorales [18] et analgésiques potentielles [19]. Il est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse de produits antibactériens et de médicaments antipaludéens (Triméthoprimes) [20-22]. L'acide gallique est également utilisé dans l'industrie alimentaire en tant que substrat pour la synthèse chimique de conservateurs tels que le pyrogallol et les gallates [23-25]. L'acide gallique est un précurseur du conservateur alimentaire le propyl gallate et de certains colorants [26-27]. La production d'acide gallique à partir des tourteaux de karité contribuerait à éliminer les effets indésirables des tannins dans ces résidus [28] et permettrait de résoudre les problèmes d'intoxication causés par ces derniers [29-31]. Dans l'alimentation animale, la dégradation de l'acide tannique en acide gallique permet de réduire les effets antinutritionnels et améliore la digestibilité de ce résidu solide chez l'animal [32-34].

4. Conclusion

Les tourteaux de karité sont très riches en composés phénoliques notamment en acide gallique. Des enrichissements effectués sur ce produit ont montré qu'une activité bactérienne serait à l'origine de la dégradation de ces composés phénoliques. L'isolement et la caractérisation de ces souches bactériennes pourraient permettre la mise en place d'un système de production de l'acide gallique qui a de nombreuses potentialités biotechnologiques à partir de ce résidu de la fabrication du beurre de karité.

Références

- [1] - E. K. DOGBEVI, The Shea Tree Has Economic and Environmental Values for Ghana, (2007) www.myjoyline.com.
- [2] - G. BOURLET, Le problème du karité, *Oléagineux*, 5 (1950) 364-367.
- [3] - M. LIPP and E. ANKLAM, Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate-Part A Composition data, *Food Chem.* 62 (1998) 73-97.
- [4] - F. M. DANIKUU, A. QUAINOO and E. N. K. SOWLEY, Physico-chemical characteristics and microbial population dynamics of Shea nut cake polluted soil in northern Ghana, *Int. J. Dev.* 1 (2015) 1-10.
- [5] - A. SCALBERT, Antimicrobial properties of tannins, *Phytochemistry* 30 (1991) 3875 - 3883.
- [6] - M. M. J. CHAMP, Non-nutrient bioactive substances of pulses, *Br. J. Nutr.* 3 (2002) 307-319

- [7] - Q. HE, K. YAO, D. SUN and B. SHI, Biodegradability of tannin containing waste water from leather industry, *Biodegradation* 18 (2007) 465-472.
- [8] - T. MECHICHI, M. LABAT, J. L. GARCIA, P. THOMAS, and B. K. C. PATEL, *Sporobacterium olearium* gen. nov. sp. nov., a new aromatic compounds degrading, methanethiol-producing bacterium from an olive mill wastewater treatment digester, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (1999) 1741-1748.
- [9] - G. GROSS, Synthesis of b-glucogallin from UDP-glucose and gallic acid by an enzyme preparation from oak leaves, *FEBS. Lett.* 148 (1982) 67-70.
- [10] - P. GRUNDHOEFER, R. NIEMETZ, G. CHILLING and G. G. GROSS, Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolyzable tannins, *Phytochemistry* 57 (2001) 915-927.
- [11] - E. HASLAM, Polyphenols- structure and biosynthesis In: Haslam E (ed) Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action, *Cambridge University Press*, New York, (1998) 51-83.
- [12] - V. SUBRAMANIAN, B. VENKATESAN, A. TUMALA and E. VELLAICHAMY, Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice, *Food Chem. Toxicol.* 66 (2014) 44-55.
- [13] - H. U. GALLI, E. M. PERCHELLET, D. S. KLISH, J. M. JOHNSON and J. P. PERCHELLET, Antitumor-promoting activities of hydrolysable tannins in mouse skin, *Carcinogenesis* 13 (1992) 715-718.
- [14] - H. F. STICH, M. P. ROSIN and L. BRISON, Inhibition of mutagenicity of a model nitrosation reaction by naturally occurring phenolics, coffee and tea, *Mutat Res.*, 95 (1982) 119-128.
- [15] - Y. OHNO, K. FUKUDA, G. TAKEMURA, M. TOYOTA, M. WATANABE and N. YASUDA, Induction of apoptosis by gallic acid in lung cancer cells, *Anticancer Drugs* 10 (1999) 845-851.
- [16] - J. ANJANA, B. MONIKA and S. SHUKLA, Protective effect of *Terminalia bellerica* Roxb. and gallic acid against carbon tetrachloride induced damage in albino rats, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 214-218.
- [17] - L. ZHONGBING, N. GUANGJUN, S. PETER, C. BELTON and T. HUIRU, Structure-activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives, *Neurochem. Int.* 48 (2006) 263-274.
- [18] - D. CHIARA, P. GIORGIA, M. FEDERICA, Z. GIANNI, B. GAETANO, M. SILVIA and V. GIANLUCA, Anti-tumour potential of a gallic acid-containing phenolic fraction from *Oenothera biennis*, *Cancer Lett.* 26 (2005) 17-25.
- [19] - R. KROGH and R. YUNES, Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives, *Farmaco.* 55 (2000) 730-735.
- [20] - B. BAJPAI and S. PATIL (1997), Induction of tannin acyl hydrolase (EC3.1.1.20) activity in some members of *fungi imperfecti*, *Enzym. Microb. Technol.* 20 (1997) 612-614.
- [21] - X. YU, Y. LI and D. WU, Enzymatic synthesis of gallic acid ester using microencapsulated tannase: Effect of organic solvents and enzyme specificity, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 30 (2004) 69-73.
- [22] - J. VAN DE LAGEMAAT and D. L. PYLE, Modeling the uptake and growth kinetics of *Penicillium glabrum* in a tannic acid-containing solid state fermentation for tannase production, *Process. Biochem.* 40 (2005) 1773-1782.
- [23] - A. GATHON, Z. GROSS and M. ROZHANSKI, Propyl gallate: enzymatic synthesis in a reverse micelle system, *Enzym. Microb. Technol.* 11 (1989) 604-609.
- [24] - R. BELMARES, J. C. CONTRERAS ESQUIVEL, R. RODRIGUEZ-HERRERA, A. R. CORONEL and C. N. AGUILAR, Microbial production of tannase : An enzyme with potential use in food industry, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 37 (2004) 857-864.
- [25] - I. VAQUERO, A. MARWBAL and R. MUNDOZ, Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, *Int. J. food. Microbiol.* 96 (2004) 199-204.

- [26] - S. MAURYA and D. SINGH, Quantitative analysis of total phenolic content in *Adhatoda vasica* Nees Extracts, *Int. J. Pharm. Res.* 2 (2010) 2403-2406.
- [27] - A. M. DA COSTA, C. G. M. DE SOUZA, A. BRACHT, M. K. KADOWAKI, A. C. S. DE SOUZA, R. F. OLIVEIRA and R. M. PERALTA. Production of tannase and gallic acid by *Aspergillus tamaritii* in submerged and solid state cultures, *Afr. J. Biochem. Res.* 7 (2013) 197-202.
- [28] - S. J. SPIER, B. P. SMITH, A. A. SEAWRIGHT, B. B. NORMAN, S. R. OSTROWSKI and M. N. OLIVER, Oak toxicosis in cattle in northern California: clinical and pathologic findings, *J. Am. Vet. Med Assoc.* 191 (1987) 958-964.
- [29] - J. ZHU, L. J. FILIPPICH, M. T. ALSALAMI, 1992. Tannic acid intoxication in sheep and mice. *Res. Vet. Sci.* 53 (1992) 280-292.
- [30] - K. H. PLUMLEE B. JOHNSON and F. D. GALEY, Disease in cattle dosed orally with oak or tannic acid, in: Toxic plants and other natural toxicants, (T. Garland and A. C. Barr A.C., eds.), *CAB. Int., Wallingford, UK*, (1998) 549-553.
- [31] - D. K. BOADI and R. J. NEUFIELD, Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins, *Enzym. Microb. Technol.* 28 (2001) 590-595.
- [32] - C. N. AGUILAR, R. RODRIGUEZ, G. GUTIERREZ-SANCHEZ, C. AUGUR and E. FAVELA-TORRES, Microbial tannase : Advances and perspectives, *Applied. Microbiol. Biotechnol.* 76 (2007) 47-59.
- [33] - E. B. N. GRAMINHA, A. Z. L. GONCALVES, R. D. P. B. PIROTA, M. A. A. BALSALOBIE, R. DA SYLVA and E. GOMES, Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition, *Anim. Feed Sci. Technol.* 144 (2008) 1-22.
- [34] - K. MURUGAN and S. A. AL-SOHAIBANI, Biocompatible tannin and associated color from tannery effluent using the biomass and tannin acyl-hydrolase (E.C.3.1.1.20.) enzymes of mango industry solid waste isolate *Aspergillus candidus* MTCC 9628, *Res. J. Microbiol.* 5 (2010) 262-271.

Après identification des composés aromatiques majeurs présents dans les tourteaux de karité et enrichissements microbiologiques en présence de ces composés, les études se sont poursuivies avec la caractérisation phylogénétique, physiologique et la détermination de certains caractères biochimiques des souches isolées.

III- : ETUDES PHYLOGENETIQUES

III-1 : Etudes phylogénétiques

Le séquençage de l'ARNr 16S des souches Gal1, Gal2, Gal3 et Tan1 a été réalisé et les résultats ont permis de positionner les souches par rapport aux espèces les plus proches (Figures 22, 23, 24 et 25).

III-1-1 : Etudes phylogénétiques de Gal1

L'analyse de la séquence de l'ARNr 16S de la souche Gal1^T a montré qu'elle est très proche de *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T avec 94,27% de similarité, *Clostridium populeti* ATTC 3225^T avec 93,94%, *Clostridium aminovalericum* DSM 1283^T et *Anaerosporeobacter mobilis* DSM 15930^T avec 93,63%. En se basant sur ces résultats, on pourrait dire que la souche Gal1^T pourrait être décrite comme une nouvelle espèce. La caractérisation physiologique et les tests biochimiques pourraient permettre de mieux la positionner.

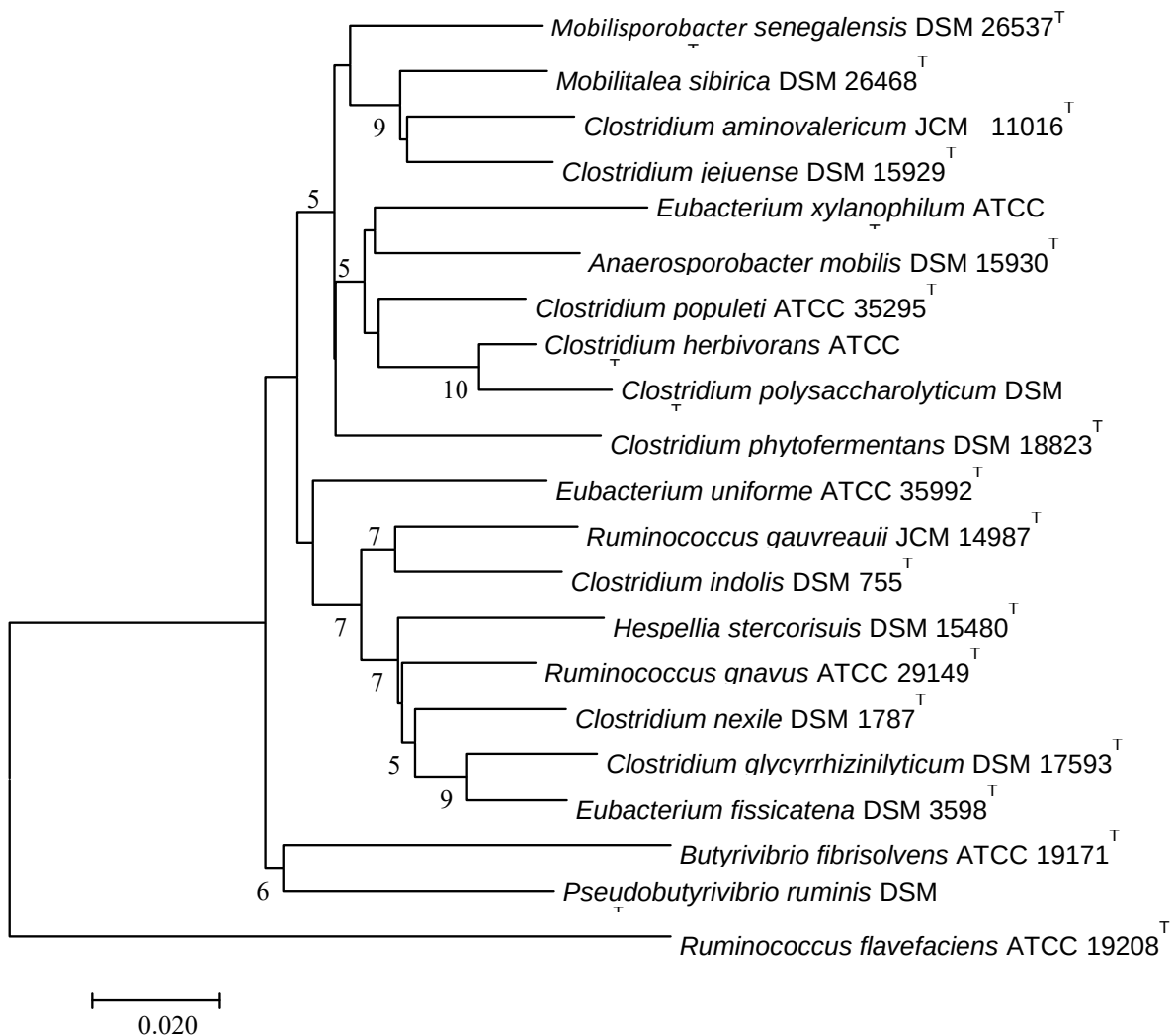


Figure 22 : Position phylogénétique de la souche Gal1

III-1-2 : Etudes phylogénétiques de Gal2

La comparaison de la séquence de l'ARNr16S de la souche Gal2 avec celles de souches appartenant au genre *Clostridium* a été réalisée. Gal2 possède un pourcentage de similitude de plus de 99% avec la souche *Clostridium bifermentans* ATCC 638 (figure23). Bien que les caractéristiques phylogénétiques montrent que Gal2 est très proche de *Clostridium bifermentans*, nous nous sommes intéressés à sa caractérisation physiologique.

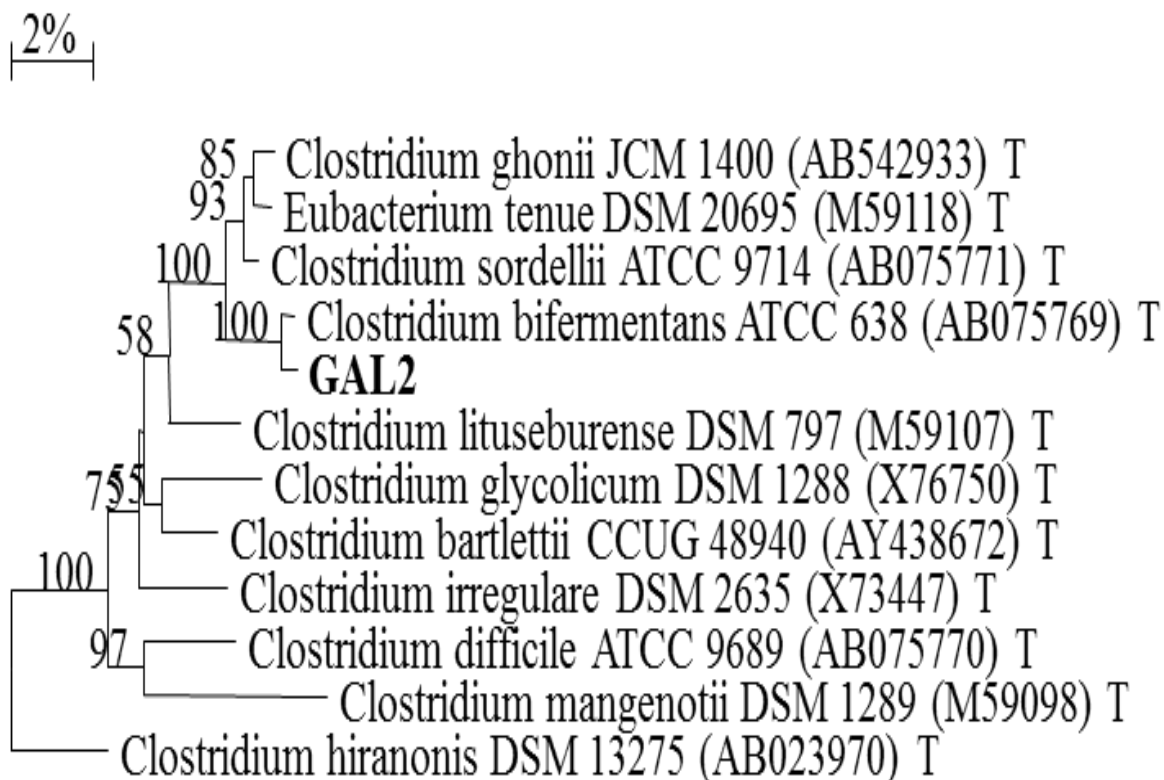


Figure 23 : Position phylogénétique de la souche Gal2 parmi les membres du genre *Clostridium*.

III-1-3 : Etudes phylogénétiques de Gal3

La comparaison de la séquence de l'ARNr16S de la souche Gal3 avec celles de souches appartenant au genre *Clostridium* a montré que Gal3 possède un pourcentage de similitude de plus de 97% avec 9 souches appartenant au genre *Clostridium* (figure 24). Il se pourrait que Gal3 soit une espèce déjà décrite au sein du genre *Clostridium*.

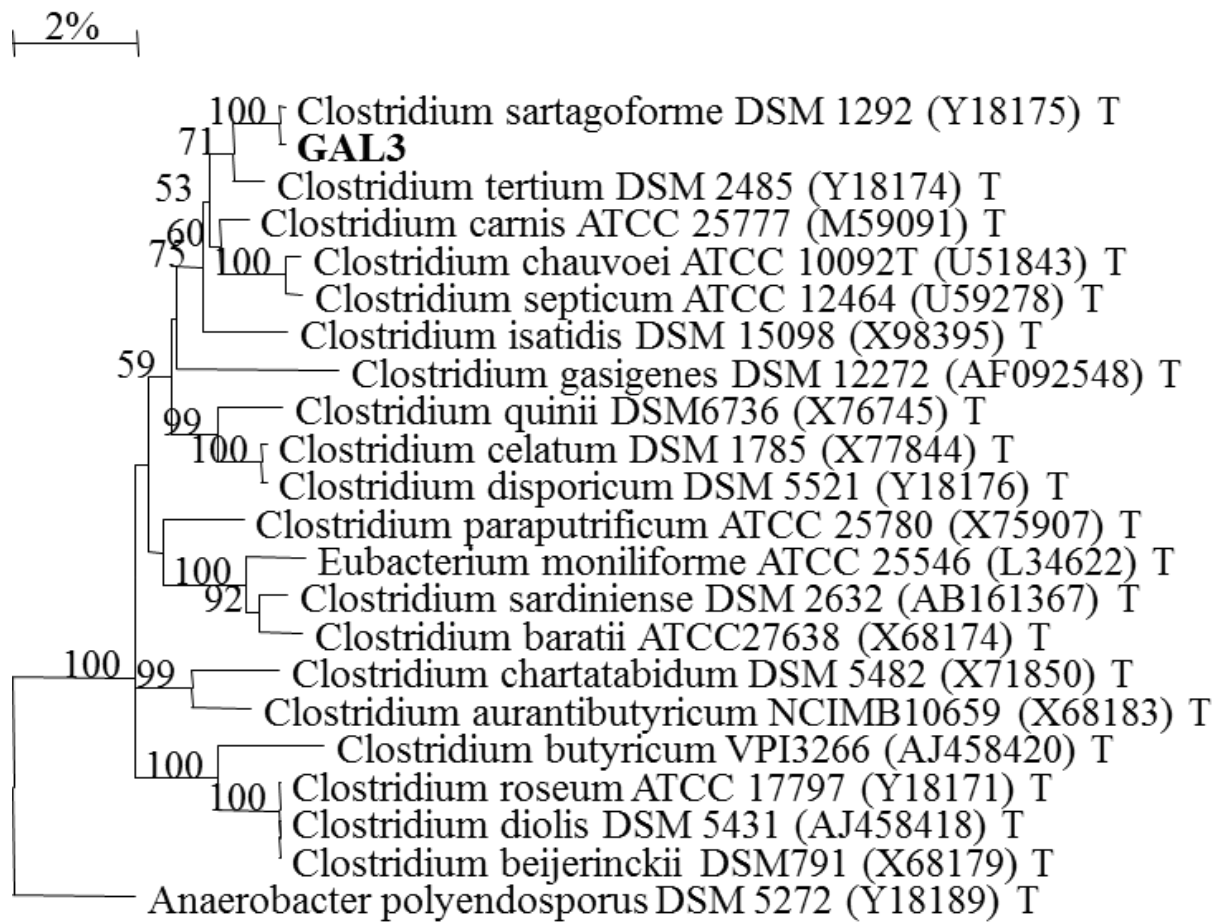


Figure 24 : Position phylogénétique de la souche Gal3 parmi les membres du genre *Clostridium*.

III-1-4 : Etudes phylogénétiques de Tan1

La souche Tan1 possède un pourcentage de similitude de plus de 97% avec de nombreuses espèces appartenant au genre *Clostridium* (figure 25). Tout comme Gal3, Tan1 pourrait aussi être une espèce déjà décrite au sein du genre *Clostridium*.

2%

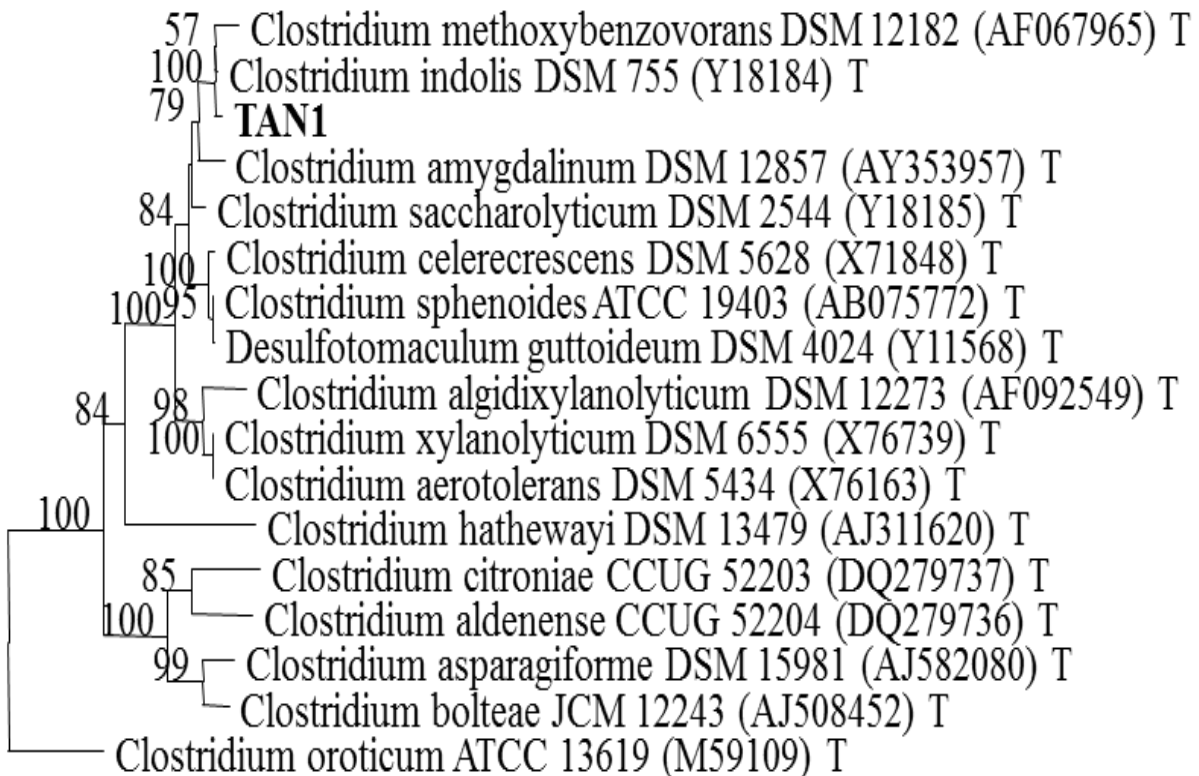


Figure 25 : Position phylogénétique de la souche Tan1 parmi les membres du genre *Clostridium*.

La souche Gal1^T présente 94,27% de similitude avec l'espèce la plus proche qui est *Mobilitalea Sibirica* au niveau de l'ADNr16S. Une souche bactérienne pourrait être décrite comme une nouvelle espèce si elle présente moins de 97% de similitude au niveau de l'ADNr16S avec la souche la plus proche, ou bien si elle montre moins de 70% de ré-association ADN-ADN et aussi des différences notables au niveau du métabolisme (Stackbrandt *et al.*, 1994). C'est dans ce contexte que les études de caractérisation de la souche Gal1 se sont poursuivies aussi bien du point de vue physiologique que biochimique. En ce qui concerne les souches Gal2, Gal3 et Tan1, les arbres obtenus après l'étude phylogénétique ont montré qu'elles appartenaient toutes au genre *Clostridium* avec à chaque fois plus de 99% de similarité au niveau de l'ADNr16S avec les souches les plus proches. Les souches Gal2, Gal3 et Tan1 pourraient de ce fait présenter des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques très proches. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés particulièrement à la caractérisation morphologique et physiologique de la souche Gal2, pour éviter certaines redondances.

IV- : CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE DE GAL1 ET GAL2

IV-1 : La souche Gal2

IV-1-1 : Caractères morphologiques

La souche Gal2 est un gros bacille droit immobile, de 4-7 μm de longueur et 0,8-1,0 μm de largeur. Elle se présente sous forme de cellules aux extrémités arrondies, isolées ou en paires. L'analyse des coupes au microscope électronique de la souche Gal1 montre qu'elle a une paroi typique des bactéries Gram positif.



Figure 26

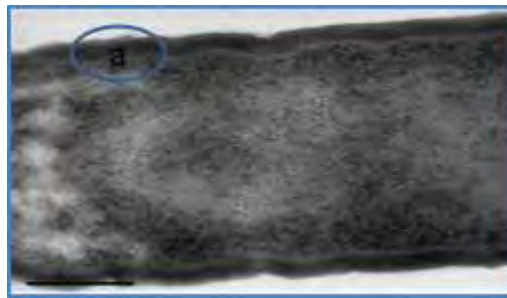


Figure 27

a : Paroi Gram+, épaisse et stratifiée.

Figure 26 : Souche Gal2 observée au microscope optique.

Figure 27 : Souche Gal2 observée au microscope électronique.

IV-1-2 Température optimale de Gal2

La souche Gal2 se développe à des températures comprises entre 20 et 45°C. La température optimale de croissance de Gal2 est de 30°C.

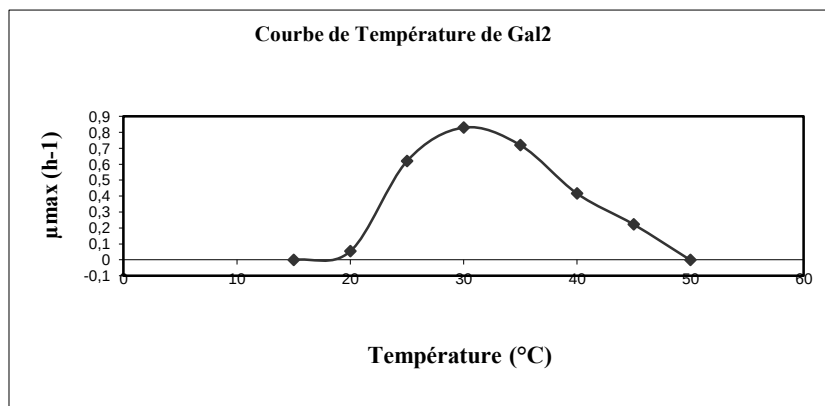


Figure 28 : Cinétique de la croissance de la souche Gal2 en fonction de la température.

IV-1-3 : Influence de la concentration en sel

La souche Gal2 est capable de croître jusqu'à une concentration de sel de 35g/l. La croissance est nulle à 40 g/l. Le taux de croissance maximal est observé à une concentration de sel de 20 g/l.

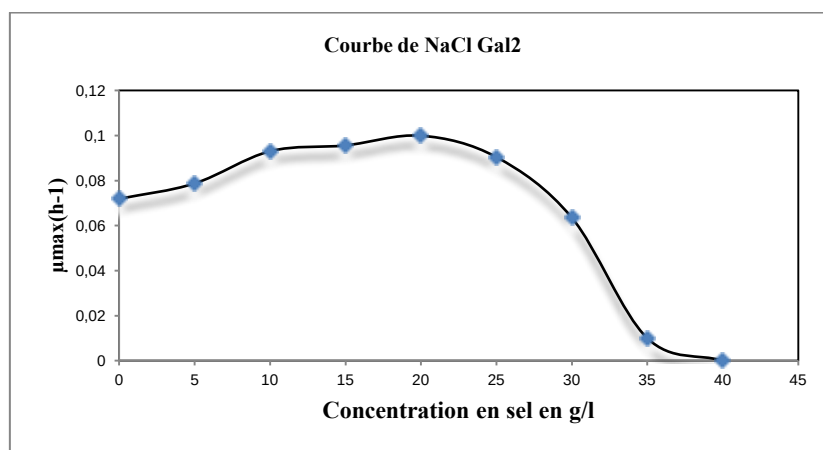


Figure 29 : Cinétique de la croissance de la souche Gal2 en fonction de la concentration en sel.

IV-1-4 : Effet du pH

La souche Gal2 se multiplie à des pH limites situés entre 6,3 et 9,3 avec un optimum de 7,7 ($\mu_{\max} = 0,131 \text{ h}^{-1}$).

En dehors de cette gamme de pH, la croissance est complètement inhibée.

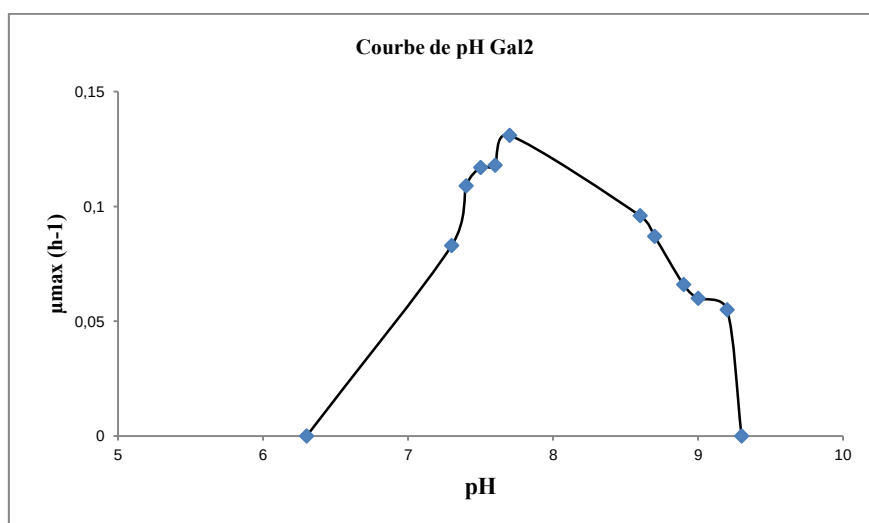


Figure 30 : Cinétique de la croissance de la souche Gal2 en fonction du pH.

IV-1-5 : Comparaison de la souche Gal2 aux espèces les plus proches

La souche Gal2 a été comparée aux espèces les plus proches (Tableau7)

Tableau 7 : Comparaison de Gal2 aux souches les plus proches.

Caractéristiques	Gal2	<i>Clostridium bifermentans</i> **** ATCC 638 (AB075771)T	<i>Clostridium sordellii</i> ***** ATCC 9714 (AB075771)T
Dimensions cellulaires (µm)	4-6	1.8-14	1.6-20.6
Position de l'endospore	Subterminale	Subterminale	NR
Mobilité			
Gamme de température (°C)	- 25-40	+ 10-50	+ 25-45
Température optimum (°C)	30	30-37	30-37
Gamme de pH			
pH optimum	6,3-9,3	5-9,2	NR
Gamme de sel (%)	7,8 < 3,5	7 < 5	NR < 6,5
+, positive ; -, négative NR, non reporté **** Chamkha <i>et al.</i> , 2001 ***** Bergey's manual of Systematic Bacteriology, volume three, second edition.			

Quelques caractères distinguant Gal2 avec ses souches les plus proches phylogénétiquement ont été listés dans le tableau 3. La souche Gal2, isolée à partir des tourteaux de karité est une bactérie à Gram positif, anaérobie stricte et immobile. Les résultats de l'analyse de l'ARNr 16S indique que Gal2 est très proche de *Clostridium bifermentans* TYR6 (Chamkha *et al.*, 2001) avec plus de 99 % de similarité entre les deux souches. L'hybridation ADN-ADN effectuée entre Gal2 et *Clostridium bifermentans* TYR6 montre une homologie de 80,5 %. Phénotypiquement, Gal2 et *Clostridium bifermentans* TYR6 sont des bâtonnets droits, isolées ou fréquemment associées en paire et sporulées. Cependant, la souche Gal2 est immobile alors que *Clostridium bifermentans* TYR6 est mobile avec une flagellation pérित्रiche. Physiologiquement Gal2 est assez proche de *Clostridium bifermentans* TYR6. Elles croissent toutes à des températures mésophiles. La souche Gal2 croit dans une gamme de pH allant de 6,5 à 9,3 avec un optimum de 7,8 alors que *Clostridium bifermentans* TYR6 évolue dans une gamme de pH allant de 5 à 9,2 avec un optimum de 7. Une étude phénotypique et

physiologique beaucoup plus complète pourrait nous permettre de voir si Gal2 est une espèce de *Clostridium bifermentans*.

IV-2 : La souche Gal1

IV-2-1 : Caractères morphologiques

La souche Gal1 est un bâtonnet légèrement incurvé de 2 à 3 μm de longueur et 0,2-0,4 μm de largeur. Les cellules sont très mobiles avec une flagellation péritriche et de fréquentes associations par paire. L'analyse des coupes au microscope électronique de la souche Gal1 montre qu'elle a une paroi typique des bactéries Gram positif.

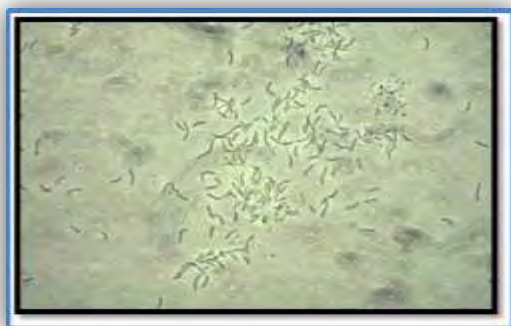


Figure 31



Figure 32

a : Paroi Gram+, peu dense, stratifiée dont la surface layée peut être finement crénelés.

Figure 31: Souche Gal1 observée au microscope optique.

Figure 32 : Souche Gal2 observée au microscope électronique.

IV-2-2 : Température optimale de Gal1

La souche Gal1 est capable de croître entre 15 et 45 °C avec un optimum de croissance à 30°C (μ_{max} de 0,67 h^{-1}) ; aucune croissance n'est observée à 10 et 50 °C, c'est donc une souche de type mésophile.

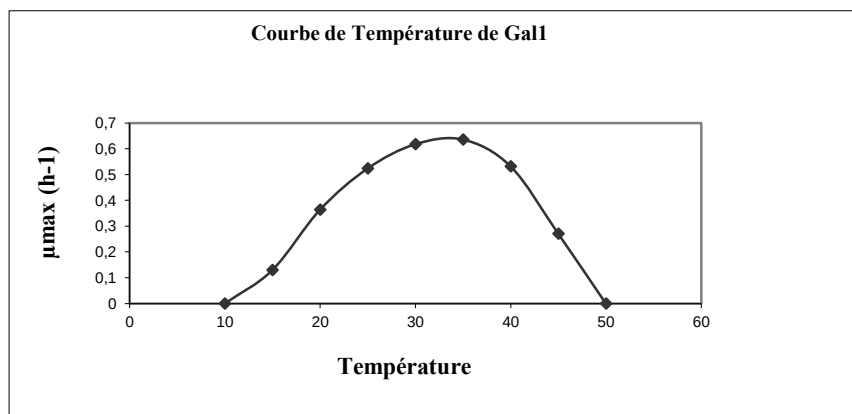


Figure 33 : Cinétique de la croissance de Gall en fonction de la température.

IV-2-3 Influence de la concentration en Sel

La souche Gall a une croissance positive jusqu'à une concentration de 35 g/l de sel (3,5%). A 40 g/l la croissance est complètement inhibée. Le taux de croissance optimal est observé avec une concentration en sel de 10 g/l.

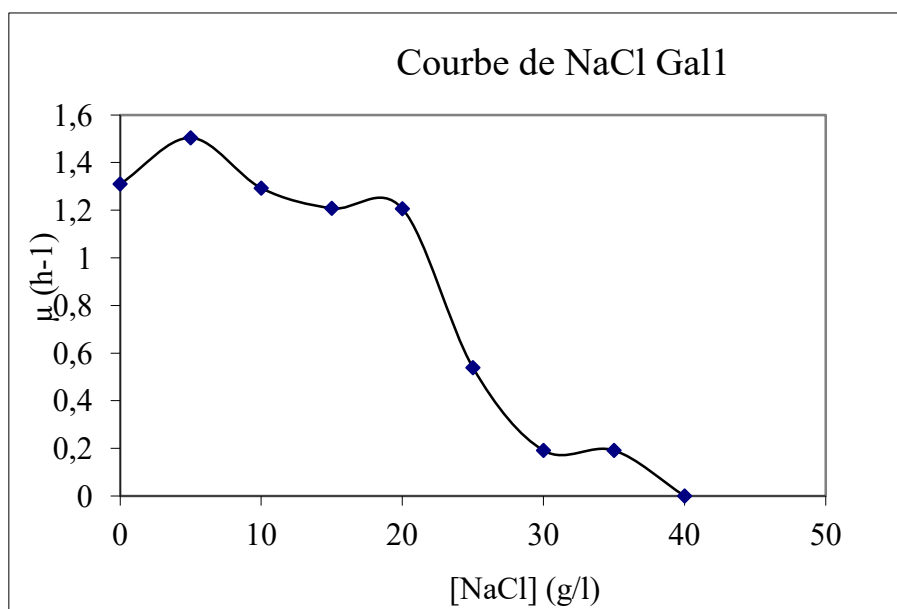


Figure 34 : Cinétique de la croissance de la souche Gall en fonction de la concentration en sel.

IV-2-4 : Effet du pH

La souche Gal1 se multiplie à des pH limites situés entre 6,5 et 9,3 avec un optimum de 7,8. En dehors de ces limites, la croissance est complètement inhibée.

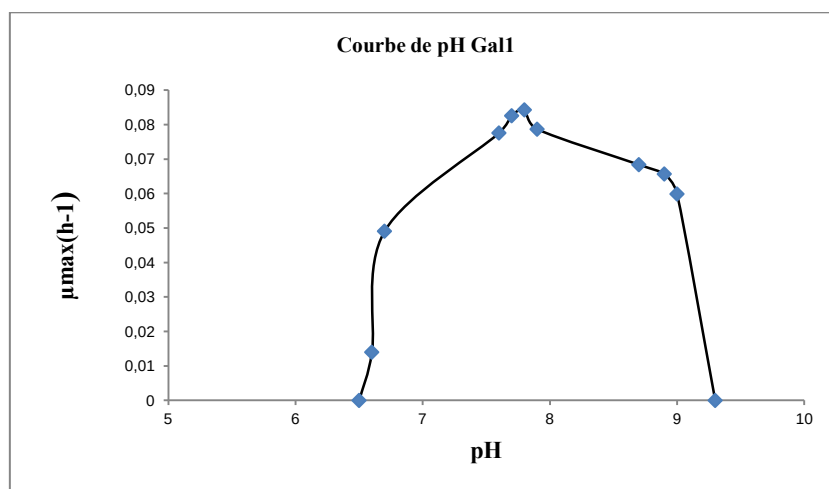


Figure 35 : Cinétique de la croissance de la souche Gal1 en fonction du pH.

IV-2-5 : Utilisation des substrats

Les résultats obtenus en HPLC ont montré que la souche Gal1 est capable d'utiliser le mannose, le mannitol, le cellobiose, l'arabinose, le fructose, le glucose, le sucrose, le lactose, le maltose et le tréhalose comme source de carbone. Ces substrats sont fermentés et les produits formés sont l'éthanol et l'acétate. La souche Gal1 n'utilise pas le raffinose, le sorbose, l'adonitol, le méthanol, le butane-1,2-diol, le formate, l'acétate, le butyrate, le succinate et le lactate.

IV-2-6 : Comparaison de Gal1 avec les souches les plus proches.

La souche Gal1 a également été comparée aux espèces les plus proches (Tableau8).

Tableau 8 : Comparaison des propriétés morphologiques et physiologiques de la souche Gal1^T avec les espèces les plus proches

Strain: 1, Gal1^T (data from this study); 2 *Mobilitalea sibirica* (DSM 26468^T) (Podosokorskaya *et al.*, 2014); 3 *Clostridium populeti* (ATCC 35295^T) (Sleat *et al.*, 1985); 4 *Anaerosporeobacter mobilis* (DSM 15930^T) (Jeong *et al.*, 2007); 5 *Clostridium aminovalericum* (DSM 1283^T) (Hardman *et al.* 1960) ; Symbols: +, Positive ; -, Negative ; NR, not reported

Characteristics	1	2	3	4	5
Morphology	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Cell size	0.2-0.4x2-4	0.2-0.4x1.5-2.0	1-1.5x1.7-3	0.5-0.6x2.3-5.5	0.3-0.5x1.5-5.2
Habit	Shea cake	Microbial Mat	Woody-Biomass	Forest Soil	Sewage sludge
Temperature Range (°C)	15-45	25-47	15-40	15-40	25-45
Optimum Temperature (°C)	30	37	35	30	37
pH Range	6.5-9.3	6.6-9.4	6.4-8.1	5.5-9.0	5.8-8.0
Optimum pH	7.8	7.0-7.5	7.0	6.5-7.0	NR
NaCl Range (%)	0-3.5	0-8.5	NR	0-3.0	7.4-7.7
Optimum NaCl (%)	1	1.5	NR	0.5	0-6.5
16S rDNA Similarity to Gal1 ^T	100	94.27	93.94	93.63	93.63
DNA G+C content (mol %)	33.8	33.4	28	41	33
Motility	Peritrichous	From subpolar to laterally-insert flagellum	Peritrichous	Peritrichous	Peritrichous
Endospore position	Subterminal to terminal	Terminal	Subterminal	Subterminal	Terminal
Substrates utilization					
Mannose	+	NR	-	+	-
Mannitol	+	-	NR	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	-	+	+	+
Fructose	+	-	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	-	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	-
Lactose	+	-	-	+	-
Trehalose	+	+	-	-	-

La souche Gal1^T est anaérobie stricte et est mésophile. L'extrait de levure est nécessaire pour la croissance. La souche Gal1^T présente des différences morphologiques avec les souches les plus proches (cf Tableau 7). La souche Gal1^T croît entre 15 et 45°C avec un optimum à 30°C alors que *Mobilitalea Siberica* DSM 26468^T a un optimum de 37°C avec une température de croissance allant de 25 à 47°C. Le pH optimal de croissance est un peu alcalin (7,8) pour Gal1^T, en revanche, il est neutrophile avec un optimum compris entre 7-7,5 pour les quatre souches les plus proches. De plus, la souche Gal1^T pousse entre 0 et 35g/l de NaCl alors que

Mobilitalea sibirica DSM 26468^T croit jusqu'à plus de 85g/l de NaCl. La souche Gal1^T montre aussi des différences avec les souches les plus proches lors de la fermentation et de la dégradation de différents substrats carbonés comme le mannose, le mannitol, le cellobiose, l'arabinose, le fructose, le glucose, le sucrose, le maltose, le lactose et le tréhalose. Aussi, la souche *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T diffère de Gal1^T par son incapacité à utiliser le mannitol, arabinose, fructose, sucrose et le lactose. Contrairement, *Anaerospobacter mobilis* DSM 15930^T diffère de Gal1^T par son incapacité à utiliser le mannitol et le tréhalose. La teneur en (G+C)% est de 33,8 mol% et est approximativement égale celle de *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T, mais est différente de celle de *Anaerospobacter mobilis* DSM15930^T ATCC 35295^T.

Sur la base de ces caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques et les résultats des tests physiologiques et biochimiques, la souche Gal1^T est différente des genres les plus proches et pourrait être assignée à une nouvelle espèce d'un nouveau genre.

IV-2-7 : Profil des Acides Gras de la souche Gal1

L'analyse du profil d'Acide Gras de la souche Gal1 a montré que la paroi est majoritairement constituée de C16 : 0 (19,6%), et les deux principaux acides gras minoritaire sont le C14 : 0 (9,2 %) et le C18 : 1v7c (5,8 %) (Tableau 9).

Tableau 9 : Profil Acides Gras cellulaire de la souche Gall (méthode TSBA40, méthode de calcul TSBA40).

Les valeurs sont exprimées en pourcentage d'Acides Gras totaux

Fatty acids	Percentage (w/v) of total fatty acids
	1
C10 :0 FAME	0,07
C11 :0 DMA	0,52
C12:0 FAME	0,25
C13:1 cis-12 FAME	2,17
C14:0 FAME	9,21
C14:0 DMA	4,97
C14:0 3-OH FAME	0,32
C14:1 cis-7 DMA	0,84
C15:1 cis 9 or t 8 FAME	0,18
C15:2 FAME	4,45
C16:0 ALDE	2,53
C16:0 DMA	6,06
C16:1 cis-7 DMA	2,42
C16:1 cis-9 DMA	8,11
C16:0 FMAE	19,58
C16:0 3-OH FAME	0,96
C16:1 cis-7 FAME	0,98
C16:1 cis-9 FAME	2,52
C16:1 cis-11 FMAE	0,16
C17:2 FAME@16,760	1,28
C17:2 FAME@16,801	7,40
C18 :0 ALDE	0,33
C18:0 DMA	0,63
C18:1 cis-9 DMA	2,98
C18-1 cis-11 DMA	15,85
C18:0 FAME	0,49
C18:1 cis-9 FAME	0,74
C18:1 c11 or t9 or t6 FAME	3,87
C19:0 CYC 11,12 DMA	0,15

Les résultats obtenus avec cette souche Gall ont permis sa validation comme un nouveau genre : *Mobilisporobacter senegalensis* gen. nov., sp. nov dans IJSEM (**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**).

ARTICLE 2

Mobilisporobacter senegalensis gen. nov, sp. nov dans IJSEM (**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**).

Mobilisporobacter senegalensis gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium isolated from tropical shea cake

Malick Mbengue,^{1,2} Abdoulaye Thioye,^{1,2} Marc Labat,¹
Laurence Casalot,¹ Manon Joseph,¹ Abdoulaye Samb³
and Zouhaier Ben Ali Gam¹

Correspondence

Marc Labat

marc.labat@univ-amu.fr

¹Aix-Marseille Université, Université de Toulon, CNRS/INSU, IRD, UMR 235, MIO, UM 110,
163 Avenue de Luminy, Case 925, F-13288 Marseille, Cedex 09, France

²Laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Génie Industriel, Ecole Supérieure Polytechnique,
Université Cheikh Anta Diop, BP 5005 Dakar-Fann, Dakar, Senegal

³Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences et Techniques, Université Cheikh Anta Diop,
BP 5005 Dakar-Fann, Dakar, Senegal

A Gram-stain positive, endospore-forming, strictly anaerobic bacterium, designated strain Gal1^T, was isolated from shea cake, a waste material from the production of shea butter, originating from Saraya, Senegal. The cells were rod-shaped, slightly curved, and motile with peritrichous flagella. The strain was oxidase-negative and catalase-negative. Growth was observed at temperatures ranging from 15 to 45 °C (optimum 30 °C) and at pH 6.5–9.3 (optimum pH 7.8). The salinity range for growth was 0–3.5 % NaCl (optimum 1 %). Yeast extract was required for growth. Strain Gal1^T fermented various carbohydrates such as mannose, mannitol, arabinose, cellobiose, fructose, glucose, maltose, sucrose, trehalose and lactose and the major end-products were ethanol and acetate. The only major cellular fatty acid was C16 : 0 (19.6 %). The DNA base G + C content of strain Gal1^T was 33.8 mol%. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of the isolate indicated that this strain was related to *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T with 94.27 % similarity, *Clostridium populeti* ATCC 35295^T with 93.94 % similarity, and *Clostridium aminovalericum* DSM 1283^T and *Anaerosporeobacter mobilis* DSM 15930^T with 93.63 % similarity. On the basis of phenotypic characteristics, phylogenetic analysis and the results of biochemical and physiological tests, strain Gal1^T was clearly distinguished from closely related genera, and strain Gal1^T can be assigned to a novel species of a new genus for which the name *Mobilisporobacter senegalensis* gen. nov., sp. nov. is proposed. The type strain is Gal1^T (=DSM 26537^T=JCM 18753^T).

Several agricultural by-products are responsible for serious problems of pollution or the accumulation of toxic compounds throughout the Sudan-Sahelian area and particularly in Senegal. Because of their toxicity and low biodegradability, aromatic compounds are major players in these environmental problems. Of these by-products, shea cake is a waste material generated during the production of shea butter. Shea butter is extracted from the almond of *Vitellaria paradoxa* C. F. Gaertn. Shea cake, a by-product of shea butter, is essentially used in cosmetology and represents a solid waste produced by agri-food industries in many countries of West Africa (Yé *et al.*, 2007).

Physiological analysis on shea cake has demonstrated its utility in food processing (Yé *et al.*, 2007). Phenolic compounds and anti-methanogenic properties of shea cake have not yet been fully prospected. However, shea cake can potentially be used as an ingredient in livestock feed because of its richness in energy and proteins, but also for its capacity to eliminate the methanogen enteric bacteria (Bhatta *et al.*, 2012).

In view of the above, an investigation was conducted to isolate, from shea cake, bacteria that could detoxify shea cake for the valorization of this by-product.

In this paper, we report on the isolation and characterization of a novel strictly anaerobic, endospore-forming bacterium, obtained from shea cake, and its

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of Gal1^T is JX989386.

description as a representative of a novel species of a new genus, *Mobilisporobacter* gen. nov.

The shea butter manufacturing process generates much waste, which is deposited in the environment in Saraya, Senegal. Several samples were collected at several locations in this region where shea cake is rejected. Gal^T was isolated from one of these samples by using enrichment techniques as described by Mechichi *et al.* (1999).

A basal medium used for enrichment, isolation and cultivation was prepared using the anaerobic techniques described by Hungate (1969), and modified for use with syringes (Macy *et al.*, 1972; Miller & Wolin, 1974). The basal medium contained (per litre of distilled water): KH₂PO₄, 0.20 g; NH₄Cl, 0.30 g; NaCl, 1 g; KCl, 0.50 g; MgCl₂ · 6H₂O, 0.40 g; cysteine hydrochloride, 0.50 g; CaCl₂ · 2H₂O, 0.15 g; yeast extract, 0.50 g (Difco); trace-element solution (Widdel & Pfennig, 1981), 1 ml; and 1 ml of 0.1 % resazurin. The pH was adjusted to pH 7.0 with 10 M KOH solution, and the medium boiled under a stream of O₂-free N₂ gas and cooled at room temperature; 5 ml aliquots were dispensed into Hungate tubes

under N₂/CO₂ (80 : 20, v/v) and subsequently sterilized by autoclaving at 110 °C for 45 min. Prior to use, 0.2 ml 10 % (w/v) NaHCO₃ and 0.2 ml 2 % (w/v) Na₂S · 9H₂O were injected from sterile stock solutions into pre-sterilized basal medium.

A sample of 15 mg of shea cake was used to inoculate 5 ml of basal medium and incubated at 37 °C. For isolation purposes, the third generation of subcultured cells was serially diluted tenfold in the liquid medium. Each dilution was used to inoculate roll tubes, and single well-isolated colonies were picked up and serially diluted in fresh medium. The procedure was repeated until only one type of colony was observed. Purity was checked by microscopic examination of cultures grown in basal medium containing yeast extract. The last positive growth dilution showing single cell morphology was kept for further studies.

Physiologically optimal growth conditions were determined in duplicate experiments conducted in basal medium containing yeast extract (0.1 g l⁻¹) and glucose (20 mM). For pH growth experiments, the culture medium was adjusted to the desired pH using anaerobically

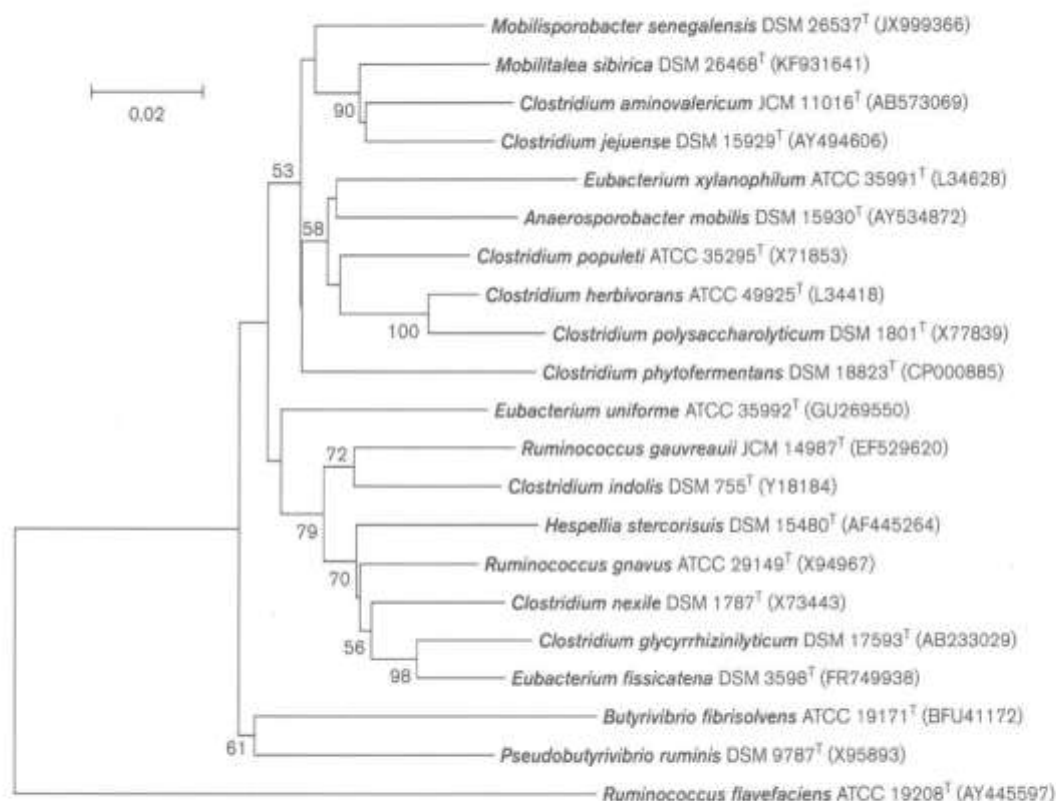


Fig. 1. Phylogenetic dendrogram based on 1306 unambiguous base pairs of 16S rRNA gene sequence data, showing the position of Gal^T. Bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications) greater than 50 % are shown at branch points. Numbers in parentheses are GenBank/EMBL/DBJ accession numbers for the 16S rRNA gene sequences. Bar, 2 % estimated sequence divergence.

prepared stock solutions of NaHCO_3 (10 %) or Na_2CO_3 (2 %). The temperature range for growth was determined using the same medium adjusted to the optimum growth pH. For studies of NaCl requirements, NaCl was weighed directly into the tubes at concentrations ranging from 0 to 40 g l⁻¹ before dispensing basal medium without NaCl followed by autoclaving. The tubes were incubated at 30 °C. Growth was measured by inserting tubes directly into a model Cary 50 Scan spectrophotometer (Varian) and measuring the OD₆₀₀.

Substrate utilization tests were carried out at 30 °C and an initial pH of 7.0, using the basal medium of Mechichi *et al.* (1999). Substrate utilization was determined using an 1100 chromatograph with a UV Detector (Hewlett Packard). Separation was achieved using a C₁₈-Symmetry (4.6 × 100 mm, 3.5 µm particle size) column (Waters Chromatography).

Substrates tested were mannose, mannitol, cellobiose, arabinose, fructose, glucose, sucrose, raffinose, lactose, trehalose, sorbose, adonitol, methanol, succinate, butyrate, lactate and butane-1,2-diol. All substrates were examined at a final concentration of 20 mM.

Genomic DNA was extracted according to the protocol described for the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega). 16S rRNA genes were amplified by using primers Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and Rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Reference sequences were obtained from the Ribosomal Database Project II (Maidak *et al.*, 2001) and GenBank databases (Benson *et al.*, 1999). The nucleotide sequence and the reference sequences were aligned using MUSCLE software (Edgar, 2004). The alignment obtained was edited in BioEdit (Hall, 1999) sequence alignment editor software and was corrected manually for errors. Pairwise evolutionary distances based on 1306 unambiguous nucleotides were computed by the Jukes & Cantor (1969) method. The phylogenetic tree, reconstructed with the TREECON program using the neighbour-joining method (Saitou & Nei, 1987), is shown in Fig. 1. The topology of the phylogenetic tree was also assessed by using the maximum-parsimony and maximum-likelihood algorithms (Tamura *et al.*, 2013).

The fatty acid composition of strain Gal1^T was determined at the Identification Service of the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany) using 2 × 10 ml of liquid culture (Sasser, 1990). The cellular fatty acid composition of strain Gal1^T was determined on the same basal medium to which yeast extract was added (0.5 %), and cultures of strain Gal1^T were stopped at the end of exponential phase and sent to the DSMZ for fatty acid analysis. Fatty acids were extracted using the method of Miller (1982), with the modifications of Kuykendall *et al.* (1988), and the profile of cellular fatty acids was analysed by gas chromatography using the Microbial Identification System (MIDI; method: TSBA40).

Enrichment cultures incubated for 3 weeks showed substantial bacterial activity. Cultures with positive growth were assessed visually by turbidity. After several

transfers in the same liquid medium, the enrichment cultures developed a stable microbial population. Several isolates were obtained after three successive serially diluted subcultures using the roll-tube method (Hungate, 1969) and single isolated colonies were selected from different enrichments obtained from different biotopes containing shea cake. Three of them were inventoried and finally named Gal1^T, Gal1p and Gal1t. Strain Gal1^T was chosen for further studies.

The cells of strain Gal1^T were strictly anaerobic, slightly curved rods 0.2–0.4 µm wide and 2–4 µm long, and occurred singly or in pairs. The cells were motile with peritrichous flagella. Strain Gal1^T stained Gram-positive, with terminal to subterminal spores that appeared mainly in old cultures. Electron microscopy of strain Gal1^T showed a thick, multi-layered, typical Gram-positive-type cell wall structure. An ultrathin section of strain Gal1^T showed a thinly stratified and slightly crenated structure (Fig. 2).

Strain Gal1^T was strictly anaerobic and mesophilic. No growth was observed below 15 °C or above 45 °C. Optimal growth occurred at 30 °C. Growth was observed from pH 6.5 to 9.3, with optimal growth at pH 7.8. Yeast extract was required for growth. Strain Gal1^T was oxidase-negative and catalase-negative. Indole was not produced; aesculin and gelatin were not hydrolysed. The following compounds were used: mannose, mannitol, arabinose, cellobiose, fructose, glucose, maltose, sucrose, trehalose and lactose. Several other substrates did not support growth: sorbose, adonitol, acetate, formate, butyrate, succinate, lactate, methanol and butane-1,2-diol. The major end-products from sugar utilization were ethanol and acetate.

The DNA G+C content determined by the Identification Service of the DSMZ was 33.8 mol%, based on the method of Mesbah *et al.*, (1989).

Analysis of the almost complete sequence of the 16S rRNA gene of strain Gal1^T (1542 bp) revealed that it was related to *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T with 94.27 % similarity,



Fig. 2. Electron microscopy of a cell of strain Gal1^T showing a thick, multi-layered, typical Gram-positive-type cell wall structure, thinly stratified and slightly crenated. Bar, 100 nm.

Clostridium populeti ATCC 35295^T with 93.94 % similarity, and *Clostridium aminovalericum* DSM 1283^T and *Anaerospirorbacter mobilis* DSM 15930^T with 93.63 % similarity. Positions of sequences with alignment uncertainties were omitted and 1306 unambiguously aligned base pairs were used in the analysis. The phylogenetic relationships between strain Gal1^T and the closest phylogenetic relative strains are shown in Fig. 1, where *Ruminococcus flavefaciens* ATCC 19208^T was used as an outgroup.

Strain Gal1^T differed morphologically and physiologically from the phylogenetically closest strains representing species with validly published names (Table 1). First, strain Gal1^T was a slightly curved rod, which differed from the closest relatives. In addition, strain Gal1^T grew between 15 and 45 °C with an optimum of 30 °C whereas the closest relative, *Mobilitalea sibirica*, had 37 °C as an optimum temperature for growth with a temperature range from 25 °C to 47 °C. Optimum pH for growth was slightly alkaline being pH 7.8 for strain Gal1^T, but it was neutrophilic with an optimum pH of 7.0–7.5 for the four nearest relatives. Also, strain Gal1^T grew in the presence of 0 to 3.5 % NaCl whereas *Mobilitalea sibirica* grew with up

to 8.5 %. NaCl range was not reported for strains of *C. populeti*, but strain Gal1^T grew with a NaCl optimum of 1 % instead of an optimum at 1.5 % as for *Mobilitalea sibirica* or 0.5 % as for *A. mobilis*.

Strain Gal1^T also showed differences from the four most closely related species in being fermentative and degrading more various carbohydrates and sugars comprising mannose, mannitol, cellobiose, arabinose, fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose and trehalose. Moreover, strain *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T differed from Gal1^T by its incapacity to use mannitol, arabinose, fructose, sucrose and lactose. Contrarily, strain *A. mobilis* DSM 15930^T differed from Gal1^T by its inability to use two substrates (mannitol and trehalose), whereas *C. populeti* ATCC 35295^T and *C. aminovalericum* were unable to grow on three substrates (mannose, lactose and trehalose).

The DNA G+C content determined by the Identification Service of the DSMZ was 33.8 mol%, based on the method of Mesbah *et al.* (1989). This value is approximately the same as that of *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T, but it differs significantly from those of *A. mobilis* DSM 15930^T and

Table 1. Comparison of the morphological and physiological properties of strain Gal1^T and related species

Strain: 1, Gal1^T (data from this study); 2 *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T (data from Podoskorskaya *et al.*, 2014); 3 *Clostridium populeti* ATCC 35295^T (data from Sleat *et al.*, 1985); 4 *Anaerospirorbacter mobilis* DSM 15930^T (data from Jeong *et al.*, 2007); 5 *Clostridium aminovalericum* DSM 1283^T (data from Hardman *et al.*, 1960); +, Positive; –, negative; NR, not reported. All strains were positive for utilization of cellobiose and glucose.

Characteristic	1	2	3	4	5
Morphology	Slightly curved rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Cell size	0.2–0.4 × 2–4	0.2–0.4 × 1.5–2.0	1–1.5 × 1.7–3	0.5–0.6 × 2.3–5.5	0.3–0.5 × 1.5–5.2
Habit	Shea cake	Microbial Mat	Woody biomass	Forest soil	Sewage sludge
Conditions for growth					
Temperature range (°C)	15–45	25–47	15–40	15–40	25–45
Optimum temperature (°C)	30	37	35	30	37
pH range	6.5–9.3	6.6–9.4	6.4–8.1	5.5–9.0	5.8–8.0
Optimum pH	7.8	7.0–7.5	7	6.5–7.0	NR
NaCl range (%)	0–3.5	0–8.5	NR	0–3.0	7.4–7.7
Optimum NaCl (%)	1	1.5	NR	0.5	0–6.5
16S rRNA gene sequence similarity to Gal1 ^T	100	94.27	93.94	93.63	93.63
DNA G+C content (mol%)	33.8	33.4	28	41	33
Motility	Peritrichous	From subpolar to laterally insert flagellum	Peritrichous	Peritrichous	Peritrichous
Endospore position	Subterminal to terminal	Terminal	Subterminal	Subterminal	Terminal
Substrate utilization					
Mannose	+	NR	–	+	–
Mannitol	+	–	NR	–	+
Arabinose	+	–	+	+	–
Fructose	+	–	+	+	–
Sucrose	+	–	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	–
Lactose	+	–	–	+	–
Trehalose	+	+	–	–	–

C. populeti ATCC 35295^T, which have 41 % and 28 % DNAG + C content, respectively.

The only major cellular fatty acid was C16 : 0 (19.6 %) and the two main minor cellular fatty acids were C14 : 0 (9.2 %) and C18 : 1 ω 7c (5.8 %) (Table 2). Strain Gal1^T was different from *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T in its cellular fatty acid profile. Both strains Gal1^T and *Mobilitalea sibirica* had C16 : 0 as a major cellular fatty acid, but *Mobilitalea sibirica* contained a high amount (30.5 %) whereas Gal1^T had 19.6 %. They also differed in the proportion of C14 : 0, which was 9.2 % for Gal1^T and 5.9 % for *Mobilitalea sibirica*.

Finally, based on the phenotypic, phylogenetic and genetic differences observed between strain Gal1^T and the most closely related species, *Mobilitalea sibirica*, which is a member of the family *Lachnospiraceae* (see Table 1), we propose the classification of the newly isolated strains as representatives of a novel species of the new genus *Mobilisporobacter*, and propose the name *Mobilisporobacter senegalensis* gen. nov., sp. nov.

Description of *Mobilisporobacter* gen. nov.

Mobilisporobacter (Mo.bi.li.spo.ro.bac'ter. L. adj. *mobilis* mobile; L. fem. Gr. n. *spora* a seed and, in biology, a spore; N.L. masc. n. *bacter* a rod; N.L. masc. n. *Mobilisporobacter* a motile, spore-forming, rod-shaped bacterium).

Gram-positive staining, endospore-forming, strictly anaerobic bacterium. Motile by means of peritrichous flagella. Various sugars, including glucose are fermented. The major end-products from glucose are ethanol and acetate. Oxidase and catalase are negative. Indole is not produced. Aesculin and gelatin are not hydrolysed. The type species is *Mobilisporobacter senegalensis*.

Table 2. Comparison of the cellular fatty acid methyl ester content of strain Gal1^T and its closest relatives

Strains: 1, Gal1^T (data from this study); 2, *Mobilitalea sibirica* DSM 26468^T (data from Podosokorskaya et al., 2014); 3, *Anaerospiribacter mobilis* DSM 15930^T (data from Jeong et al., 2007).

Fatty acid	1	2	3
C13 : 1 AT 12-13	3.4	NR	2.7
C14 : 0	9.2	5.9	1.8
C14 : 0 3-OH	0.3	NR	2.7
UN 14 959	3.8	NR	3.8
C16 : 0	19.6	30.5	24.0
C16 : 0 3-OH	0.9	NR	21.8
C16 : 1 ω 7c	1.0	NR	6.5
C16 : 1 ω 9c	2.5	NR	4.1
iso-C17 : 1 I or anteiso B	0.6	NR	11.9
C18 : 1 ω 7c	5.8	NR	7.8
C18 : 1 ω 9c	0.7	1.39	4.0
10-Methyl C19 : 0	0.2	NR	3.4

Description of *Mobilisporobacter senegalensis* sp. nov.

Mobilisporobacter senegalensis (se.ne.ga.len'sis N.L. masc. adj. *senegalensis* named after Senegal from where the sample of shea cake used for isolation originated).

Slightly curved rod-shaped cells, 0.2–0.4 μ m wide and 2–4 μ m long, occurring singly or in pairs. pH range for growth: pH 6.5–9.3, optimum at pH 7.8. Temperature range for growth: 15–45 °C, optimum at 30 °C. NaCl range for growth: 0–3.5 %, optimum at 1 %. Ferments a variety of carbohydrates (mannose, mannitol, cellobiose, arabinose, fructose, glucose, sucrose, maltose, lactose, trehalose). The only major cellular fatty acid is C16 : 0.

The type strain is Gal1^T (=DSM 26537^T=JCM 18753^T). Isolated from shea cake originating from Senegal. The G + C content of the DNA of the type strain is 33.8 mol%.

References

- Benson, D. A., Boguski, M. S., Lipman, D. J., Ostell, J., Ouellette, B. F. F., Rapp, B. A. & Wheeler, D. L. (1999). GenBank. *Nucleic Acids Res* 27, 12–17.
- Bhatta, R., Mani, S., Baruah, L. & Sampath, K. T. (2012). Phenolic composition, fermentation profile, protozoa population and methane production from Sheanut (*Butyrospermum parkii*) byproducts in vitro. *Asian-Australas J Anim Sci* 25, 1389–1394.
- Edgar, R. C. (2004). muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32, 1792–1797.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis proGram for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41, 95–98.
- Hardman, J. K. & Stadtman, T. C. (1960). Metabolism of ω -acids. II. Fermentation of delta-aminovaleic acid by *Clostridium aminovaleicum* n. sp. *J Bacteriol* 79, 549–552.
- Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for the cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol* 3B 117–132.
- Jeong, H., Lim, Y. W., Yi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y. & Chun, J. (2007). *Anaerospiribacter mobilis* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1784–1787.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21–132. Edited by H. N. Munro. 3. New York: Academic press.
- Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J. & Devine, T. E. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Bacteriol* 38, 358–361.
- Macy, J. M., Snellen, J. E. & Hungate, R. E. (1972). Use of syringe methods for anaerobiosis. *Am J Clin Nutr* 25, 1318–1323.
- Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Jr, Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M. & Tiedje, J. M. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 29, 173–174.
- Mechichi, T., Labat, M., Garcia, J. L., Thomas, P. & Patel, B. K. C. (1999). *Sporobacterium olearium* gen. nov., sp. nov., a new methanethiol-producing bacterium that degrades aromatic compounds, isolated from an olive mill wastewater treatment digester. *Int J Syst Bacteriol* 49, 1741–1748.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int J Syst Bacteriol* 39, 159–167.

- Miller, L. T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J Clin Microbiol* **16**, 584–586.
- Miller, T. L. & Wolin, M. J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl Microbiol* **27**, 985–987.
- Podosokorskaya, O. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Beskorovaynyy, A. V., Toshchakov, S. V., Kolganova, T. V. & Kublanov, I. V. (2014). *Mobilitalea sibirica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant polysaccharide-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 2657–2661.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406–425.
- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC News* **20**, 16.
- Sieat, R. & Mah, R. A. (1985). *Clostridium populeti* sp. nov., a cellulolytic species from a woody-biomass digester. *Int J Syst Bacteriol* **35**, 160–163.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Widdel, F. & Pfennig, N. (1981). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch Microbiol* **129**, 395–400.
- Yé, S., Lebeau, F., Wathelet, J. P., Leemans, V. & Destain, M. F. (2007). Étude des paramètres opératoires de pressage mécanique des amandes de *Vitellaria paradoxa* Gaertn C.F. (karité). *Biotechnol Agron Soc Environ* **11**, 267–273.

Les résultats obtenus au cours de cette étude pourraient permettre de trouver des pistes de valorisation des tourteaux de karité qui constituent un véritable déchet polluant. Les quatre souches isolées à partir des tourteaux de Karité (Gal1, Gal2, Gal3 et Tan1) sont capables d'utiliser les acides galliques et tanniques comme source de carbone. Il est aussi intéressant de noter que les bioconversions mises en évidence à partir de l'enrichissement de base peuvent nous permettre d'envisager des applications biotechnologiques concernant la valorisation des tourteaux de karité. Cette valorisation peut-être réalisée soit par détoxification, soit par production de molécules à haute valeur ajoutée. En effet, les travaux de Spier *et al.* (1987) ont montré que la production d'acide gallique à partir des tourteaux de karité pourrait contribuer à éliminer les effets indésirables des tannins dans ces résidus. Dans l'alimentation animale, la dégradation de l'acide tannique en acide gallique permet de réduire les effets antinutritionnels de ce résidu solide chez l'animal ; donc ces souches pourraient permettre l'utilisation des tourteaux de karité comme aliment de bétail. De même, cet acide aromatique, trihydroxylé est connu pour ses propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objet de ce travail était dans un premier temps l'identification des structures aromatiques majoritairement présentes dans les tourteaux de karité d'origine sénégalaise, et dans un deuxième temps, l'isolement, la caractérisation et l'identification de la microflore de ce sous-produit tropical.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré que les tourteaux de karité contenaient majoritairement un dérivé benzoïque généralement issu de structures tanniques : l'acide gallique à un taux d'environ 1,5 %. Aussi, avec les tourteaux de karité, à partir des trois échantillons initialement disponibles (tourteaux de coque, tourteaux d'amande et déchets issus de la purification du beurre de karité), les travaux réalisés ont montré que ne devraient être retenus que les tourteaux de coque pour une valorisation comme combustibles. Les déchets issus de la purification du beurre de karité doivent subir une extraction à l'hexane pour l'enlèvement du beurre résiduel afin d'être utilisés comme les tourteaux d'amande. Ces travaux ont également pu montrer que l'extraction directe au méthanol pur était préférable pour les tourteaux d'amande. Cette extraction ne permet pas la libération des composés aromatiques présents, mais présente tout de même un intérêt spécifique puisque après cette étape, une hydrolyse de ce sous-produit, suivie d'une extraction alcoolique du résidu solide obtenu, s'est révélée plus efficace, en donnant de meilleurs rendements pour l'obtention des structures aromatiques recherchées.

Ces travaux ont d'ailleurs fait l'objet d'une **publication dans la revue scientifique « *Afrique SCIENCE 11(6) (2015) 71 – 78.***

Les résultats de type analyse chimique obtenus dans cette première partie de travail ont permis d'initier l'isolement et l'identification de la microflore du tourteau de karité. Ainsi, les microorganismes actifs ont été particulièrement recherchés à partir des sites de stockage des tourteaux de karité.

Ces travaux ont permis l'isolement à partir d'enrichissements actifs dégradant les structures aromatiques de quatre souches bactériennes (Gal1, Gal2, Gal3 et Tan1) de morphologies variées. La caractérisation de ces quatre souches a été entièrement réalisée. D'abord, une étude phylogénétique des souches Gal1, Gal2, Gal3 et Tan1, isolées à partir de tourteau de Karité a été effectuée afin de sortir celles qui pourraient être décrites comme de nouvelles espèces et de faire leur caractérisation morphologique et physiologique en vue d'une valorisation de ces tourteaux. L'analyse phylogénétique a permis de voir que la souche Gal1 avait comme souche

la plus proche *Mobilitalea sibirica* DSM 26468T avec un pourcentage de similitude de 94,27 %. Elle a aussi montré que la souche Gal2 avait 99,47 % de similarité avec *Clostridium bifermentans* TYR6 et que Gal13 et Tan1 pourraient être des souches déjà décrites au sein du genre *Clostridium*. Les résultats de l'analyse phylogénétique nous ont donc conduits à la caractérisation de deux souches Gal1 et Gal2. La souche Gal1 est un bacille mobile, à flagellation péritriche. Les cellules sont isolées avec de fréquentes associations en paire et forment une endospore à position subterminale. Gal1 croît sur une gamme de température allant de 15 à 45 °C avec un optimum de croissance à 30 °C. La croissance est possible sur une gamme de pH allant de 6,5 à 9,3 avec un optimum observé à 7,8. La croissance est inhibée lorsque la concentration en sel atteint 3,5 %. La souche Gal1 est une bactérie anaérobie stricte capable d'utiliser le mannitol, le mannose, le cellobiose, l'arabinose, le fructose, le glucose, le sucrose, le maltose et le lactose. Les produits de la fermentation de la plupart de ces substrats sont l'éthanol et l'acétate. La teneur en (G+C) de l'ADN est de 33,8 %.

Ces résultats obtenus après caractérisation morphologique, physiologique et moléculaire ont permis de proposer et de valider la souche Gal1 comme étant un nouveau genre : ***Mobilisporobacter senegalensis*, gen. nov, sp. nov.** dans IJSEM (**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** (2016), **66**, 1383–1388. Quant à la souche Gal2, c'est un gros bâtonnet droit et immobile. Les cellules sont isolées ou en paire et forment une endospore réfringente à position subterminale. La souche Gal2 est mésophile et la température optimale de croissance est de 30 °C. La croissance est inhibée lorsque la concentration en sel atteint 3,5 %. Le pH optimal de croissance est de 7,7 et Gal2 croît sur une gamme de pH allant de 6,3 à 9,3. L'Hybridation ADN-ADN effectuée avec *Clostridium bifermentans* TYR6 a montré une homologie de 75,3 %. Il serait intéressant de continuer la caractérisation de la souche Gal2 pour voir si elle est réellement une sous-espèce de *Clostridium bifermentans*.

Les souches Gal1 et Gal2 ont été isolées grâce à leurs potentielles capacités à dégrader les composés aromatiques (notamment de l'acide gallique et des tannins) présents dans les tourteaux de karité. Afin de développer des procédés de dépollution et de valorisation des tourteaux de Karité, pour leur utilisation comme ingrédient dans l'alimentation du bétail, l'étude du métabolisme des composés aromatiques notamment de l'acide gallique et des tannins devrait être effectuée pour les souches Gal1 et Gal2. Cette valorisation peut être réalisée soit par détoxification, soit par production de molécules à haute valeur ajoutée comme les antioxydants. Une autre perspective serait pour les tourteaux de karité de faire un criblage

sur des souches possédant des activités de types estérases pour essayer de libérer le monomère aromatique majoritaire qu'est l'acide gallique et ainsi le produire de façon biotique. Ainsi, le label naturel pour ce composé pourrait permettre une valorisation en agroalimentaire et en industrie pharmaceutique en tant que antioxydant puissant. C'est dans ce sillage que des tests de stabilisation des anthocyanes du bissap par incorporation de l'acide gallique ont été initiés pour une meilleure valorisation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

[*] **Adams, M. W. W. & Kletzin, A. (1996).** Oxidoreductase-type enzymes and redox proteins involved in fermentative metabolisms of hypertermophilic *Arch. Adv. Prot. Chem.* **48**: 101-180.

[*] **Aires, A., Carvalho, R. & Saavedra, M. J. (2016).** Valorization of solid waste from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. *Waste Manage.* (New-york) **48**: 457-464.

[*] **Akihisa, T., Kojima, N., Katoh, N., Ichimura, Y., Suzuki, H., Fukatsu, M., Maranz, S. & Masters, E. T. (2010).** Triterpene alcohol and fatty acid composition of shea nuts from seven African countries. *J. Oleo. Sci.* **59** (7): 351-60

[*] **Altenschmidt, U., Oswald, B. & Fuchs, G. (1991).** Purification and characterization of benzoate-coenzyme A ligase and 2-aminobenzoate-coenzyme A ligase from denitrifying *Pseudomonas* sp. *J. Bacteriol.* **173**: 5494-5501.

[*] **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.

[*] **Andreotti, G., Cubellis, M. V., Nitti, G., Sannia, G., Mai, X., Adams, M. W. W. & Marino, G. (1995).** An extremely thermostable aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1161**: 19-27.

[*] **Anonyme. (1988).** Technologie industrielle de fabrication du beurre de karité. Société des Huiles et Savons du Burkina Faso.

[*] **Auburger, G. & Winter, J. (1995).** Isolation and physiological characterization of *Syntrophus buswellii* strain GA from a syntrophic benzoate-degrading, strictly anaerobic coculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 241-248.

B

[*] **Bache, R. & Pfennig, N. (1981).** Selective isolation of *acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* **130**: 255-261.

[*] **Baker, H. A. (1981).** Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 23-40

[*] **Ball, H. D., Johnson, H. A., Reinhard M. & Spormann, A. M. (1996).** Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *J. Bacteriol.* **178**: 5755-5761.

[*] **Ballerini, P., Di Iorio, P., Ciccarelli, R., Caciagli, F., Poli, A., Beraudi, A. et al. (2005).** P2Y1 and cysteinyl leukotriene receptors mediate purine and cysteinyl leukotriene co-release in primary cultures of rat microglia. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **18**: 255–268.

[*] **Basaraba, J. (1964).** Influence of vegetable tannins on nitrification in soil. *Plant Soil*, **21** : 8-16.

[*] **Basaraba, J. (1966).** Effects of vegetable tannins on glucose oxidation by various microorganisms. *Can. J. Microbiol.* **12** : 787-794.

[*] **Bhatta, R., Mani, S., Baruah, L. & Sampath, K. T. (2012).** Phenolic composition, fermentation profile, protozoa population and methane production from Sheanut (*Butyrospermum parkii*). *Byproducts in vitro.* **25**: 1389-1393.

[*] **Benson, D., Lipman, D. J. & Olstell, J. (1993).** GenBank. *Nucleic Acids Res.* **21**: 2963-2965.

[*] **Biegert, T., Fuchs, G. & Heider, J. (1996).** Evidence that oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate *Eur. J. Biochem.* **238**: 661-668.

[*] **Bisaillon, J. G., Lépine, F., Beaudet, R. & Sylvestre, M. (1991).** Carboxylation of *o*-cresol by an anaerobic consortium under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2131-2134.

[*] **Boll, M., Löffler, C., Morris, B. E. L. & Kung, J. W. (2014).** Anaerobic degradation of homocyclic aromatic compounds via arylcarboxyl-coenzyme A esters: organisms, strategies and key enzymes. *Environ. Microbiol.* **16 (3)** : 612–627.

[*] **Bonting, C. F. C., Schneider, S., Schmidetberg, G. & Fuchs, G. (1995).** Anaerobic degradation of *m*-cresol via methyl oxidation to 3-hydroxybenzoate by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **164**: 63-69.

[*] **Bonting, C. F. C. & Fuchs, G. (1996).** Anaerobic metabolism of 2-hydroxybenzoic acid (salicylic acid) by a denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **165**: 402-408.

[*] **Boopathy, R. & Kulpa, C. F. (1992).** Trinitrotoluene (TNT) as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium resembling *Desulfovibrio* sp. (B-strain) isolated from an anaerobic digester. *Curr. Microbiol.* **25**: 235-241.

[*] **Booth, G. H. (1960).** A study of the effect of plant tannins on the growth of sulfate-reducing bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **23** : 125-129.

[*] **Bossert, I. D. & Young, L. Y. (1986).** Anaerobic oxidation of *p*-cresol by a denitrifying bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1117-1122.

[*] **Boudjouref, M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire de magister Université Farhat Abbes – Sétif, pp 99.

[*] **Brauman, A., Koenig, J. F., Dutreix, J., & Garcia, J. L. (1990).** Characterization of two sulfate-reducing bacteria from the gut of the soil-feeding termite, *Cubitermes speciosus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **58** : 271-275.

[*] **Brauman, A., Müller, J. A., Garcia, J. L., Brune, A. & Schink, B. (1998).** Fermentative degradation of 3-hydroxybenzoate in pure culture by a novel strictly anaerobic bacterium, *Sporotomaculum hydroxybenzoicum* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 215-221.

[*] **Breure, A. M., & Van Andel, J. G. (1984).** Hydrolysis and acidogenic fermentation of a protein, gelatin, in an anaerobic continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 40-45.

[*] **Brooker, J. D., O'Donovan, L. A., Skene, I., Clarke, K., Blackall, L. & Muslera, P. (1994).** *Streptococcus caprinus* sp. nov., a tannin-resistant ruminal bacterium from feral goats. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**: 313-318.

[*] **Brune, A. & Schink, B. (1992).** Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici* : fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch. Microbiol.* **157**: 417-424.

[*] **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. *Lavoisier Technique & Documentation*. Paris.

[*] **Buckel, W. & Keese, R. (1995).** One-electron redox reactions of CoASH esters in anaerobic bacteria – a methanic proposal. *Angew. Chemie Int. Ed. Engl.* **34**: 1502-1506.

C

[*] **Cashion, P., Holder-Franklin, M. A., McCully, J. & Franklin, M. (1977).** A rapid method for the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal. Biochem.* **81** : 461-466.

[*] **Chamkha, M., Garcia, J. L., & Labat, M. (2001a).** Metabolism of cinnamic acids by some Clostridiales and emendation of the descriptions of *Clostridium aerotolerans*, *Clostridium celerecrescens* and *Clostridium xylanolyticum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2105-2111.

[*] **Chamkha, M., Labat, M., Patel, B. K. C., & Garcia J. L. (2001b).** Isolation of a cinnamic acid-metabolizing *Clostridium glycolicum* strain from oil mill wastewaters and emendation of the species description. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2049-2054.

[*] **Chamkha, M., Patel, B. K. C., Garcia, J. L., & Labat, M. (2001c).** Isolation of *Clostridium bifermentans* from oil mill wastewaters converting cinnamic acid to 3-phenylpropionic acid and emendation of the species. *Anaerobe*, **7**: 189-197.

[*] **Chandra, T., Krishnamurty, V., Madhavakrishana, W. & Nayudamma, Y. (1973).** Astringency in fruit: microbial degradation of wood apple tannin. *Leather Sci.* **20**: 269-273.

[*] **Cheynier, V., Prieur, C., Guyot, S., Rigaud, J. & Moutounet, M. (1996).** The structures of tannins in grapes and wine and their interactions with proteins. *Abs. Paper. Am. Chem. Soc.* 210-226.

[*] **Colin, F. & Munk-Koefoed, N. (1988).** Evaluation de la biodégradabilité dans le traitement anaérobie des effluents et boues industriels. In *Anerobic Digestion. Proc. Inc. Symp.*, pp. 471-478. Edited by Hall, E. R. & Hobson, P. N. Pergamon press, New-York.

[*] **Cord-Ruwish, R. (1985).** A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **4**: 33-36.

[*] **Crawford, R. L., McCoy, E., Harkin, J. M., Kirk, T. K. & Obst, J. R. (1973).** Degradation of methoxylated benzoic acids by a *Nocardia* from a lignin-rich environment: significance to lignin degradation and effect of chloro substituents. *Appl. Microbiol.* **26**: 176-184.

D

[*] **Dagley, S. (1978).** Microbial catabolism, the carbon cycle and environmental pollution. *Naturwissenschaften*, **65**: 85-95.

[*] **Danikuu, F. M., Quainoo, A. & Sowley E. N. K. (2015).** Physico-chemical characteristics and microbial population dynamics of shea nut cake polluted soil in northern Ghana. *UDSIJD*. **1**: 1-10.

[*] **Davidson, P. M. & Branden, A. L. (1981).** Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *J. Food Protect.* **44**: 623-632.

[*] **De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970).** The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* **12**: 133-142.

[*] **De Muelenaere G. (1997).** Proposal for a Directive Relating to Cocoa and Chocolate products Consequences for Exporting and Importing Countries. *European Union*. Pp. 34.

[*] **Denger, K., Kertesz, M. A., Vock, E. H., Schön, R., Mägli, A. & Cook, A. M. (1996).** Anaerobic desulfonation of 4-tolylsulfonate and 2(4-sulfophenyl)butyrate by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1526-1530.

[*] **Deschamps, A. M. (1985).** Contribution à l'étude de la biodégradation des écorces et de leurs constituants par les bactéries et essais d'utilisation des souches isolées. Thèse d'Université de Technologie, Compiègne, France.

[*] **Deschamps, A. M. (1989).** Plant cell wall polymers: biogenesis and biodegradation. In: *American Chemical Society*, pp. 559-567. Edited by Lezis N. G. & Paice M. G., Washington, USA.

[*] **DeWeerd, K. A., Saxena, A., Nagle, D. P. & Suflita, J. M. (1988).** Metabolism of the ¹⁸O-methoxy substituent of 3-methoxybenzoic acid and other unlabeled methoxybenzoic acids by anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1237-1242.

[*] **Diaz, E., Jiménez, J. I. & Nogales, J. (2013).** Aerobic degradation of aromatic compound. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**: 431-442.

[*] Elder, D. J. & Kelly, D. J. (1994). The bacterial degradation of benzoic acid and benzoid compounds under anaerobic conditions : unifying trends and new perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 441-468.

[*] Escara, J. F. & Hutton, J. F. (1980). Thermal stability and renaturation of DNA in dimethylsulphoxide solutions: acceleration of renaturation rate. *Biopolymers*, **19**: 1315-1327.

[*] Evans, W. C. (1977). Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic environment. *Nature*, **270**: 17-22.

[*] Evans, P. J., Ling, W., Goldschmidt, B., Ritter, E. R. & Young, L. Y. (1992). Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationships to the initial steps of toluene mineralisation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 496-501.

F

[*] Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.

[*] Field, J. A. & Lettinga, G. (1989). The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. *Biol. Wastes*, **29**: 161-179.

[*] Field, J. A. & Lettinga, G. (1992). Biodegradation of tannins. *Metal Ions in Biological Systems*, **28**: 61-97.

[*] Finck, J. D. & Goma, G. (1978). Les principes fondamentaux des mécanismes de la fermentation méthanique. *Biomasse actualité*, **2**: 5-11.

G

[*] **Garcia, J. L. (1995).** Ecologie microbienne de la méthanogenèse. Approches moléculaires, biochimique et physiologique du fonctionnement des écosystèmes anaérobies. Polycopié Universités de Provence et de la Méditerranée. 22 p.

[*] **Gibson, D. T. & Subramanian, V. (1984).** In *Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons*, pp. 182-252. Edited by Gibson, D., New York.

[*] **Glew, D. & Lovett, P. N. (2014).** Life cycle analysis of shea butter use in cosmetics: from parklands to product, low carbon opportunities *J. Clean. Prod.* **68**: 73-80.

[*] **Gößner, A., Daniel, S. L. & Drake, H. L. (1994).** Acetogenesis coupled to the oxidation of aromatic aldehyde groups. *Arch. Microbiol.* **161**: 126-131.

[*] **Gollakota, K. J. & Sarada, R. (1988).** In *Anaerobic Digestion*, pp. 281-285. Edited by Hall E. R. & Hobson P. N., Pergamon Press, Oxford.

[*] **Gorny, N. & Schink, B. (1994a).** Anaerobic degradation of catechol by *Desulfobacterium* sp. strain Cat2 proceeds via carboxylation to protocatechuate. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**: 3396-3400.

[*] **Gorny, N. & Schink, B. (1994b).** Hydroquinone degradation via reductive dehydroxylation of gentisyl-CoA by a strictly anaerobic fermenting bacterium. *Arch. Microbiol.* **161**: 25-32.

[*] **Grant, W. D. & Corden, M. E. (1976).** Microbial degradation of condensed tannins. *Science* **193**: 1137-1139.

[*] **Grech-Mora, I., Fardeau, M. L., Patel, B. K. C., Ollivier, B., Rimbault, A., Prensier, G., Garcia, J. L. & Garnier-Sillam, E. (1997).** Isolation and characterization of *Sporobacter termitidis* gen. nov., sp. nov., from the digestive tract of the wood-feeding termite *Nasutitermes lujae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 512-518.

[*] **Gupta, R. K. & Haslam, E. (1980).** Vegetable tannins structure and biosynthesis. In *Polyphenols in Cereals and Legumes*, pp. 15-24. Edited by Hulse J. H. *Int. Develop. Research Center*, Ottawa, Canada.

H

[*] **Hagerman A.E, Reidl K.M., Rice Robin E. (2000).** Tannins as biological antioxidants. *Chem. Biol. Pharmacol.* **2** : 495-505.

[*] **Hall, T. A. (1999).** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis proGram for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* **41**: 95–98.

[*] **Häner, A., Höhener, P. & Zeyer, J. (1995).** Degradation of *p*-xylene by a denitrifying enrichment culture. *Appl. Env. Microbiol.* **61**: 3185-3188.

[*] **Harayama, S. & Kok, M. (1992).** Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Ann. Rev.Microbiol.* **46**: 565-601.

[*] **Hardman, J. K. & Stadtman, T. C. (1960).** Metabolism of v-acids. II. Fermentation of delta-aminovaleric acid by *Clostridium aminovalericum* n. sp. *J Bacteriol.* **79**: 549–552.

[*] **Härtel, U., Ecker, E., Koch, J., Fuchs, G., Linder, D. & Buckel, W. (1993).** Purification of glutaryl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas* sp., an enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate. *Arch. Microbiol.* **159**: 174-181.

[*] **Haslam, E. (1974).** Polyphenols-protein interactions. *Biochem. J.* 139-285.

[*] **Haslam, E. (1979).** Vegetable tannins. In *Biochemistry of plant phenolics*, pp. 475-523. Edited by Swain T., Harborne J. B. & Van Sumere C. F. *Plenum Press*, New York.

[*] **Heider, J. & Fuchs, G. (1997a).** Microbial anaerobic aromatic metabolism. *Anaerobe*, **3**: 1-22.

[*] Heider, J. & Fuchs, G. (1997b). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *Eur. J. Biochem.* **243**: 577-596.

[*] Heising, S., Brune, A. & Schink, B. (1991). Anaerobic degradation by a newly isolated nitrate-reducing bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**: 267-272.

[*] Hillis, W. E. (1985). Biosynthesis of tannins. In *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, pp. 325-346. Academic Press Inc, London.

[*] Hopper, D. J., Bossert, I. D. & Rodes-Roberts, M. E. (1991). *p*-Cresol-methylhydroxylase from a denitrifying bacterium involved in anaerobic degradation of *p*-cresol. *J. Bacteriol.* **173**: 1298-1301.

[*] Hungate, R. E. (1969). A roll-tube method for the cultivation of strict anaerobes. *Meth. Microbiol.* **136**: 194-198.

[*] Huss, V. A. R., Festel, H. & Scheilfer, K. H. (1983). Studies on the spectrometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Syst. Appl. Microbiol.*, **4**: 184-192.

J

[*] Jackson, B. E., Bhupathiraju, V. K., Tanner, R. S., Woese, C. R. & McInerney, M. J. (1999). *Synthrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Arch. Microbiol.* **171**: 107-114.

[*] Jahnke, K. D. (1992). Basic computer program for evaluation of spectroscopic DNA renaturation data from GILFORD system 2600 spectrometer on a PC/XT/AT type personal computer. *J. Microbiol. Methods*, **15**: 61-73.

[*] Jeong, H., Lim, Y. W., Yi, H., Sekiguchi, Y., Kamagata, Y. & Chun, J. (2007). *Anaerosporobacter mobilis* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**: 1784–1787.

[*] Jones, G. A., McAllister, T. A., Muir, A. D. & Cheng, K. J. (1994). Effect of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1374-1378.

[*] Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York : Academic Press.

K

[*] Kawamoto, H., Nakatsubo, F. & Murakami, K. (1996). Stoichiometric studies of tannin-protein coprecipitation. *Phytochem.* **41**: 1427-1431.

[*] Kim, S. (2009). Environment-friendly adhesives for surface bonding of wood-based flooring using natural tannin to reduce formaldehyde and TVOC emission. *Bioresource Technology.* **100** (2): 744- 748.

[*] Klass, D. L. (1984). Methane from anaerobic fermentation. *Science*, **223**: 1021-1028.

[*] Kluge, C., Tschuch, A. & Fuchs, G. (1990). Anaerobic metabolism of resorcylic acids (m-dihydroxybenzoic acids) and resorcinol (1,3-benzenediol) in a fermenting and denitrifying bacterium. *Arch. Microbiol.* **158**: 48-53.

[*] Koch, J. & Fuchs, G. (1992). Enzymatic reduction of benzoyl-CoA to alicyclic compounds, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* **205**: 195-202.

[*] Koch, J., Eireich, W., Bacher, A. & Fuchs, G. (1993). Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* **211**: 649-661.

[*] **Konlan, S. P. (2010).** Shea Nut Cake In Supplemental Concentrate For Growing Djallonke Rams Fed A Basal Diet Of Rice Straw And Groundnut Haulms In the Dry Season. Thesis submitted to the *Kwame Nkrumah University of Science and Technology*, Kumasi.

[*] **Krumholz, L. R. & Bryant, M. P. (1986a).** *Eubacterium oxidoreducens* sp. nov., requiring H₂ or formate to degrade gallate, pyrogallol, phloroglucinol and quercetin. *Arch. Microbiol.* **144**: 8-14.

[*] **Krumholz, L. R. & Bryant, M. P. (1986b).** *Syntrophococcus sucromutans* gen. nov., sp. nov., uses carbohydrates as electron donors and formate, methoxymonobenzenoids or *Methanobrevibacter* as electron acceptor systems. *Arch. Microbiol.* **143**: 313-318.

[*] **Krumholz, L. R., Crawford, R. L., Hemling, M. E. & Bryant, M. P. (1987).** Metabolism of gallate and phloroglucinol in *Eubacterium oxidoreducens* via 3-hydroxy-5-oxohexanoate. *J. Bacteriol.* **169**: 1886-1890.

[*] **Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J. & Devine, T. E. (1988).** Fatty acids, antibiotic resistance and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Bacteriol* **38**: 358–361.

L

[*] **Lack, A. & Fuchs, G. (1992).** Carboxylation of phenylphosphate by phenol carboxylase, an enzyme system of phenol metabolism. *J. Bacteriol.* **174**: 3629-3636.

[*] **Lack, A. & Fuchs, G. (1994).** Evidence that phenol phosphorylation to phenylphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.* **161**: 306-311.

[*] **Lack, A., Tomassi, I., Aresta, M. & Fuchs, G. (1991).** Catalytic properties of phenol carboxylase: *in vitro* study of CO₂: 4-hydroxybenzoate isotope exchange reaction. *Eur. J. Biochem.* **197**: 473-479.

[*] Lamien, N., Boussim, J. I., Nygard, R., Ouédraogo, J. S., Odén, P. C., Guinko, S. (2006). Mistletoe impact on Shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn.) flowering and fruiting behaviour in savanna area from Burkina Faso. *Environmental and Experimental Botany*. **55**: 142–148.

[*] Le Ruyet, P. (1984). Hydrolyse et fermentation des polysides végétaux par les bactéries anaérobies. Thèse de docteur-ingénieur en biologie et physiologie végétale. Université des Sciences et Techniques de Lille I, France.

[*] Lewis, J. A. & Papavizas, G. C. (1967). Effect of tannins on spore germination and growth of *Fusarium solani*, *Fusarium phaseoli* and *Verticillium albo-atrum*. *Can. J. Microbiol.* **13**: 1655-1661.

[*] Lewis, J. A. & Starkey, R. L. (1969). Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms. *Soil Sci.* **107**: 235-241.

[*] Liesack, W., Back, F., Kreft, J. U. & Stackebrandt, E. (1994). *Holofaga foetida* gen. nov., sp. nov., a new homoacetogenic bacterium degrading methoxylated aromatic compounds. *Arch. Microbiol.* **162**: 85-90.

[*] Ljungdhal, L. G. & Erikson, K. E. (1985). Ecology of microbial cellulose degradation. In: *Advances in Microbial Ecology*, vol. 8 pp. 237-299. Marshall K.C. Plenum Publishing Corporation.

[*] Lochmeyer, C., Koch, J. & Fuchs, G. (1992). Anaerobic degradation of 2-aminobenzoic acid (anthranilic acid) via benzoyl-CoA and cyclohex-1-enecarboxyl-CoA in a denitrifying bacterium. *J. Bacteriol.* **174**: 3621-3628.

M

[*] **Macheix, J. J., Fleuriet, A., Jay-Allemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, Lausanne, pp. 4-5.

[*] **Mai, X., & Adams, M. W. W. (1994).** Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: a new enzyme involved in peptide fermentation. *J. Biol. Chem.* **269**: 16726-16732.

[*] **Mai, X., & Adams, M. W. W. (1996).** Purification and characterisation of two reversible and ADP-dependent acetyl coenzymz.A synthetases from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **178**: 5897-5903.

[*] **Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M. J. & Woese, C. R. (1996).** The ribosomal database project (RDP). *Nucleic Acids Res.* **24** : 82-85.

[*] **Maidak, B. L., Olsen, G. J., Larsen, N., Overbeek, R., McCaughey, M. J. & Woese, C. R. (1997).** The Ribosomal Database Project (RDP). *Nucleic Acids Res.* **25**: 109-111.

[*] **Mahadevan, A. (1974).** Detoxification mechanisms of plant pathogens. *J. Sci. Ind. Res.* **33**: 131-138.

[*] **Mahadevan, A. & Muthukumar, G. (1980).** Aquatic microbiology with reference to tannin degradation. *Hydrobiologia*, **72**: 73-79.

[*] **McInerney, M. J. (1988).** Anaerobic hydrolysis and fermentation of fats and proteins. In: *Biology of anaerobic organisms*, pp. 373-409. A. J. B. Zehnder (ed). John Wiley, N. Y.

[*] **Mechichi, T., Labat, M., Woo, T. H. S., Thomas, P., Garcia, J. L. & Patel, B. K. C. (1998).** *Eubacterium aggregans* sp. nov., a new homoacetogenic bacterium from olive mill wastewater treatment digester. *Anaerobe*, **4**: 283-291.

[*] **Mechichi, T., Labat, M., Patel, B. K. C., Woo, T. H. S., Thomas, P. & Garcia, J.-L. (1999).** *Clostridium methoxybenzovorans* sp. nov., a new aromatic *o*-demethylating

homoacetogen from an olive mill wastewater treatment digester. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1201-1209.

[*] Mechichi T., Labat M., Garcia J. L., Thomas P., & Patel B. K. C. (1999). “*Sporobacterium olearium* gen. nov., a new methanethiol-producing bacterium that degrades aromatic compounds, isolated from an olive mill wastewater treatment digester”. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **49**: 1741-1748.

[*] Meshbah, M., Premachandran, U. & Withman, W. B (1989). Precise measurement of the G + C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39** : 159-167.

[*] Metche, M. & Girardin, M. (1980). Les tanins des végétaux. In *Les polymères végétaux- Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*, pp. 251-287. Edited by Costes, C. Gauthier-Villars.

[*] Metzler, D. E. (1977). *Biochem.* Academic Press, London

[*] Miller, T. L. & Wolin, M. J. (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* **27**: 985-987.

[*] Miller, L. T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J Clin Microbiol* **16**: 584–586.

[*] Misoph, M., Daniel, S. L. & Drake, H. L. (1996). Bidirectional usage of ferulate by the acetogen *Peptostreptococcus productus* U-1 : CO₂ and aromatic acrylate groups as competing electron acceptors. *Microbiol.* **142**: 1983-1988.

[*] Mitsunaga, T. (1999). Anticarcinogenic activity of bark proanthocyanidins. Plant polyphenols **2** : *Chem. Biol. Pharmacol.* pp. 555-573.

[*] **Mohamed, M. E., Seyfried, B., Tschech, A. & Fuchs, G. (1993).** Anaerobic oxidation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-CoA and CO₂ in denitrifying *Pseudomonas* sp. Evidence for an α -oxidation mechanism. *Arch. Microbiol.* **159**: 563-573.

[*] **Mohn, W. W. & Tiedje, J. M. (1992).** Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56**: 482-507.

[*] **Moore, S. (2008).** The Role of *Vitellaria paradoxa* in poverty reduction and food security in the Upper East region of Ghana. *Earth. Environ.* **3** : 209-245.

[*] **Mueller-Harvey, I. (2006).** Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. food. Agr.* **86**: 2010-2034.

N

Natarajan, K. & Rajendran A. (2009). Effect of Fermentation Parameters on Extra Cellular Tannase Production by *Lactobacillus plantarum* MTCC 1407. *J. Chem.* **6 (4)**: 979-984.

[*] **Nelson, K. E., Pell, A. N., Schofield, P. & Zinder, S. (1995).** Isolation and characterization of an anaerobic ruminal bacterium capable of degrading hydrolysable tannins. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3293-3298.

[*] **Nemoto, K., Osawa, R., Hirota, K., Ono, T. & Miyake, Y. (1995).** An investigation of Gram-negative tannin-protein complex degrading bacteria in fecal flora of various mammals. *J. Vet. Med. Sci.* **57**: 921-926.

O

[*] **Osawa, R. (1992).** Tannin-protein complex degrading enterobacteria isolated from the alimentary tracts of koalas and a selective medium for their enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1754-1759.

[*] Osawa, R., Rainey, F., Fujisawa, T., Lang, E., Busse, H. J., Walsh, T. P. & Stackebrandt, E. (1995b). *Lonepinella koalarum* gen. nov., sp. nov., a new tannin-protein complex degrading bacterium. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 368-373.

[*] Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S. & Shimizu, A. (2000). Isolation of tannin-degrading Lactobacilli from Humans and fermented foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3093-3097.

[*] Ouattara, A. T. (1994). La biodégradation des sous-produits des industries agroalimentaires pour la protection de l'environnement: cas des tourteaux de karité des huileries de Burkina Faso. Thèse de l'Université de Ouagadougou, Burkina Faso.

[*] Ozawa, T., Lilley, T. H. & Haslam, E. (1987). Polyphenol interactions : astringency and the loss of astringency ripening fruit. *Phytochem.* **26**: 2937-2942.

P

[*] Pacheco-Sánchez, D., Molina-Fuentes, A., Marín, P., Medina-Bellver, J. I., González-López, O. & Marqués S. (2017). *Azoarcus anaerobius* 1,3-dihydroxybenzene (resorcinol) anaerobic degradation 2 pathway is controlled by the coordinated activity of two enhancer-binding proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**(9): 1-30.

[*] Patel, T. R., Jure, K. G. & Jones, G. A. (1981). Catabolism of phloroglucinol by the rumen anaerobe *Coprococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 1010-1017.

[*] Pelletier, D. A. & Harwood, C. S. (1996). Cloning, sequencing and overexpression of gene encoding 2-ketocyclohexane-carboxyl-CoA hydrolase, a ring-cleavage enzyme from anaerobic benzoate-grown *Rhodopseudomonas palustris*. *Abst. 96th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, London.

[*] Podosokorskaya, O. A., Bonch-Osmolovskaya, E. A., Beskorovaynyy, A. V., Toshchakov, S. V., Kolganova, T. V. & Kublanov, I. V. (2014). *Mobilitalea sibirica* gen.

nov., sp. nov., a halotolerant polysaccharide-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 2657–2661.

[*] **Pometto III, A. L., Sutherland, J. B., & Crawford D. L. (1981).** *Streptomyces setonii*: catabolism of vanillic acid via guaiacol and catechol. *Can. J. Microbiol.* **27**: 636-638.

[*] **Porter, L. J. & Woodruffe, J. (1984).** Haemanalysis: the relative astringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochem.* **23**: 1255-1256.

[*] **Pratt, D. E., Powers, J. J., & Somaatmadja, D. (1960).** Anthocyanins : the influence of strawberry and grape anthocyanins on the growth of certain bacteria. *Food Res.* **25**: 26-32.

[*] **Preuss, A., Fimpel, J. & Diekert, G. (1993).** Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.* **159**: 345-353.

R

[*] **Rabus, R. & Widdel, F. (1995a).** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by a new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **163**: 96-103.

[*] **Rabus, R. & Widdel, F. (1995b).** Conversion studies with substrate analogues of toluene in a sulfate-reducing bacterium, strain Tol2. *Arch. Microbiol.* **164**: 448-451.

[*] **Rabus, R. & Widdel, F. (1996).** Utilisation of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1238-1241.

[*] **Ramanand, K. & Suflita, J. M. (1993).** Carboxylation and mineralization of *m*-cresol by a sulfate reducing enrichment. *Curr. Microbiol.* **26**: 1-9.

[*] **Reichenbecher, W., Brune, A. & Schink, B. (1994).** Transhydroxylase of *Pelobacter acidigallici*: a molybdoenzyme catalysing the conversion of pyrogallol to phloroglucinol. *Biochem. Biophys. Acta*, **1204**: 217-224.

[*] **Reichenbecher, W., Rüdiger, A., Kroneck, P. M. H. & Schink, B. (1996).** One molecule of molybdopterin guanine dinucleotide is associated with each subunit of the heterodimeric Mo-Fe-S protein transhydroxylase of *Pelobacter acidigallici* as determined by SDS/PAGE and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.* **237**: 406-413.

[*] **Ribéreau-Gayon P. (1968a).** “Nature des substances et leur répartition dans le règne végétal”. In *Les composés phénoliques des végétaux*,. Edited by Dunod. Paris. pp. 88-91.

[*] **Ribéreau-Gayon P. (1968b).** “Les composés phénoliques présents dans la nature sous forme de polymère”. In *Les composés phénoliques des végétaux*. Edited by Dunod. Paris. pp. 21-27.

[*] **Rice, E. L. & Pancholy, S. K. (1973).** Inhibition of nitrification by climax ecosystems. Additional evidence and possible role of tannins. *Am. J. Bot.* **60**: 691-702.

[*] **Reuter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F. A., Jannasch, H. W. & Widdel, F. (1994).** Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by denitrifying bacteria. *Nature*, **372**: 455-458.

[*] **Roberts, J., Fedorak, P. M. & Hrudey, S. E. (1990).** CO₂ incorporation and 4-hydroxy-2-methylbenzoic acid formation during anaerobic metabolism of *m*-cresol by a methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 472-478.

[*] **Ross, W. D. & Corden, M. E. (1974).** Selective degradation of lignin and condensed tannins of Douglas-fir bark sclereids by fungi. *Wood Fiber*, **6**: 2-12.

[*] **Rudolphi, A., Tschech, A & Fuchs, G. (1991).** anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**: 238-248.

S

[*] Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 405-425.

[*] Sakagamia, H., Satoh, K., Ida, Y., Koyama, N., Premanathan, M., Arakaki, R., (2000). Induction of apoptosis and anti-hiv activity by tannin and lignin related substances. Plant polyphenols 2 : *Chem. Biol. Pharmacol.* pp. 595-611.

[*] Sánchez-Martín, J., González-Velasco, M. & Beltrán-Heredia, J. (2009). *Acacia mearnsii* de wild tannin-based flocculant in surface water treatment. *J. Wood Chem. Technol.* **29** (2): 119-135.

[*] Sánchez-Martín, J., Beltrán-Heredia, J. & Solera-Hernández C. (2010). Surface Water and Wastewater Treatment Using a New Tannin-Based Coagulant pilot plant Trials, *J. Environ Manag.* **91**: 2051-2058.

[*] Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. *USFCC Newsl.* **20**: 16.

[*] Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* **30**: 3875-3883.

[*] Schnell, S., Bak, F. & Pfennig, N. (1989). Anaerobic degradation of aniline and dihydroxybenzenes by newly isolated sulfate-reducing bacteria and description of *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* **152**: 556-563.

[*] Schnell, S., Brune, A & Schink, B. (1991). Degradation of hydroxyhyrdoquinone by the strictly anaerobic fermenting bacterium *Pelobacter massiliensis* sp. nov. *Arch. Microbiol.* **155**: 511-516.

[*] Schnel, S. & Schink, B. (1992). Anaerobic degradation of 3-aminobenzoate by a newly isolate sulfate reducer and a methanogenic enrichment culture. *Arch. Microbiol.* **158**: 328-334.

[*] Seyfried, B., Tschuch, A. & Fuchs, G. (1991). Anaerobic degradation of phenylacetate and 4-hydroxyphenylacetate to benzoyl-CoA and CO₂ in denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**: 249-255.

[*] Siebert, K. J., Troukhanova, N. V. & Lynn, P. Y. (1996). Nature of polyphenols-protein interactions. *J. Agr. Food Chem.* **44**: 80-85.

[*] Sleat, R. & Mah, R. A. (1985). *Clostridium populeti* sp. nov., a cellulolytic species from a woody-biomass digester. *Int J Syst Bacteriol.* **35**: 160–163.

[*] Spencer, C. M., Cai, Y., Martin, R., Gaffney, S. H., Goulding, P. N., Magnolato, D., Lilley, T. H. & Haslam, E. (1988). Polyphenols complexations: Some thoughts and observations. *Phytochem.* **27**: 2397-2409.

[*] Spier, S. J., Smith, B. P., Seawright, A. A., Norman, B. B., Ostrowski, S. R. & Oliver, M. N. (1987). Oak toxicosis in cattle in northern California: clinical and pathologic findings, *J. Am. Vet. Med Assoc.* **191**: 958-964.

[*] Stackebrandt, E., Kramer, I., Swiderski, J. & Hippe, H. (1999). Phylogenetic basis for a taxonomic dissection of the genus *Clostridium*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **24**: 253-258.

[*] Stupperich, E., Konle, R. & Eckerskom, C. (1996). Anaerobic O-demethylation of methoxynaphtols, metho and fluoroanisols by *Sporomusa ovata*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **233**: 770-777.

[*] Sutherland, J. B., Crawford, D. L., & Pometto III, A. L. (1983). Metabolism of cinnamic, *p*-coumaric, and ferulic acids by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1253-1257.

[*] Swain, T. & Bate-Smith, E. C. (1962). In *Comparative Biochemistry*, vol. 3A, pp. 755-809. Academic Press, New York.

T

[*] Takechi, M., Tanaka, Y. Takehara, M., Nonaka, G. I. & Nishioka, I. (1985). Structure and antiherpetic activity among the tannins. *Phytochem.* **24**: 2245-2250.

[*] Tarvin, D. & Buswell, A. M. (1934). The methane fermentation of organic acids and carbohydrates. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 1751-1755.

[*] Tschech, M. & Pfennig, N. (1984). Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **137**: 163-167.

[*] Tschech, M. & Fuchs, G. (1987). Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* **148**: 213-217.

U

[*] Utkin, I., Woese, C. R. & Wiegel, J. (1994). Isolation and characterization of *Desulfitobacterium dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates chlorophenolic compounds. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 612-619.

V

[*] van Loon, W. M. G. M., Boon, J. J. & De Groot, B. (1993). Quantitative analysis of sulfonic acid groups in macromolecular lignosulfonic acids and aquatic humic substances by temperature-resolved pyrolysis-mass spectrometry. *Environ. Sci. Tech.* **27**: 2387-2396.

W

[*] Wallrabenstein, C. & Schink, B. (1994). Evidence of reverse electron transport in syntrophic butyrate or benzoate oxydation by *Syntrophomonas wolfei* and *Syntrophus buswellii*. *Arch. Microbiol.* **162**: 136-142.

[*] Wallrabenstein, C., Gorny, N., Springer, N., Ludwig, W. & Schink, B. (1995). Pure cultures of *Syntrophus buswellii*, definition of its phylogenetic status, and description of *Syntrophus gentianae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 62-66.

[*] Widdel, F. & Pfennig, N. (1981). Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* **129**: 395-400.

[*] Widdel, F. & Pfennig, F. (1984). Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. In : Krieg N. R., Holt J. G. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, pp 663-679.

[*] Winker, S. & Woese, C. R. (1991). A definition of the domain *Archea*, *Bacteria*, and *Eucarya* in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**: 161-165.

Z

[*] Zhang, X., Mandelco, L. & Wiegel, J. (1994). *Clostridium hydroxybenzoicum* sp. nov., an amino acid-utilizing, hydroxybenzoate-decarboxylating bacterium isolated from methanogenic fresh water pond sediment. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 214-222.

[*] Zhang, J., Kurita, M., Shinozaki, T., Ukiya, M., Yasukawa, K., Tokuda, H., Masters, E. T., Akihisa, M. & Akihisa T. (2014). Triterpene glycosides and other polar constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels and their bioactivities. *Phytochemistry*, **108**: 157-170.

[*] Zhao, Y. & Hagerman, A. E. (1995). Simultaneous determination of hydrolysable tannin and condensed tannin. *Americ. Chem. Soc.* 210-228.