

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnement-Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences Vie

**Valorisation du tourteau de colza par fermentation en milieu
solide pour une application en alimentation animale**

soutenue publiquement le 18 décembre 2017

par

Stéphanie SUTTER

*Plateforme de pré-développement en biotechnologie, Welience (PPB)
UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM)*

Directeur de thèse : Dr. Joëlle DE CONINCK

JURY :

Pr. Patrick GERVAIS, Université de Bourgogne
Dr. Pierre FONTANILLE, Université Clermont-Ferrand II
Pr. Vincent PHALIP, Université Lille I
Dr. France THEVENIEAU, Groupe Avril
Dr. Anne BOURDILLON, Groupe Avril
Dr. Joëlle DE CONINCK, Université de Bourgogne – Welience

Président
Rapporteur
Rapporteur
Membre invité
Membre invité
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

La première personne que je tiens à remercier est le Docteur Joëlle DE CONINCK, ma directrice de thèse pour la confiance qu'elle m'a accordée, sa disponibilité, sa gentillesse et les nombreux échanges scientifiques constructifs qui m'ont permis d'avancer au mieux dans mon travail de thèse. J'ai également une pensée pour Alain DURAND avec qui nous avons débuté ce projet et qui je l'espère profite bien de sa retraite.

J'exprime toute ma reconnaissance au groupe Avril, en particulier aux Docteurs France THEVENIEAU et Anne BOURDILLON pour m'avoir accordé leur confiance, pour leur dynamisme, leurs encouragements et les idées que nous avons partagées pour mener à bien ce projet. Un grand merci aussi pour le temps qu'elles ont pu me consacrer.

J'adresse également mes remerciements au Maître de conférences Pierre FONTANILLE et au Professeur Vincent PHALIP d'avoir accepté d'examiner ce travail et de l'intérêt qu'ils y ont porté. Je tiens aussi à remercier le Professeur émérite Patrick GERVAIS d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

Je suis également très reconnaissante envers la SATT GRAND EST de m'avoir autorisée à mener ces travaux de thèse à côté de mon travail d'Ingénieur au sein de Welience.

Je remercie vivement les Docteurs Patrick DUTARTRE et Stéphanie DELEMASURE-CHALUMEAU de la société Cohiro avec lesquels j'ai eu le plaisir de collaborer.

Je remercie les membres de mon comité de thèse, les Directrices de Recherche Muriel COCAIGN-BOUSQUET et Sophie TESSERAUD, pour leur regard extérieur sur ces travaux et les précieux conseils qu'elles m'ont prodigué.

Je tiens à remercier sincèrement et affectueusement mes collègues de la PPB et plus particulièrement Amélie pour ses qualités humaines, professionnelles et qui débute à présent cette aventure (bon courage à toi !), sans oublier les stagiaires et Thérèse qui contribue vivement à l'ambiance conviviale qui règne au sein du laboratoire. Je remercie toutes les personnes que j'ai côtoyées et qui ont participé de près ou de loin au projet.

Pour finir, je remercie ma famille et mes proches qui ont dû me supporter dans les moments difficiles, pour l'amour qu'ils me portent au quotidien et leur soutien sans faille. Merci.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	7
I. Le tourteau de colza et sa valorisation en alimentation animale	9
1. Le marché mondial des oléagineux dans le monde et en France.....	9
2. Origine et procédé de production	10
3. Valeurs nutritionnelles du tourteau de colza	11
3.1. Composition générale et comparaison avec le soja	11
3.2. Les composés antinutritionnels	13
3.2.1. <i>Les glucosinolates</i>	13
3.2.2. <i>L'acide phytique</i>	14
3.2.3. <i>Les composés phénoliques</i>	14
4. Les voies d'amélioration pour une application chez la volaille.....	15
II. Les biotechnologies au service de la nutrition animale	16
1. Objectifs et nutrition en aviculture.....	16
2. Réglementation européenne concernant les ingrédients utilisés	17
2.1. Les protéines animales.....	17
2.2. Les antibiotiques.....	18
3. L'essor des biotechnologies.....	18
3.1. Application en nutrition animale	18
3.2. Aspects réglementaires concernant l'utilisation des microorganismes	22
III. La fermentation en milieu solide et son application en alimentation animale	23
1. La fermentation en milieu solide.....	23
1.1. Origine et développement du procédé	23
1.2. Caractéristiques	23
1.3. Les transferts de matière à échelle microscopique	24
1.4. Microorganismes utilisés en production alimentaire	25
2. Conduite du procédé	27
2.1. Principales étapes du procédé.....	27
2.2. Facteurs influençant le procédé FMS	28
2.2.1. <i>Paramètres biologiques</i>	28
2.2.2. <i>Paramètres physicochimiques</i>	29
2.3. Estimation de la biomasse	31

3. Les bioréacteurs	32
3.1. Caractéristiques générales des bioréacteurs.....	32
3.2. Classification	33
3.3. Les réacteurs les plus exploités au stade pilote et industriel	34
3.3.1. <i>Le réacteur à plateaux</i>	34
3.3.2. <i>Le réacteur à couche profonde</i>	35
4. Intérêt de la technologie appliquée au tourteau de colza	36
4.1. Production d'aliments fermentés	36
4.2. Enrichissement en protéines et amélioration de la digestibilité.....	37
4.3. Effets bénéfiques chez l'animal.....	42
IV. Le potentiel immunomodulateur des polysaccharides fongiques	42
1. Les β-glucanes	42
1.1. Définition et caractéristiques des immunomodulateurs.....	43
1.2. Sources, propriétés physiques et chimiques des β -glucanes.....	43
2. Mécanisme d'action sur le système immunitaire	45
2.1. Modèle mammifère.....	45
2.2. Modèle aviaire	47
2.3. Limites actuelles des études concernant les β -glucanes	47
3. Effets pharmacologiques des β-glucanes fongiques et microorganismes impliqués	48
3.1. Production et domaine d'application	48
3.2. Contenu en β -glucane des souches fongiques	48
3.3. Réponses du système immunitaire	49
3.4. Etudes menées chez la volaille	51
4. Production de polysaccharides fongiques par fermentation en milieu solide	52
 CHAPITRE II : CROISSANCE DES MICROORGANISMES SUR TOURTEAU DE COLZA ET ENRICHISSEMENT EN PROTÉINES	53
1. Introduction	55
2. Matériels et méthodes	58
2.1. Microorganismes	58
2.1.1. <i>Entretien des microorganismes</i>	58
2.1.2. <i>Production d'inoculum pour les essais en milieu solide</i>	59
2.2. Substrats solides	60
2.2.1. <i>Origine des matières premières et mesures physicochimiques</i>	60
2.2.2. <i>Composition des lots de tourteau de colza</i>	60
2.3. Conditions de culture	61
2.4. Mesures des paramètres liés à la croissance.....	61

2.4.1. Production de CO ₂	61
2.4.2. Perte de masse sèche	61
2.4.3. Protéines totales et solubles	62
2.5. Traitement des données et modélisation.....	63
2.5.1. Etablissement du profil de croissance dans le système fiole Erlenmeyer.....	63
2.5.2. Application des modèles	64
3. Résultats et discussion	65
3.1. Caractérisation du tourteau de colza comme substrat pour le procédé FMS.....	65
3.1.1. Propriétés physicochimiques	65
3.1.2. Composition des différents lots et teneur en protéines totales et solubles	67
3.2. Estimation de la croissance en fiole Erlenmeyer.....	68
3.2.1. Evolution de la production de CO ₂	68
3.2.2. Evolution de la perte de masse sèche	70
3.2.3. Corrélacion entre le CO ₂ accumulé et la perte de masse sèche.....	71
3.2.4. Détermination des paramètres de cinétique	72
3.2.5. Relation entre la perte de masse sèche et la concentration en protéine totale.....	74
3.3. Etude comparative des lots de tourteau de colza.....	75
3.3.1. Impact de la stérilisation à l'autoclave	76
3.3.2. Culture d' <i>Aspergillus niger</i> sur les deux lots de tourteau	77
3.4. Première phase de criblage des souches	79
3.4.1. Croissance des champignons inférieurs	80
3.4.2. Croissance des <i>Streptomyces</i>	82
3.4.3. Croissance des champignons supérieurs.....	83
3.5. Deuxième phase de criblage des souches.....	85
3.5.1. Enrichissement en protéines obtenu avec les champignons inférieurs.....	85
3.5.2. Enrichissement en protéines obtenu avec les champignons supérieurs	87
4. Conclusion.....	89
CHAPITRE III : RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ BIOLOGIQUE D'INTÉRÊT	93
1. Introduction	95
2. Matériels et méthodes.....	97
2.1. Cultures des microorganismes.....	97
2.1.1. Cultures FMS sur tourteau de colza.....	97
2.1.2. Production de mycélium en milieu liquide	97
2.2. Détermination du contenu en β-glucanes	98
2.3. Activités immunomodulatrices.....	98

2.3.1. Test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT)	98
2.3.2. Isolation, culture et traitement des cellules immunitaires : PBMC et BMDM	99
2.3.3. Cytotoxicité	101
2.3.4. Dosage des IL-1 β	101
2.4. Traitement des données	101
3. Résultats et discussion	102
3.1. Activation des neutrophiles du sang humain.....	102
3.1.1. Réponse des neutrophiles en présence d'extraits bactériens et fongiques concentrés ..	102
3.1.2. Réponse des neutrophiles en présence des extraits de cultures FMS de l'ensemble des souches du crible	105
3.1.3. Comparaison des niveaux d'activation des neutrophiles avec les extraits de mycélium et de culture en milieu solide.....	108
3.2. Effet des produits fermentés sur la production d'IL-1 β par les cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC) et les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris (BMDM) stimulés par une endotoxine.....	111
3.2.1. Activités immunomodulatrices obtenues avec le modèle PBMC	112
3.2.2. Activités immunomodulatrices obtenues avec le modèle BMDM	118
4. Conclusion.....	122
CHAPITRE IV : OPTIMISATION DU PROCÉDÉ DE CULTURE EN MILIEU SOLIDE ET CHANGEMENT D'ÉCHELLE	125
1. Introduction	127
2. Matériels et méthodes.....	129
2.1. Plages de températures et de pH.....	129
2.2. Prétraitement thermique du substrat solide	129
2.3. Cultures en fiole Erlenmeyer.....	129
2.4. Cultures en miniréacteur aéré.....	130
2.4.1. Présentation du matériel et suivi des paramètres de culture.....	130
2.4.2. Ensemencement et conditions de culture	131
2.5. Cultures en cuves non stériles (CNS).....	132
2.5.1. Présentation du matériel et suivi des paramètres de culture.....	132
2.5.2. Précultures en milieu solide	133
2.5.3. Ensemencement et conditions de culture	134
2.6. Analyse des échantillons	134
2.6.1. Dosage des β -glucanes	134
2.6.2. Dosage des sucres	134
2.6.3. Qualité microbiologique	135
2.6.4. Activité immunomodulatrice	135

2.7. Traitement des données et modélisation.....	136
3. Résultats et discussion	136
3.1. Détermination des conditions optimales de croissance d' <i>Aspergillus sojae</i>	136
3.2. Culture d' <i>Aspergillus sojae</i> en fiole Erlenmeyer	137
3.2.1. Effet d'une supplémentation en azote et carbone	137
3.2.2. Impact de l'aération	138
3.3. Cultures en condition aérée	140
3.3.1. Détermination des conditions de prétraitement du substrat solide	140
3.3.2. Culture d' <i>Aspergillus sojae</i> en miniréacteur aéré.....	140
3.3.2.1. Amélioration de la croissance par une supplémentation en azote ou en carbone	141
3.3.2.2. Effet de l'addition d'un cosubstrat utilisé en tant qu'agent aérant.....	143
3.3.2.3. Effet de différentes concentrations en carbone	145
3.3.3. Culture d' <i>Aspergillus sojae</i> en cuves non stériles (CNS).....	147
3.3.3.1. Acidification du milieu de culture	147
3.3.3.2. Préparation d'un inoculum adapté au changement d'échelle.....	149
3.3.3.3. Etude comparative entre le tourteau de colza seul et le mélange avec tournesol	149
3.3.3.4. Effet de l'addition d'une source de carbone	152
3.3.3.5. Activité immunomodulatrice.....	152
4. Conclusion.....	154
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	157
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	163
ANNEXES	179

Liste des abréviations

ADL	acid detergent lignin	MG	matière grasse
ADF	acid detergent fiber	MnT	millions de tonnes
AFNOR	association française de normalisation	MS	matière sèche
AFSSA	agence française de sécurité sanitaire des aliments	N	azote
AOAC	association of official analytical chemists	n°	numéro
ATCC	american type culture collection	NaCl	chlorure de sodium
ATP	adénosine triphosphate	NAOH	hydroxyde de sodium
BMDM	bone marrow-derived macrophages	NBT	nitrobleu de tétrazolium
CAH	classification ascendante hiérarchique	NDF	neutral detergent fiber
CBS	centraalbureau voor schimmelcultures	NK	natural killer
CE	communauté européenne	NO	oxyde nitrique
C	carbone	O₂	oxygène
C/N	ratio carbone/azote	OGM	organisme génétiquement modifié
CNS	cuves non stériles	P	p-valeur
CO₂	dioxyde de carbone	PAMPs	pathogen associated molecular patterns
DEXA	dexaméthasone	PBMC	peripheral blood mononuclear cells
EFS	établissement français du sang	PCA	plate count agar
EFSA	european food safety authority	PDA	potato dextrose agar
FDA	food and drug administration	PPB	plateforme de pré-développement en biotechnologie
FML	fermentation en milieu liquide	PRED	prednisolone
FMS	fermentation en milieu solide	QPS	qualified presumption of safety
GRAS	generally recognized as safe	R²	coefficient de corrélation
H₂O	eau	rpm	rotation par minute
HPLC	high performance liquid chromatography	SA	sulfate d'ammonium
HR	humidité relative	T°C	température
H₂SO₄	acide sulfurique	TLR	toll-like receptor
IFN	interféron	TNF-α	tumor necrosis factor
IL	interleukine	TPC	taux de production de CO ₂
Ig	immunoglobuline	UE	union européenne
IMI	culture collection CABI Bioscience	UFC	unités formants colonies
ISO	international organization for standardization	UMIP	collection des champignons de l'institut Pasteur
J	jour	Xm	prédiction maximale du paramètre mesuré
Kcal	kilocalorie	XTT	(2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
KOH	hydroxyde de potassium	ZVAD	inhibiteur pan-caspase
Da	dalton	μ_{max}	vitesse spécifique maximale de croissance
LPS	lipopolysaccharide		
MAS	matière azotée soluble		

INTRODUCTION GÉNÉRALE

À l'heure actuelle, la population mondiale compte plus de 7 milliards d'individus consommant une énergie de plus de 13 milliards de tonnes équivalent pétrole par an. La demande mondiale en énergie ne cesse d'augmenter sous l'effet de la hausse constante de la population mondiale et de la croissance économique qui est particulièrement forte pour les pays émergents comme la Chine qui a doublé sa consommation énergétique en vingt ans. Face au risque d'épuisement des ressources fossiles comme le pétrole ou le gaz naturel entraînant des émissions importantes de gaz à effet de serre, le développement des énergies vertes est primordial. L'Union européenne s'est d'ailleurs fixée l'objectif de satisfaire 20% de sa consommation finale d'énergie par les énergies renouvelables à l'horizon 2020^{1,2}. Parmi les énergies vertes, les biocarburants, comme le biodiesel issu principalement de graines oléagineuses, se développent de plus en plus entraînant une production importante de tourteaux qui sont des sous-produits solides obtenus après extraction de l'huile végétale. En Europe, le colza est principalement utilisé pour la production de biodiesel et le tourteau issu de la trituration des graines est disponible toute l'année constituant une source de protéines appréciable et abondante pour l'alimentation animale. Dans ce contexte, l'engagement durable et l'innovation sont au cœur des préoccupations du groupe Avril, leader de la trituration des graines oléagineuses en France et acteur majeur industriel et financier du secteur des huiles et des protéines. Un des axes stratégiques du groupe est la valorisation des différents coproduits de ses filières de production, dont fait partie le tourteau de colza, dans le domaine de la nutrition animale.

Les différentes filières de productions animales nécessitent de gros volumes de céréales et notamment de graines oléagineuses moins coûteuses sous forme de tourteaux pour répondre aux besoins énergétiques des animaux d'élevage. Pour ses élevages, l'Europe est dépendante des importations des matières premières riches en protéines végétales. Elle importe plus de 70% de ses besoins en protéines qui sont essentiellement satisfaits par le tourteau de soja constituant la principale source de protéines pour les animaux d'élevage à travers le monde. Cette matière première est en effet intéressante d'un point de vue nutritionnel mais pose différents problèmes cruciaux d'ordre économique (compétitivité, dépendance) et environnementale (transport, déforestation, cultures OGM). En France, suite au développement du biodiesel comme biocarburant, la disponibilité importante et grandissante de tourteau de colza représente une alternative face au soja importé. Cette substitution est néanmoins partielle car une amélioration de la qualité nutritionnelle est nécessaire pour un accroissement de son utilisation en alimentation animale. Le tourteau de colza remplace facilement le tourteau de soja dans l'alimentation des bovins mais son incorporation est réduite à 15% pour la volaille. Le tourteau de colza est une source de protéines intéressante en raison de sa disponibilité importante en France, avec plus de trois millions de tonnes produites par an, et de l'équilibre de ses acides aminés. La teneur en protéines est cependant trop faible et les fractions pariétales trop importantes pour qu'il soit utilisé intensivement en alimentation des volailles. La présence de facteurs

antinutritionnels résiduels, des problèmes d'inappétence et de goût des œufs expliquent également ces limites d'incorporation ³.

Plusieurs approches incluant l'amélioration génétique, le décorticage, les traitements thermiques et l'addition d'enzymes exogènes ont été entreprises pour réduire le contenu en fibre, augmenter la teneur en protéines digestibles et ainsi améliorer de façon globale la qualité nutritionnelle du tourteau de colza. Cependant certains de ces procédés notamment les traitements physiques présentent des inconvénients majeurs comme une perte de protéines pour les monogastriques et des problématiques de rentabilité à échelle industrielle ^{4,5}. Le développement de procédés biotechnologiques, avec l'utilisation de microorganismes dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle de ces sous-produits représentent une belle opportunité pour une valorisation en alimentation animale. Parmi les bioprocédés employés, la fermentation en milieu solide (FMS) est la plus appropriée pour l'utilisation de cette biomasse végétale disponible en grande quantité en tant que substrat de culture. Les microorganismes fongiques sont particulièrement bien adaptés en raison de leur capacité à se développer sur ce type de milieu et à dégrader les composants récalcitrants à la digestion tels que les fibres tout en améliorant la qualité nutritive par une concentration en protéine ^{6,7}. Les tourteaux ont déjà été largement utilisés en biotechnologie pour la production industrielle de molécules d'intérêt telles que les enzymes qui sont d'ailleurs communément utilisées en tant qu'additif alimentaire dans les rations destinées aux animaux d'élevage ⁸. Actuellement, les cultures en phase solide connaissent un regain d'intérêt auprès de la communauté scientifique et des industries à travers le monde en raison de leurs avantages économiques et environnementaux ainsi que des nombreux domaines d'applications notamment dans la valorisation de la biomasse végétale ^{9,10}.

Les élevages avicoles font face à plusieurs défis de taille qui ont un des impacts socio-économiques conséquents. Ainsi le coût de la ration, la productivité, le bien-être animal, la sécurité sanitaire, la rentabilité à long terme ou encore la réduction de l'empreinte environnementale sont des problématiques incontournables. Suite à l'interdiction européenne d'utiliser des antibiotiques comme facteur de croissance en alimentation animale, de nouvelles stratégies sont en cours de développement afin de maintenir les performances et la rentabilité des élevages de poulet de chair. C'est dans ce contexte que les microorganismes et leur composants bioactifs ont fait l'objet de recherches pour évaluer l'intérêt de les incorporer dans les aliments destinés aux animaux d'élevage en tant que probiotiques, prébiotiques, enzymes, acides organiques, dérivés de parois de levures, peptides bioactifs, etc ^{11,12}. En plus de l'amélioration de la qualité nutritionnelle, les microorganismes utilisés en FMS peuvent apporter un bénéfice supplémentaire *via* une activité biologique d'intérêt se substituant ainsi à l'utilisation des antibiotiques. Les polysaccharides naturels d'origine fongique de type β -glucane sont largement réputés pour leur effet sur le système immunitaire, des préparations à base de β -glucanes de la levure *S. cerevisiae* sont d'ores et déjà utilisées en tant qu'additif en alimentation animale ¹³. Ces composants structurels des parois cellulaires sont qualifiés d'immunomodulateur car

ils sont capables de stimuler les défenses naturelles ^{14,15}. Très peu d'études ont été publiées à ce jour sur la production de polysaccharides fongiques en utilisant le procédé FMS. En effet, la culture en milieu solide se limite essentiellement aux espèces de champignons médicinaux de type basidiomycète pour la production de carpophores à des fins thérapeutiques ¹⁶. Jusqu'à présent les moisissures, pourtant couramment utilisées en alimentation humaine, n'ont pas été exploitées pour la recherche et la production de ce type de molécules bioactives. La potentialité du procédé reste donc inexplorée concernant l'élaboration d'aliments fermentés fonctionnels capables de répondre aux besoins de la filière en matière de santé animale et de performance de croissance. Cette nouvelle voie de valorisation du tourteau de colza par FMS reste à mettre au point en tenant compte de la faisabilité technique et des aspects économiques pour envisager un développement à échelle industrielle.

Ces travaux de thèse ont pour origine un programme de recherche et développement intitulé « Colzamino » effectué dans le cadre d'une collaboration entre un acteur majeur industriel et financier des filières des huiles et protéines, le groupe Avril, et la plateforme de pré-développement en biotechnologie (Welience). Cette thèse a pour objectif de développer un produit fermenté à partir du tourteau de colza pour une application en alimentation animale en employant le procédé de fermentation en milieu solide, une technologie respectueuse de l'environnement s'inscrivant clairement dans une démarche de développement durable. L'utilisation de microorganismes alimentaires ainsi que la possibilité d'adaptation du procédé à échelle industrielle afin de permettre la valorisation du tourteau de colza abondamment présent sur les sites de trituration industriels sont des aspects très importants à prendre en compte. Ces travaux s'appuient sur l'expérience et le savoir-faire de la PPB dans le développement de procédé FMS du stade laboratoire au stade pilote. L'attention a été particulièrement portée sur le développement d'une technologie pouvant répondre au mieux aux besoins du marché tout en étant viable sur le plan économique. C'est la raison pour laquelle le projet, axé sur l'aspect nutritionnel avec l'enrichissement en protéine, s'est également orienté vers la recherche d'une valeur ajoutée supplémentaire représentant une alternative face à l'utilisation d'antibiotiques comme facteur de croissance chez la volaille.

Le manuscrit se divise en quatre chapitres

La première partie est consacrée à une étude bibliographique établissant l'état des connaissances concernant les technologies mises en œuvre pour valoriser le tourteau de colza en alimentation animale en orientant les améliorations sur le plan nutritionnel et fonctionnel avec un effet bénéfique sur la santé des animaux. L'implication des biotechnologies est particulièrement mise en avant avec notamment un volet consacré à la fermentation en milieu solide et aux immunomodulateurs d'origine fongique.

Le deuxième chapitre traite de la mise en place d'un criblage de souches prenant en compte la croissance des microorganismes et leur capacité à enrichir le tourteau de colza en protéines totales et solubles (digestibles). L'objectif est de rendre le colza plus compétitif face au soja qui représente actuellement la source de protéines la plus utilisée en alimentation animale.

Le troisième chapitre présente, à travers des essais menés *in vitro* sur plusieurs cellules cibles du système immunitaire, la recherche d'une activité biologique d'intérêt en utilisant des préparations riches en β -glucane de levure et les extraits de culture FMS. La présence d'une activité immunomodulatrice est souhaitable car elle apporte un bénéfice supplémentaire susceptible d'améliorer considérablement les performances en zootechnie.

Le quatrième et dernier chapitre expose les différentes étapes de l'optimisation du procédé de culture et le changement d'échelle en utilisant un réacteur de stade pré-pilote à couche profonde et à aération forcée. La priorité est de déterminer et maintenir les conditions optimales de croissance du microorganisme dans le but d'obtenir un maximum de biomasse et donc des niveaux élevés en molécules bioactives.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Le tourteau de colza et sa valorisation en alimentation animale

1. Le marché mondial des oléagineux dans le monde et en France

La production mondiale d'oléagineux est en hausse de 4% et s'élève à un niveau record de 531 millions de tonnes (MnT) pour 2016/2017. Toutes les productions sont attendues en hausse, à l'exception notable du colza dont la récolte est en recul de 2% pour la 3^e année consécutive (61 MnT) en raison de la baisse des surfaces de productions, de conditions climatiques défavorables et à une perte de compétitivité globale face aux céréales. La croissance continue de la demande de tourteaux protéiques est le principal facteur qui explique la hausse de la production d'oléagineux observée ces dernières années. Avec près de 15% des huiles et graisses mondiales utilisées en biodiesel (31,7 MnT sur 214 MnT), les marchés des huiles végétales et donc des oléagineux sont très liés aux marchés pétroliers et en subissent les variations. Le marché mondial des oléoprotéagineux reste ainsi sous pression. Tandis que la production et la consommation de tourteaux protéiques sont dominées par le soja, avec une production atteignant des sommets (325 MnT), les bilans mondiaux sont déficitaires en colza. Dans l'Union européenne, la production de graines oléagineuses est estimée en baisse comme pour l'ensemble du marché mondial, seule la production de soja progresserait. Malgré ces tendances, sur les marchés français les prix actuels des oléagineux restent au-dessus des niveaux catastrophiques de 2009, ainsi le colza reste plus compétitif par rapport au blé pour l'agriculteur par exemple ^{17,18,19}.

En France, la production de graine oléagineuse est dominée par la graine de colza avec 75% de la production totale de graines (5 MnT), suivie du tournesol avec 23% et enfin le soja qui se situe autour de 2% (**Figure 1**). Ce secteur est fortement dépendant des politiques menées en matière de biocarburants (taux d'incorporation, défiscalisation). D'ailleurs à partir de 2005 une augmentation importante de la production de colza est consécutive au développement significatif du biodiesel. La France, second producteur européen de colza prévoit une hausse de la trituration à plus de 4.9 MnT avec des exportations également revues à la hausse ^{20,18,21}.

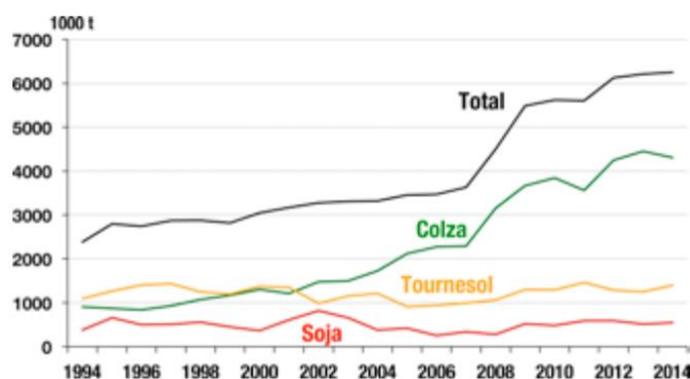


Figure 1. Trituration des graines en France ²¹

2. Origine et procédé de production

Les plantes oléagineuses comme le colza (*Brassica napus*), sont principalement cultivées pour la production d'huiles végétales. Ces dernières sont obtenues par un procédé appelé trituration (**Figure 2**) au cours duquel les graines sont tout d'abord broyées et pressées avant de subir une extraction supplémentaire par solvant (hexane), laissant alors un coproduit, le tourteau de colza déshuilé ²². L'huile obtenue est ensuite raffinée pour obtenir une huile à usage alimentaire et industriel. Du fait de sa haute qualité nutritionnelle, l'huile de colza est d'ailleurs une des huiles alimentaires la plus consommée au monde ²³.

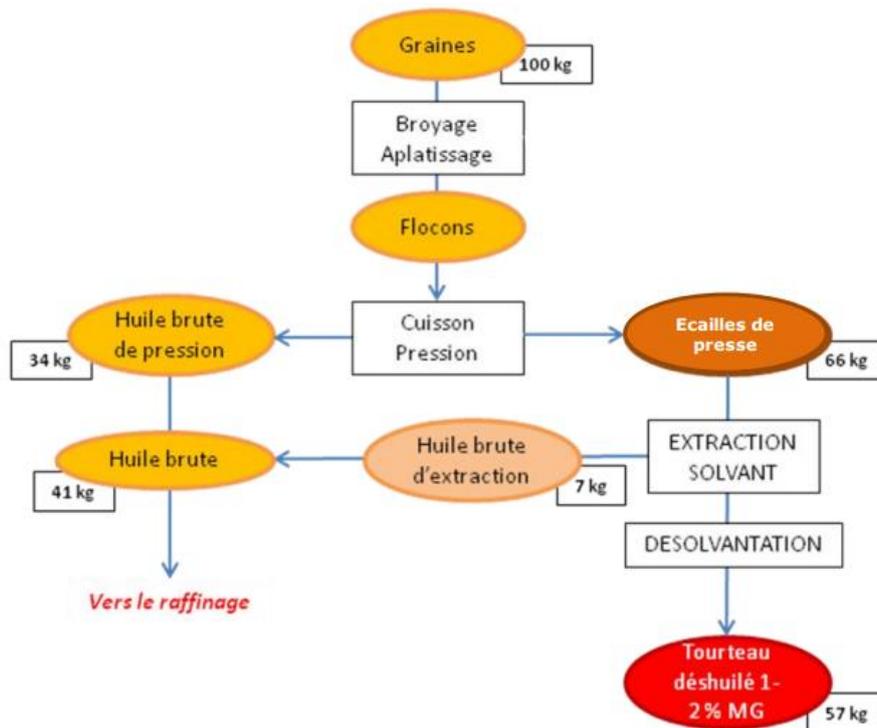


Figure 2. Les différentes étapes de trituration des graines de colza ²²

Ce tourteau de type industriel affiche des teneurs en matières grasses résiduelles (MG) qui sont très faibles, généralement de l'ordre de 1 à 2% mais il est concentré en d'autres nutriments, notamment en protéines. Cette caractéristique fait des tourteaux d'oléagineux les principaux ingrédients protéiques pour l'alimentation animale en France et dans le monde. Durant les 20 dernières années, la trituration s'est fortement développée, l'Europe étant l'acteur le plus influent de cette expansion avec le développement du biodiesel. Cet essor important, tant sur le plan alimentaire qu'industriel, a entraîné une production accrue du coproduit de l'industrie huilière : le tourteau de colza. En tant qu'aliment il reste toutefois un tourteau de second rang, avec des inconvénients connus, il y a peu de chances que ses prix puissent un jour dépasser 65–70% du prix du tourteaux de soja qui couvre de nos jours efficacement les besoins essentiels de l'élevage en matière de protéine végétale ¹⁹.

3. Valeurs nutritionnelles du tourteau de colza

3.1. Composition générale et comparaison avec le soja

L'efficacité des productions animales repose sur le respect d'équilibres nutritionnels et notamment sur les apports énergétiques, protéiques et minéraux. Les apports protéiques d'un aliment ne sont pas seulement exprimés en protéines totales ou matière azotée totale mais en acides aminés digestibles et notamment en acides aminés indispensables. Le secteur de l'alimentation animale vise à fournir à l'élevage, des aliments concentrés et équilibrés répondant aux plus près des besoins spécifiques des différents stades physiologiques des animaux ²⁴.

La valeur nutritionnelle du tourteau de colza varie significativement selon l'espèce, l'âge et le sexe de l'animal ainsi que selon l'origine du colza et des traitements appliqués lors du procédé de trituration des graines. Il a été démontré par exemple que la digestibilité d'un même lot peut être meilleure chez certaines espèces de volaille ^{25,26}. Le procédé de trituration utilisé pour récupérer l'huile a également un impact sur l'énergie brute contenue dans le tourteau puisque la teneur en lipides, protéines et constituants des parois végétales peut considérablement changer. Ces traitements ont également une incidence sur la teneur en facteurs antinutritionnels comme les glucosinolates qui peuvent varier du simple au quadruple ²⁷.

Comparativement au tourteau de soja, source azotée de référence en alimentation animale, le tourteau de colza est moins riche en protéines et moins énergétique dû à une concentration plus élevée en fibre : cellulose, hémicellulose et lignine (**Tableau 1**). Ces caractéristiques le rendent moins bien adapté à l'alimentation des volailles qui sont des animaux à croissance rapide réclamant une alimentation concentrée en protéines ³. Le tourteau de colza est cependant relativement bien équilibré en acides aminés limitants primaires, lysine et méthionine. Même si le contenu en lysine reste plus faible, la concentration en lysine et méthionine digestibles du colza est proche des seuils recommandés par exemple pour les vaches laitières ²⁸. Les tourteaux possèdent des macroéléments qui sont des constituants essentiels du tissu osseux (calcium et phosphore) ou de l'équilibre osmotique de l'animal (sodium et potassium) ²⁶. Le tourteau de colza étant particulièrement riche en phosphore et bien pourvu en calcium, il permet d'économiser jusqu'à 50% des minéraux par rapport à ceux nécessaires avec un aliment à base de tourteau de soja. Sa richesse globale en sels minéraux permet ainsi de limiter les apports supplémentaires ²⁹. Le tourteau de colza industriel est pauvre en matière grasse mais constitue néanmoins une source d'acides gras polyinsaturés avec une quantité d'acide linoléique (oméga 6) de l'ordre de 13.5 g.kg⁻¹ de tourteau sec ³⁰. La présence de vitamines du groupe B est intéressante car elles participent aux réactions du métabolisme énergétique (cofacteurs enzymatiques). Parce qu'elles sont hydrosolubles, elles ne s'accumulent pas dans l'organisme, il faut donc assurer un apport quotidien de vitamines dans les périodes de production sous peine d'une diminution des

performances zootechniques ²⁶. Bien qu'étant moins énergétique, le tourteau de colza, disponible en grande quantité sur le territoire, représente une bonne alternative au tourteau d'importation. De nos jours, ce coproduit de la trituration du colza est efficacement utilisé pour l'alimentation des bovins, en remplacement totale du tourteau de soja d'importation et en complément de l'herbe et des fourrages. Quant aux monogastriques, ils constituent un marché d'opportunité. En effet, il persiste encore des freins techniques à son utilisation en raison d'une faible digestibilité des protéines et de la présence de facteurs antinutritionnels résiduels ^{28,3}.

Tableau 1. Composition et valeurs nutritionnelles des tourteaux de colza et soja ^{31,26}

Par rapport au poids brut	Tourteau de colza	Tourteau de soja
Matière sèche (%)	88,7	87,8
Protéines brutes (%)	33,7	45,3
Cellulose brute (%)	12,4	6
Cellulose : ADF-ADL (%)	10,1	6,6
Hémicellulose : NDF-ADF (%)	8,7	4,9
Lignine : ADL (%)	9,5	0,7
Matières grasses (%)	2,3	1,9
Sucres solubles totaux (%)	7,7	8,3
Cendres brutes (%)	7	6,3
Calcium (g.kg ⁻¹)	8,3	3,4
Phosphore (g.kg ⁻¹)	11,4	6,2
Sodium (g.kg ⁻¹)	0,7	0,1
Potassium (g.kg ⁻¹)	12,5	21
Magnésium (g.kg ⁻¹)	4,5	2,8
Vitamine E (mg.kg ⁻¹)	14	4
Vitamine B1 (mg.kg ⁻¹)	3	6
Vitamine B2 (mg.kg ⁻¹)	4	3
Vitamine B6 (mg.kg ⁻¹)	11	6
Energie brute (kcal.kg ⁻¹)	4090	4130
Energie métabolisable volaille (kcal.kg ⁻¹)	1500	2300
Lysine (g.kg ⁻¹)	18 (Digestibilité : 78%)	27,8 (Digestibilité : 91%)
Méthionine (g.kg ⁻¹)	6,9 (Digestibilité : 87%)	6,4 (Digestibilité : 91%)
Thréonine (g.kg ⁻¹)	14,5 (Digestibilité : 84%)	17,7 (Digestibilité : 89%)

D'un point de vue technico-économique, l'incorporation du tourteau de colza dans la ration devient intéressante lorsque son prix est inférieur à 75% de celui du tourteau de soja ce qui est toujours le cas avec une moyenne du rapport de 62% depuis 2002. Ce coproduit est donc amplement valorisable dans le domaine de la nutrition animale et représente d'ores et déjà un réel intérêt économique pour l'industrie bovine ²¹.

Les acides aminés sont relativement bien équilibrés par rapport à d'autres matières premières végétales utilisées en alimentation animale mais ils sont globalement moins riches que ceux du tourteau de soja (**Tableau 2**). La digestibilité des acides aminés est plus faible chez les monogastriques. Quelques acides aminés comme la lysine deviennent en partie indisponibles

biologiquement en raison du traitement thermique appliqué lors du procédé de trituration. L'apport de colza reste toutefois intéressant car certains des acides aminés notamment les soufrés (méthionine et cystéine) sont limitants pour les monogastriques dans les régimes à base de céréales^{32,30,33}.

Tableau 2. Composition en acides aminés des tourteaux de colza et soja³⁰

Acides aminés (g/kg de produit sec)	Tourteau de colza	Tourteau de soja
Alanine	16,4	22,6
Arginine	21,5	39,0
Aspartate	25,4	56,8
Cystéine	2,1	6,9
Glutamate	60,9	87,9
Glycine	18,1	21,7
Histidine	11,2	15,7
Isoleucine	14,8	25,2
Leucine	25,1	40,4
Lysine	21,9	33,4
Méthionine	7,2	6,9
Phénylalanine	15,4	26,9
Proline	23,4	28,4
Sérine	15,7	27,0
Thréonine	16,5	20,5
Tryptophane	4,7	-
Tyrosine	11,6	19,1
Valine	18,7	28,8

3.2. Les composés antinutritionnels

La présence de facteurs antinutritionnels limite l'incorporation du tourteau de colza en alimentation animale. Le développement de nouvelles variétés dites « double zéro » à faibles teneurs en glucosinolates et sans acide érucique a permis d'augmenter considérablement son incorporation dans l'alimentation des monogastriques (porcs et volailles)³⁴.

3.2.1. Les glucosinolates

Les glucosinolates sont des métabolites secondaires produits chez toutes les plantes de la famille des *Brassicaceae*³⁵. La molécule elle-même est biologiquement inactive mais une fois hydrolysée par des myrosinases d'origine végétale ou intestinale elle donne naissance à des molécules de D-glucose et de nombreux composés néfastes (sulfates, isothiocyanates, thiocyanates et nitriles). Les effets nocifs sont les plus importants chez les monogastriques avec un niveau de tolérance chez la volaille fixé à 4 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ d'aliment et qui ne peut pas dépasser 1.5 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ chez les jeunes animaux. Au-delà de ces valeurs, les glucosinolates sont responsables de retards de croissance et d'une forte

hausse de la mortalité^{36,37}. Plusieurs progrès ont permis de minimiser la quantité de glucosinolates. Des variétés génétiquement modifiées contenant moins de 20 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de graine ont été développées au début des années 80. Les traitements appliqués suite à la trituration industrielle des graines baissent encore davantage la teneur en glucosinolate de l'ordre de 4 à 15 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de tourteau^{4,36}.

3.2.2. L'acide phytique

L'acide phytique ou phytate constitue une réserve de phosphore dans toutes les céréales et les graines oléagineuses où il représente 50 à 80% du phosphore total de la plante. Le niveau d'acide phytique par rapport au contenu total en phosphore dans le tourteau de colza est relativement élevé et s'élève en moyenne à 60%⁴. Cette molécule a des effets antinutritionnels considérables pour la plupart des animaux, surtout chez les jeunes monogastriques car ils ne sont pas capables d'utiliser le phosphore qu'elle renferme. Les phytates réduisent également la disponibilité de certains minéraux (calcium, magnésium, zinc et fer) en les captant. Ils se complexent aussi aux protéines, *via* les groupements basiques des acides aminés et aux acides gras à pH neutre et acide, dans le système gastro-intestinal de la volaille réduisant leur biodisponibilité. Enfin, les phytates inhibent également des enzymes digestives telles que les pepsines, trypsines et amylases^{38,39}.

Afin de satisfaire les besoins en phosphore des animaux, une complémentation avec une source minérale de phosphore est dès lors pratiquée. Cependant, les conséquences de cette pratique sont doubles. D'une part, la complémentation minérale a un impact sur le coût de l'alimentation et, d'autre part, les porcs et les volailles rejettent des quantités importantes de phosphore *via* leurs déjections, ce qui pose un problème environnemental dans les régions à forte concentration d'élevages. La solution pour rendre le phosphore biodisponible est l'addition de préparation enzymatique contenant des phytases d'origine microbienne. En effet, l'utilisation de phytases permet de diminuer ces rejets de 50%^{40,41}. Les phytases couramment utilisés dans l'alimentation animale sont celles dérivés de microorganisme du genre *Aspergillus*, *Schwanniomyces* ou encore *Escherichia coli*⁴².

3.2.3. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont caractérisés par la présence d'un cycle aromatique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles et une grande variété de substituants⁴³. Ces molécules, essentiellement des acides phénoliques et des tanins condensés, sont présentes en plus grande quantité dans les graines de colza par rapport au soja qui en compte cinq fois moins. Les acides phénoliques représentent au total 18.4 g.kg^{-1} de tourteau de colza sec. Parmi ces acides phénoliques, la sinapine sous sa forme estérifiée est le plus abondant (70 à 85%)⁴⁴.

Ces composés se complexent au fer et aux protéines les rendant indisponibles pour une absorption par l'animal. La sinapine provoque également une augmentation de triméthylamine chez la volaille dans le jaune d'œuf leur conférant un goût de poisson. Le tourteau de colza est ainsi exclu de l'alimentation des pondeuses. Un traitement à l'ammoniaque lors du procédé d'extraction de l'huile ou un traitement thermique peut diminuer en partie la teneur en composés phénoliques mais ces procédés de séparation sont toutefois limitants en matière d'efficacité et de coût ^{45,46}.

4. Les voies d'amélioration pour une application chez la volaille

Pour l'élevage du poulet de chair, la limite d'incorporation du tourteau de colza est principalement liée à sa faible teneur en énergie et à son contenu en fibre plus élevé par rapport au soja. Des études indiquent que des taux d'incorporation de 10 à 15% n'altèrent pas les performances de croissance dans les aliments distribués en finition (après 3 semaines d'âge). En revanche, chez les pondeuses la dose ne dépasse pas les 6% d'incorporation mais uniquement pour les poules dont le génotype évite la transmission du goût de poisson aux œufs provoquée par la sinapine ^{34,47}.

Certains traitements technologiques peuvent améliorer la qualité nutritionnelle du tourteau de colza. En faisant varier des paramètres tels que le chauffage ou le décorticage avant extraction de l'huile, les qualités nutritionnelles varient. Le traitement thermique entraîne une baisse des facteurs antinutritionnels mais également des risques de pertes de protéines digestibles pour les monogastriques alors que le tannage chimique ou thermique est favorable aux ruminants. Le tannage accroît la résistance des protéines à la dégradation bactérienne dans le rumen qui peuvent ensuite être digérées efficacement au niveau de l'intestin. Le dépelliculage quant à lui entraîne une augmentation de 7% en moyenne et une réduction des fibres mais occasionne une perte d'huile, une extrême finesse des particules et une gestion difficile du surplus de coques produites nécessitant une valorisation par combustion ^{4,48}.

Une autre stratégie d'amélioration est la recherche en génétique végétale qui vise l'obtention de variétés à fortes teneurs en protéines et faible teneur en lignine (2%). La valeur nutritionnelle des tourteaux provenant de nouvelles variétés à graines jaunes a été estimée supérieure aux variétés classiques à graines noires. Mais ces nouvelles variétés ne sont pas encore compétitives sur le plan agronomique ⁴⁹. La sélection d'animaux mieux adaptés face à des aliments de moindre qualité ou de qualité plus variable peut également être une solution. Aujourd'hui, l'augmentation du coût de l'aliment et la diversification des matières premières utilisées en alimentation animale remettent en cause le modèle de sélection impliquant un environnement alimentaire optimal ^{50,3}.

Une autre approche est celle de l'utilisation des biotechnologies microbiennes pour améliorer l'efficacité des productions animales et la qualité nutritionnelle des aliments. Le secteur le plus développé aujourd'hui est celui des additifs à base d'enzymes améliorant la digestibilité et

l'assimilation des nutriments. L'usage d'enzymes exogènes d'origine microbienne est une pratique courante en élevage et permet une utilisation plus importante d'aliments secondaires et de coproduits industriels actuellement peu employés chez les volailles. D'autres voies sont également explorées dans ce domaine notamment pour le remplacement des antibiotiques en tant que facteur de croissance avec l'utilisation de probiotiques, prébiotiques, molécules bioactives et acides organiques⁵¹. Le procédé de fermentation en milieu solide peut également être appliqué pour la production d'un aliment fermenté plus faible en facteur antinutritionnel et plus riche en nutriments grâce aux bioconversions réalisées par les microorganismes⁵².

II. Les biotechnologies au service de la nutrition animale

1. Objectifs et nutrition en aviculture

Sous l'effet d'une demande croissante des consommateurs en produit d'origine animale, l'aviculture a connu une expansion et un développement spectaculaire à travers le monde. L'exigence d'une alimentation de qualité à moindre coût nécessite une amélioration de l'efficacité nutritionnelle des élevages. Afin d'atteindre cet objectif, l'industrialisation de l'élevage a recours à l'emploi d'additifs alimentaires dont l'utilisation s'est généralisée depuis de nombreuses décennies afin d'augmenter les productions tout en maintenant un bon état général de santé des animaux⁵¹.

Le rôle principal d'un ingrédient en alimentation animale est d'apporter les nutriments digestibles nécessaires au développement de l'animal pour ses fonctions de production. Actuellement de nombreuses données sont disponibles concernant la capacité des matières premières à fournir ces nutriments cependant un degré de variabilité inhérent à chacune de ces matières doit être pris en considération ce qui pose problème pour la formulation précise de l'aliment sachant qu'une proportion est excrétée car non digérée par l'animal. Aujourd'hui le challenge des producteurs d'aliments est de formuler une alimentation équilibrée à moindre coût tout en garantissant une utilisation accrue des nutriments afin de réduire l'impact environnemental lié à des rejets excessifs dans les lisiers⁵³.

L'aliment est incontestablement l'intrant le plus important en aviculture en matière de coûts car il représente près de 70% du total de la production. Ainsi, la disponibilité, la qualité et le prix de l'aliment sont des considérations incontournables dans le développement de l'industrie avicole. Afin d'optimiser la productivité, la volaille a besoin d'un apport constant en énergie, protéines, minéraux, additifs et en eau. **Le tableau 3** fait l'inventaire des ingrédients les plus utilisés à travers le monde⁵⁴.

Tableau 3. Ingrédients les plus utilisés pour la formulation d'un aliment destiné à la volaille ^{54,51}

Source d'énergie
<ul style="list-style-type: none"> • Céréales (essentiellement maïs, blé et sorgho), sous-produits céréaliers • Graisses animales et huiles végétales
Source de protéine
<ul style="list-style-type: none"> • Protéines végétales : tourteau de soja, colza, tournesol et pois • Protéines animales : farine de poisson, farine de viande et d'os
Minéraux
<ul style="list-style-type: none"> • Apport de calcium : calcaire, concassé de coquilles d'huitres • Apport de phosphore : phosphate di et tricalcique, phosphate naturel défluoré, farine d'os • Minéraux traces : mélanges d'éléments (zinc, cuivre, fer, manganèse, cobalt, sélénium) • Apport de sodium : sel, bicarbonate de sodium
Additifs alimentaires
<ul style="list-style-type: none"> • Vitamine : mélange de vitamines • Acides aminés cristallins : méthionine, lysine, thréonine, tryptophane
Autres additifs
<ul style="list-style-type: none"> • Enzymes : protéase, xylanases, phytase, glucanase • Antibiotiques : avilamycine, virginiamycine, flavomycine, penicilline, bacitracine, avoparcine, tylosine, spiramycine, monensine • Acides organiques : acide propionique, formique, lactique, citrique, sorbique et phosphorique • Pigments : Xanthophylle • Probiotiques (microorganisme) et prébiotiques (fructo-oligosaccharides, mannane-oligosaccharides) • Extraits de plante : herbes, épices, huiles essentielles • Peptides antimicrobiens : Lysozyme, fowlicidine, colicine, cecropine

2. Réglementation européenne concernant les ingrédients utilisés

L'utilisation d'ingrédients en alimentation animale est contrôlée par des règlements européens, dont l'application est immédiate et obligatoire dans tous les Etats membres. Ces textes répertorient les matières premières et les additifs autorisés avec les conditions d'utilisation, en particulier les doses recommandées pour une efficacité optimale sans risque de toxicité pour l'animal, l'homme et l'environnement.

2.1. Les protéines animales

Dans le cadre de la prévention de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles, le règlement (CE) n°999/2001 a fixé des règles strictes en interdisant l'utilisation de protéines animales

dans l'alimentation de tous les animaux d'élevage en Europe ⁵⁵. Depuis le 1er juin 2013, l'usage de protéines animales transformées de non ruminants est autorisé uniquement en aquaculture. Ces protéines sont exclusivement produites à partir de sous-produits provenant d'animaux non ruminants propres à la consommation humaine mais non commercialisables ⁵⁶. A l'exception du tourteau de soja, les autres sources de protéines végétales nécessitent des apports supplémentaires d'additifs afin d'atteindre un équilibre en acide aminés essentiels. Cette situation souligne la nécessité d'améliorer les capacités d'utilisation d'un large éventail d'ingrédients dits « de substitution », qui peuvent remplacer les ingrédients classiquement utilisés dans certains pays ⁵⁴. Le tourteau de colza fait évidemment partie de ces sources alternatives de protéines.

2.2. Les antibiotiques

Les antibiotiques en tant que facteurs de croissance comptent parmi les additifs les plus utilisés pour augmenter la productivité et la rentabilité des élevages. Cependant les menaces de la biosécurité pour la santé humaine et animale résultantes de l'augmentation de résistance de microorganismes pathogènes aux antibiotiques et l'accumulation de résidus d'antibiotiques dans les produits animaux et dans l'environnement conduisent à ne plus utiliser les antibiotiques dans les régimes alimentaires des animaux d'élevage.

A partir de l'année 2006, l'Union Européenne interdit systématiquement l'utilisation des antibiotiques en tant que facteurs de croissance dans l'alimentation animale. Tous les composés d'ordre médical sont ainsi limités à une utilisation thérapeutique et autorisés uniquement par prescription vétérinaire ^{57,58}. Plusieurs alternatives issues des biotechnologies ont été étudiées pour interagir avec la microflore intestinale et améliorer la production animale. Ces additifs zootechniques sont essentiellement constitués de microorganismes vivants (probiotiques) ou désactivés et/ou de leurs métabolites ⁵⁹.

3. L'essor des biotechnologies

3.1. Application en nutrition animale

Contrairement aux ruminants, les volailles ne disposent pas d'une digestion prégastrique et d'une flore bactérienne naturelle capable de dégrader tous les nutriments. Ces dernières sont également dotées d'une résistance et d'une immunité limitée contre l'infection par la colonisation de microorganismes pathogènes ¹¹. Les progrès effectués en biotechnologie microbiennes durant les deux dernières décennies apportent de nouvelles opportunités pour augmenter l'efficacité des productions animales à travers une nutrition améliorée ⁶⁰. En effet, les biotechnologies microbiennes ont une large

gamme d'application (**Tableau 4**). Le secteur le plus développé dans le cas des monogastriques est l'utilisation d'enzymes d'origine microbienne facilitant la digestion. D'autres voies sont également explorées pour améliorer la santé animale et accroître ainsi les performances de productions. C'est dans ce contexte que les microorganismes et leur composants ont fait l'objet de recherches pour évaluer l'intérêt de les incorporer en tant qu'additif dans les aliments destinés aux animaux en tant que facteurs de croissance non antibiotiques comme par exemple les produits fermentés, probiotiques, immunomodulateurs et peptides bioactifs. Ces derniers ont déjà leur place en nutrition animale^{61,11,12}.

Stimuler les défenses naturelles *via* une supplémentation alimentaire avec des substances capables de moduler les fonctions immunitaires est une stratégie qui suscite actuellement de nombreuses recherches en nutrition animale. Les immunomodulateurs les plus étudiés et commercialisés sont les dérivés de parois de levure (β -glucanes et mannanes). L'emploi de substances immunomodulatrices en nutrition animale pourrait particulièrement aider les jeunes animaux à développer des réponses immunitaires actives permettant l'élimination des agents pathogènes tout en minimisant les dommages que ceux-ci pourraient occasionner⁶².

Tableau 4. Microorganismes d'intérêt et leurs produits utilisés en nutrition animale

Catégorie	Produit	Composé et microorganisme utilisé	Action
Nouvel ingrédient	Micro-organismes	<ul style="list-style-type: none"> Bactéries : <i>Brevibacterium</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Pseudomonas</i>, <i>Flavobacterium</i>, <i>Streptomyces</i> Levures : <i>Candida</i>, <i>Schwanniomyces</i>, <i>Pichia</i>, <i>Saccharomyces</i> Champignons : <i>Fusarium</i>, <i>Rhizopus</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Cephalosporium</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Trichoderma</i> 63,64,65 	Utilisation de protéines microbiennes en tant que nouvelle source de nutriment (biomasse microbienne, extraits protéiques ^{63,66})
	Produits fermentés	<ul style="list-style-type: none"> Ensilage : bactéries lactiques⁶ Fermentation de divers agrorésidus : <i>Aspergillus</i>, <i>Rhizopus</i>, <i>Pleurotus</i>, <i>Lentinus</i>, <i>Sreptomyces</i>⁶ Tourteaux : colza avec <i>Bacillus</i>, <i>Saccharomyces</i>, <i>Lactobacillus</i>, <i>Enterococcus</i> et <i>R. oligosporus</i>^{67,5} ; soja avec <i>A.oryzae</i> et <i>A. niger</i>^{68,69} 	Effet probiotique, améliore les performances de croissance et la digestibilité via un enrichissement en enzymes et protéines ^{67,70,6}
Additifs nutritionnels	Vitamines	Vitamine C (<i>Corynebacterium</i>), vitamine B2 (<i>Ashbya</i> et <i>Candida</i>), vitamine B3 (<i>Rhodococcus</i>), vitamine B12 (<i>Pseudomonas</i> et <i>Propionibacterium</i>), vitamine E (<i>Geotrichum</i> et <i>Candida</i>) ⁷¹	Exerce des effets bénéfiques sur la santé du tube digestif et le système immunitaire. Améliore la vitalité et diminue le stress ⁵¹
	Acides aminés	<ul style="list-style-type: none"> Lysine, tryptophane, histidine et valine : <i>C. glutamicum</i> et <i>B. lactofermentum</i>^{72,73} Thréonine, phenylalanine, tryptophane, isoleucine : <i>E. coli</i>^{72,73} Arginine et glutamate : <i>B. flavum</i>^{72,73} Sérine (<i>Methylobacterium</i> et <i>B. flavum</i>)^{72,73} 	Augmente la valeur nutritionnelle d'un aliment et améliore l'équilibre protéique d'une formulation ⁵⁴
Additifs zootechniques	Antibiotiques	<ul style="list-style-type: none"> Bacitracine : <i>Bacillus</i>^{74,75} Tétracycline, streptogramine, avilamycine et antibiotique ionophore : <i>Streptomyces</i> et <i>Nocardia</i>^{74,75} β-lactamine : <i>Penicillium</i> et <i>Acremonium</i>⁷⁶ 	Inhibe la croissance des microorganismes pathogènes et favorise l'établissement d'une flore microbienne positive. Améliore l'absorption des nutriments ^{53,51}
	Enzymes	<ul style="list-style-type: none"> Cellulase et hémicellulase : <i>Aspergillus</i>, <i>Trichoderma</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Streptomyces</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Sclerotium</i>, <i>Humicola</i> ; Ligninase : <i>Trametes</i>, <i>Pleurotus</i>, <i>Lentinus</i>, <i>Phanerochaete</i>^{77 78} Phytase : <i>Aspergillus</i>, <i>Peniophora</i>, <i>Escherichia</i>⁴² Protéase : <i>Bacillus</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Rhizopus</i>, <i>Fusarium</i>⁷⁹ Pectinase : <i>Saccharomyces</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Mucor</i>, <i>Sclerotinia</i>, <i>Fusarium</i>⁸⁰ 	Améliore la disponibilité en nutriments d'un aliment par réduction des composés antinutritionnels. Limite les rejets dans l'environnement ^{53,81}

Additifs zootechniques (suite)	Probiotiques	Microorganismes vivants du genre <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Enterococcus</i> et <i>Aspergillus</i> ^{51,53}	Favorise l'établissement d'une flore intestinale désirable. Prévention des désordres digestifs et améliore l'absorption et la conversion des nutriments ^{51,82}
	Prébiotiques	<ul style="list-style-type: none"> • Mannane-oligosaccharides : <i>Saccharomyces</i> ⁸³ • Fructo-oligosaccharides : <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Lactobacillus</i> ⁸⁴ • Galacto-oligosaccharides : <i>Aspergillus</i> ⁸⁵ 	Entretien de la flore intestinale désirable dont les probiotiques et exclusion par compétition les pathogènes, active le système immunitaire, améliore la digestion ^{83,84,86}
	Acides organiques	<ul style="list-style-type: none"> • Acide citrique : <i>Aspergillus</i>, <i>Yarrowia</i> ⁸⁷ • Acide lactique : <i>Lactobacillus</i>, <i>Pichia</i>, <i>Rhizopus</i>, <i>Saccharomyces</i> ⁸⁷ • Acide succinique : <i>Actinobacillus</i>, <i>Escherichia</i>, <i>Penicillium</i> ⁸⁷ 	Baisse le pH du système digestif et inhibe le développement de microorganisme pathogène ⁵³
	Pigments	<ul style="list-style-type: none"> • Astaxanthine : <i>Phaffia</i>, <i>Xanthophyllomyces</i> ⁸⁸ • Zeaxanthine : <i>Flavobacterium</i> ^{89,90} • Luteine : <i>Spongiococcum</i> ^{89,90} • Lycopène : <i>Blakeslea</i> ^{89,90} 	Intensifie la couleur du jaune d'œuf et améliore l'apparence de la peau et des carcasses ⁹¹
Molécules bioactives	Immuno-modulateurs	<ul style="list-style-type: none"> • β-glucan : <i>S. cerevisiae</i> ^{92,13} • Polysaccharides fongiques : <i>Tremella fuciformis</i> et <i>Lentinus edodes</i> ^{93,94} 	Améliore la santé et la croissance des animaux <i>via</i> la stimulation du système immunitaire ⁹⁵
	Peptides bioactifs	<ul style="list-style-type: none"> • Lysozyme : <i>Pichia pastoris</i> ⁹⁶ • Colicine : <i>E. coli</i> ⁹⁶ • Nisine : <i>Lactococcus</i>, <i>Staphylococcus</i> ⁹⁶ • Halocine : <i>Halobacteriaceae</i> ⁹⁶ • Défensine : <i>Penicillium</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Anaeromyxobacter</i> ⁹⁷ 	Action antimicrobienne, antivirale et activation du système immunitaire ⁹⁷

3.2. Aspects réglementaires concernant l'utilisation des microorganismes

○ *Réglementation américaine*

L'agence américaine responsable du contrôle des aliments (FDA), a introduit le concept GRAS afin de permettre la régulation de substances considérées comme sans danger et utilisées comme additifs pour l'alimentation humaine et animale. Ces composés ont été validés par des experts suite à des expérimentations scientifiques dans les conditions de leur utilisation attendue. L'emploi de microorganismes pour l'obtention d'aliments fermentés repose également sur leur caractère GRAS traduisant leur réputation d'innocuité. Jusqu'à présent uniquement certaines bactéries comme les lactiques, des levures ainsi que le champignon *F. venenatum* ont obtenu le statut GRAS. Concernant la majorité des champignons filamenteux, uniquement des substances dérivées telles que les enzymes figurent parmi des additifs autorisés ⁹⁸.

○ *Réglementation européenne*

Une grande variété d'agents biologiques, tels que des espèces bactériennes et fongiques peuvent être autorisés dans l'Union européenne pour une utilisation dans la chaîne alimentaire humaine et animale. Dans le cadre des demandes d'autorisation, l'EFSA est chargée d'évaluer la sécurité de ces agents biologiques en adoptant une méthodologie commune : la présomption d'innocuité reconnue ou QPS. L'innocuité d'un groupe d'agents biologiques est évaluée en fonction de son identité, des connaissances disponibles, de la sécurité et de l'utilisation finale prévue.

L'EFSA tient à jour une liste d'agents biologiques pour lesquels une évaluation de type QPS peut être appliquée. Celle-ci est révisée annuellement par le groupe scientifique sur les risques biologiques. Jusqu'à présent, l'intégration des champignons filamenteux n'a pas été recommandée, en raison de leur potentiel à produire des métabolites toxiques et les connaissances disponibles sur certaines espèces, en particulier celles liées à des antécédents d'utilisation sûre, restent insuffisantes. Le concept QPS peut aussi être appliqué aux microorganismes utilisés pour produire des métabolites ou d'autres utilisations finales spécifiques qui n'impliquent pas la présence de cellules microbiennes vivantes. Dans ce cas les recommandations QPS s'appliquent uniquement sur l'utilisation finale ⁹⁹. Les (sous-) produits de fermentation de microorganismes dont les cellules ont été inactivées ou tuées figurent dans le catalogue des matières premières du règlement de l'Union Européenne autorisées en alimentation animale. Parmi ces produits, celui issu de la fermentation d'*Aspergillus niger* sur du blé et du malt pour la fabrication d'enzymes fait par exemple partie de la liste ^{100,101}.

III. La fermentation en milieu solide et son application en alimentation animale

1. La fermentation en milieu solide

1.1. Origine et développement du procédé

La fermentation en milieu solide (FMS), datant de plusieurs siècles, est un des plus anciens procédés biotechnologiques connus au monde pour la préservation et l'élaboration d'aliments fermentés. La fermentation en milieu solide est populaire en Asie, Afrique et en Amérique latine où elle est traditionnellement utilisée pour l'élaboration de boissons, de condiments comme la sauce soja et divers aliments fermentés tels que le tempeh. En Europe, cette technologie est très peu employée et se limite à la fabrication du fromage et du pain ⁶. Actuellement, les cultures en phase solide connaissent un regain d'intérêt auprès de la communauté scientifique et des industries à travers le monde en raison de leurs avantages et des nombreux domaines d'applications notamment dans la valorisation des déchets et de l'énergie issues de la biomasse végétale ainsi que dans la production de molécules à haute valeur ajoutée. Les manipulations génétiques appliquées aux microorganismes encouragent encore davantage le développement de cette technologie dans le futur ¹⁰.

1.2. Caractéristiques

La fermentation en milieu solide est caractérisée par une croissance microbienne sur des particules solides humides en absence d'eau libre ou sur un substrat proche de sa capacité maximale de rétention. Ce bioprocédé est particulièrement bien adapté aux microorganismes fongiques bien que les bactéries soient tout à fait capables de s'y développer. Les microorganismes se développent dans un système constitué de trois phases : une matrice solide, une phase liquide qui lui est liée et une phase gazeuse prise au piège entre et à l'intérieur de celles-ci ¹⁰². Le type de substrat généralement utilisé est une matière première naturelle peu onéreuse issue de résidus agricoles (son de blé, pulpe de betterave, tourteaux, etc.) faisant à la fois office de support et de source de carbone et d'énergie pour les microorganismes. L'utilisation de déchets agroindustriels en tant que substrat représente d'ailleurs une voie alternative de valorisation de ces résidus présents en grandes quantités et non exploités ^{103,104}.

Cette technologie présente de nombreux avantages par rapport à la fermentation liquide qui est beaucoup plus répandue, notamment concernant sa simplicité et son faible coût ¹⁰⁵. Le système ne comporte pas de contrainte d'oxygénation et la faible teneur en eau est propice à la croissance des moisissures qui tolèrent une faible activité de l'eau et sont résistantes à des conditions de haute pression osmotique ¹⁰⁶. L'humidité réduite permet de limiter les volumes d'effluent à traiter, les

contaminations bactériennes et facilite également l'extraction des métabolites qui sont concentrés dans le milieu de culture ¹⁰⁷. La FMS est principalement utilisée pour la production d'aliments, d'additifs alimentaires et d'autres composés dans le secteur pharmaceutique. Son application s'étend également dans bien d'autres domaines comme la biotransformation des résidus de récolte pour l'élaboration de nourriture pour les animaux et la bioremédiation de composés polluants et dangereux ^{10,108}.

1.3. Les transferts de matière à échelle microscopique

En FMS, la source de carbone, généralement constituée par un substrat lignocellulosique, est transformée de manière aérobie en biomasse microbienne, métabolites, CO_2 et H_2O . Ces transformations sont exothermiques, elles donnent donc lieu à la libération de chaleur. La génération de chaleur métabolique est d'ailleurs le facteur le plus difficile à maîtriser lors d'un changement d'échelle. Une des caractéristiques d'une FMS est également son hétérogénéité microscopique (**Figure 3**). En général, les microorganismes fongiques sont inoculés au substrat solide sous forme de spores. Une fois germées, ces dernières donnent naissance au mycélium par l'extension et la ramification de filaments (hyphes) qui se développent à la surface et à l'intérieur des particules solides (pores) en présence d'eau et de l'oxygène contenu dans les gaz. L'activité métabolique est liée à la production d'enzymes hydrolytiques catalysant la dégradation de molécules qui sont peu à peu fragmentées avant d'être absorbées par le champignon.

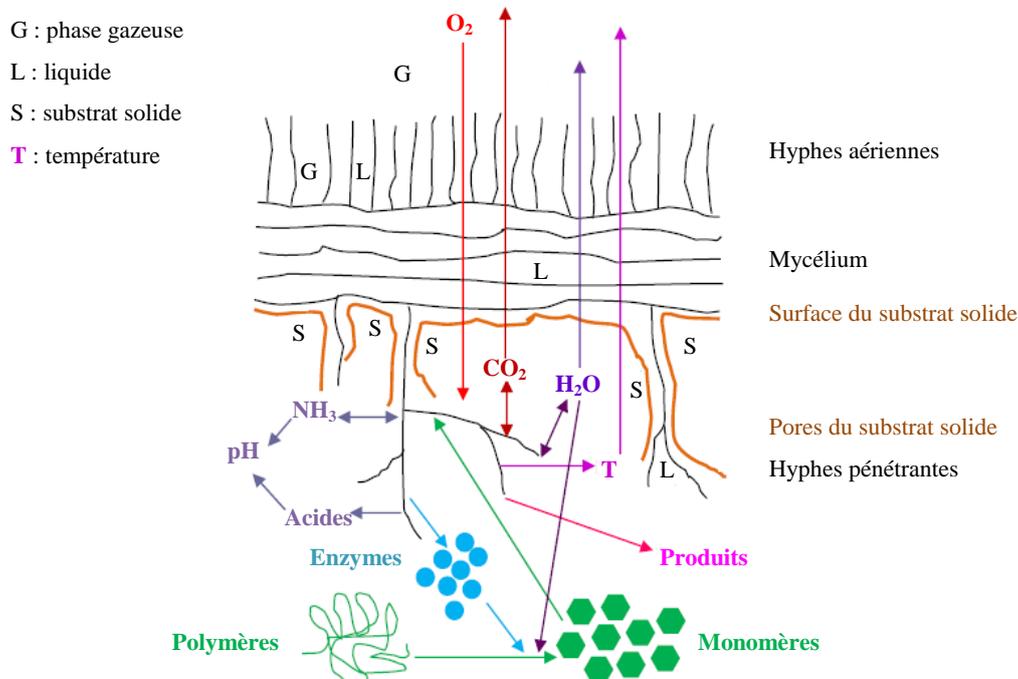


Figure 3. Réactions biologiques et physicochimiques qui apparaissent à échelle microscopique, adapté de Hölker and Lenz, 2005 ¹⁰⁴

Certains nutriments ne sont pas directement biodisponibles mais constituent la source d'énergie indispensable à la survie et à la croissance de la souche. La moisissure sécrète ainsi des enzymes hydrolytiques qui restent concentrées autour des zones de sécrétion permettant une progression plus efficace du mycélium dans le substrat. Ceci permet d'augmenter l'accessibilité aux nutriments. Les activités métaboliques génèrent de la chaleur et de l'eau tandis que le CO₂ est libéré *via* la respiration du microorganisme qui consomme l'O₂ de l'air. Lors de son développement, le microorganisme peut également modifier le pH de son milieu en libérant des molécules acides ou de l'ammoniac. Il est à noter que les produits obtenus peuvent être retenus piégés dans la matrice solide ce qui nécessite la mise en place d'un procédé d'extraction en fin de fermentation. L'ensemble de ces phénomènes sont évidemment à prendre en considération dans la mesure où ils peuvent affecter la performance et les coûts du procédé ¹⁰⁴.

1.4. Microorganismes utilisés en production alimentaire

Les champignons restent le groupe de microorganismes le plus utilisé en FMS car les conditions sont proches de leur habitat naturel et ils bénéficient d'applications très variées, grâce à leurs propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques ^{9,109}. Ce groupe très diversifié est composé d'une part, des champignons microscopiques ou micromycètes qui regroupe les levures et les champignons filamenteux et d'autre part des champignons macroscopiques dits « champignons supérieurs » dont le carpophore (organe de fructification) est visible à l'œil nu ¹¹⁰ (**Tableau 5**).

Les bactéries qui ont une importance en industrie alimentaire sont essentiellement des bactéries à Gram positif, plus résistantes à la température, à la dessiccation et à la congélation. Elles interviennent dans des procédés fermentaires solides notamment pour la fabrication et la maturation du fromage mais aussi pour l'élaboration d'aliments fermentés sur divers substrats d'origine végétale. Concernant les levures, l'espèce la plus utilisée et produite à grande échelle est *S. cerevisiae* notamment pour ses applications en panification. Le genre *Saccharomyces* est également très répandu pour l'élaboration de divers aliments fermentés *via* la FMS. Les moisissures, étant capables de produire une vaste gamme d'enzymes hydrolytiques comme les protéases, cellulases et lipases, sont importantes pour l'affinage et la transformation d'une multitude de produits alimentaires. L'étape de fermentation solide appelée « koji » en Extrême-Orient constitue la base de l'obtention d'une multitude de produits (sauces, boissons, condiments) ¹¹¹. Le potentiel commercial des champignons supérieurs comestibles les plus cultivés dans le monde réside dans leur qualité culinaire et propriétés médicinales. Le carpophore ou « champignon » en langage courant est produit en milieu solide après la croissance végétative en modifiant un certain nombre de paramètres incluant la température, la concentration en CO₂, le pH, l'humidité, la salinité et l'exposition à la lumière ¹¹².

Tableau 5. Principaux groupes de microorganismes cultivés en FMS et utilisés en production alimentaire
113,114,112,115,116

Type	Genre / espèce	Exemple d'utilisation	Substrat de culture
Bactéries	<i>Brevibacterium</i>	Fabrication de fromages	Fromage
	<i>Micrococcus</i>	Fabrication de fromages et saucissons	Fromage et viande
	<i>Lactobacillus</i>	Divers aliments fermentés	Fromage en maturation et céréales
	<i>Streptococcus</i>	Fabrication de fromages	Riz et céréales
	<i>Bacillus</i>	Aliments fermentés (natto et meju)	Maïs et soja
Levures	<i>Saccharomyces</i>	Fabrication du pain et divers produits fermentés	Maïs, blé, millet et autres céréales
	<i>Endomycopsis burtonii</i>	Aliments fermentés	Riz
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Fabrication de pain, fromages et saucissons	Blé, fromage en maturation et viande
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fabrication de fromages et saucissons	Fromage en maturation et viande
	<i>Candida</i>	Divers produits fermentés	Riz et céréales
Champignons filamenteux	<i>Pichia</i>	Divers produits fermentés	Riz et céréales
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Aliments fermentés (miso), saké, sauce soja et autres condiments	Riz, maïs, blé, orge, soja et autres céréales
	<i>Aspergillus sojae</i>	Aliments fermenté (miso), sauce soja et autres condiments	Riz, blé, maïs et soja
	<i>Aspergillus niger</i>	Aliments fermentés, saké et condiments	Riz, blé, maïs, sorgho et manioc
	<i>Aspergillus flavus</i>	Aliments fermentés	Manioc
	<i>Aspergillus awamori</i>	Aliments fermentés, liqueurs	Riz et soja
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Aliments fermentés (tempeh)	Riz et soja, céréales et légumineuses
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Aliments fermentés (tempeh)	Riz et soja
	<i>Fusarium solani</i>	Fabrication de fromages et aliments fermentés	Maïs et blé
	<i>Penicillium</i>	Fabrication de fromages	Fromage en maturation
	<i>Monascus</i>	Aliments fermentés (riz rouge)	Riz
	<i>Geotrichum candidum</i>	Fabrication de fromages	Fromage en maturation
	<i>Mucor</i>	Aliments fermentés (natto, tempeh, sufu), fabrication de fromages	Soja, riz et haricot noir
<i>Neurospora</i>	Aliments fermentés	Soja	
Champignons supérieurs	<i>Agaricus bisporus</i> (champignon de Paris)	Champignon comestible et médicinal	Paille de riz et blé
	<i>Lentinus edodes</i> (shiitake)	Champignon comestible et médicinal	Sciure de bois, rafle de maïs et pulpe de café
	<i>Pleurotus ostreatus</i> (pleurote)	Champignon comestible et médicinal	Paille de riz, blé, haricot, coton, rafle de maïs, et jacinthe d'eau
	<i>Volvaria volvacea</i> (volvaire)	Champignon comestible et médicinal	Paille de riz, blé, jacinthe d'eau et résidu de palme
	<i>Flammulina velutipes</i> (enoki)	Champignon comestible et médicinal	Son de riz et sciure de bois
	<i>Grifola frondosa</i> (maitake)	Champignon comestible et médicinal	Sciure de bois
	<i>Ganoderma lucidum</i> (reishi)	Champignon comestible et médicinal	Sciure de bois
	<i>Coprinus comatus</i>	Champignon comestible et médicinal	Sciure de bois et son de riz
<i>Hericium erinaceus</i>	Champignon comestible et médicinal	Sciure de bois et rafle de maïs	

Plusieurs souches comme *A. niger*, *A. oryzae* et *T. reesei* sont populaires et largement utilisées pour l'élaboration de produits fermentés et de divers additifs alimentaires en alimentation humaine et animale. Or ces souches sont également susceptibles de produire des mycotoxines (aflatoxine, ochratoxine, stérigmatocystine, zéaralénone et toxine trichothécène T2) dans certaines conditions appliquées en laboratoire. Il s'avère également que la production de mycotoxine est souche dépendante. Afin d'assurer la sécurité alimentaire vis-à-vis d'une éventuelle présence de mycotoxine dans les produits commercialisés, les industriels sélectionnent et maintiennent attentivement leurs souches. Des modifications génétiques peuvent également être appliquées. De nombreux produits fermentés et préparations dérivés par des souches d'*Aspergillus* ont ainsi démontré une absence totale de toxines. Plusieurs préparations à base d'enzymes issues de ces souches ont d'ailleurs obtenu le statut GRAS ¹¹⁷.

2. Conduite du procédé

2.1. Principales étapes du procédé

Les différents stades réalisés avant et au cours d'une FMS sont représentées dans la **figure 4**. En fonction du substrat et du microorganisme utilisés, les traitements appliqués au substrat sont adaptés et les paramètres de développement du microorganisme sont déterminés (température, humidité, aération et pH).

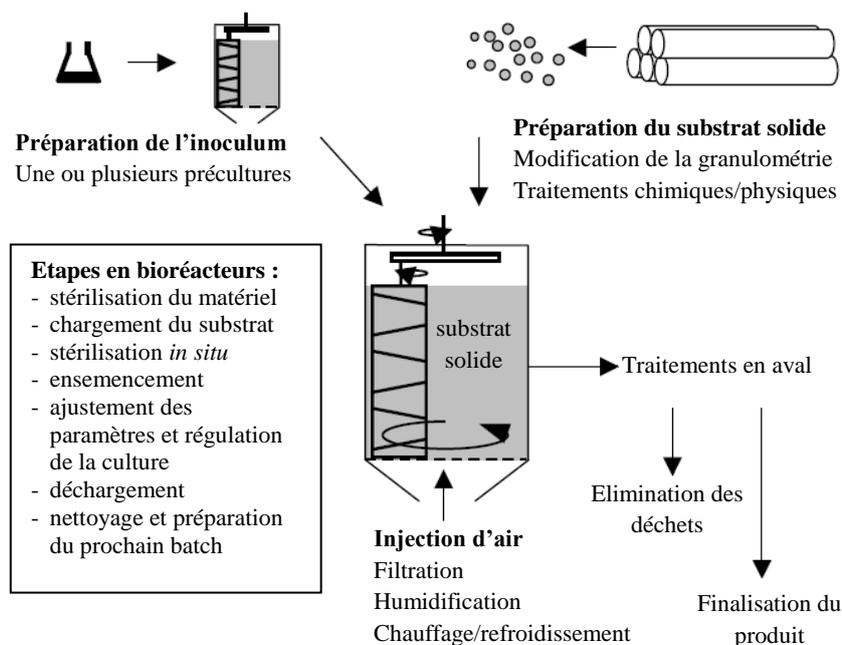


Figure 4. Principales étapes d'un procédé FMS, adapté de Mitchell *et al.*, 2006 ¹¹⁸

Le maintien des conditions optimales sont dépendantes de l'environnement, de l'équipement utilisé (fiolle Erlenmeyer munie d'un bouchon en coton ou fermenteur à aération forcée), des possibilités de prélèvements pour le suivi de croissance et de production, et des possibilités de régulations du dispositif⁹.

2.2. Facteurs influençant le procédé FMS

2.2.1. Paramètres biologiques

○ *Type de microorganisme et inoculum*

Les champignons filamenteux sont les microorganismes les mieux adaptés à la fermentation en milieu solide. Mais le choix du type de microorganisme dépend surtout du milieu à valoriser et du produit final à obtenir¹⁰⁹. Des cocultures peuvent également être avantageuses dans certains cas¹¹⁹. L'inoculation du milieu de culture se fait le plus souvent à partir d'une suspension de spores qui se conserve mieux par rapport au mycélium. La quantité optimale de spores diffère selon le cas. L'effet de la quantité d'inoculum est examiné dans plusieurs publications notamment pour la production d'enzymes. Par exemple, un taux d'ensemencement de 10^7 et 10^8 spores.g⁻¹ de substrat sec est plus approprié pour la production de xylanase par *Aspergillus* sur son de blé dans les conditions de l'essai¹²⁰. Une quantité trop importante d'inoculum peut également inhiber la synthèse des métabolites en raison de l'épuisement rapide des nutriments après germination. Il a également été démontré que l'âge et donc l'état physiologique des spores a un impact conséquent sur le développement des souches¹²¹.

○ *Nature du substrat solide*

Les substrats utilisés en fermentation solide proviennent essentiellement de résidus organiques naturels qui sont complexes et hétérogènes. La matrice solide doit avoir une bonne capacité d'absorption et doit contenir les nutriments nécessaires au développement du microorganisme (source d'azote, de carbone et de sels minéraux). Les substrats utilisés sont majoritairement les substrats lignocellulosiques (sous forme de paille, de son, de bagasse, de pulpe, etc.) et les féculents (résidus de banane, de soja, les graines, etc.). Quant aux supports minéraux et synthétiques comme l'argile et la mousse de polyuréthane, ils sont surtout utilisés à des fins de compréhension du procédé et nécessitent l'addition de solutions nutritives. Des traitements physiques (réduction de la taille des particules, chauffage, stérilisation) et chimiques (addition de nutriments et modification du pH) sont parfois nécessaires afin de favoriser l'aération et l'accessibilité aux nutriments^{9,107}.

2.2.2. Paramètres physicochimiques

○ *Taille des particules*

En FMS, la surface des particules joue un rôle important pour l'adhésion des microorganismes, les transferts des nutriments et la circulation de l'oxygène ce qui affecte directement la croissance de la souche considérée et la formation des produits. La surface disponible dépend de la taille des particules et de leur porosité. Une porosité bien étudiée facilite le passage de l'air qui entre facilement en contact avec les moisissures installées en surface des particules. Généralement les particules plus petites offrent une plus vaste surface mais peuvent facilement former des agglomérats et se compacter tandis que les grosses particules offrent une meilleure aération¹⁰³.

○ *Le pH*

Le pH varie considérablement lors du développement des microorganismes en raison de la consommation des nutriments avec des réactions d'hydrolyse, de protéolyse et de synthèse de métabolites comme les acides organiques. L'hétérogénéité du milieu et le manque de méthode de mesure ne permet pas de contrôler efficacement les variations de pH. Les champignons filamenteux peuvent se développer dans une fourchette de pH allant de 2 à 9 avec une gamme optimale entre 3 et 6 ce qui représente un avantage par rapport aux bactéries qui tolèrent des valeurs plutôt neutres^{107,9}. Les additions d'acides ou de bases permettent d'ajuster le pH du milieu si nécessaire. Le pH influence la croissance car il a un impact sur le transport de différents composants à travers les membranes cellulaires. L'accès à certains carbohydrates comme l'hémicellulose peut être fortement réduit lorsque le pH est défavorable¹²².

○ *La température*

La température globale de la culture varie considérablement en FMS puisque les activités métaboliques du microorganisme en croissance génèrent de la chaleur, elle est de ce fait difficile à réguler. La température, mesurée à l'aide de sondes enfoncées dans la culture, peut aller jusqu'à 20°C au-dessus de la température d'incubation ce qui peut entraîner un arrêt du développement du microorganisme et des activités métaboliques recherchées ainsi qu'une sporulation précoce. L'accumulation de chaleur conduit à la formation de gradients thermiques qui sont favorisés par la faible conductivité thermique et teneur en eau des milieux constitués de polymères d'origine végétale⁹. La chaleur générée peut être dissipée par l'aération et l'agitation de la culture ainsi que des additions d'eau par une injection directe ou avec de l'air humidifié. Un système de refroidissement de l'air peut également faciliter l'élimination de la chaleur (circulation et échangeur d'eau froide). Les réacteurs à

fines couches sont plus performants pour évacuer la chaleur par rapport aux couches profondes où un système de refroidissement actif doit être mis en place ¹¹⁸.

○ *L'humidité et l'activité de l'eau*

La teneur en humidité du substrat solide est un facteur clé pour le développement du microorganisme. Un pourcentage d'humidité compris entre 40 et 70% est généralement favorable au développement des champignons suivant la nature du substrat solide ¹⁰. Les substrats utilisés en FMS sont insolubles dans l'eau, celle-ci doit en revanche être absorbée par les particules solides pour pouvoir être utilisée par le microorganisme. Le taux d'absorption varie d'un substrat à l'autre suivant sa capacité maximale de rétention en eau. Une humidité trop forte peut entraîner des problèmes de compaction lorsque les particules sont trop fines ou lorsque des particules plus grosses se ramollissent. L'altération de la structure des particules solides limite les transferts d'oxygène et de chaleur au sein de la matrice. Les variations de la teneur en eau sont dues à l'hydrolyse du substrat et au phénomène d'évaporation lié aux calories générées par le microorganisme en croissance ¹²³.

L'eau est impliquée dans la croissance cellulaire, les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, les transports des éléments nutritifs, des métabolites extracellulaires et des gaz au cours de la fermentation solide. Les besoins en eau des microorganismes sont reflétés par l'activité de l'eau (a_w) qui représente la disponibilité en eau pour une réaction dans un substrat solide. Ce paramètre thermodynamique dont les valeurs sont comprises entre 0 et 1, est mesuré selon le rapport entre la pression de vapeur d'eau au-dessus de la surface du produit et la pression de vapeur d'eau de l'eau pure. Il donne une indication de la teneur en eau libre et détermine également quel type de microorganisme est capable de s'y développer ^{124,9}.

○ *L'aération*

L'aération dans un système FMS permet de maintenir des conditions aérobies et d'éliminer le dioxyde de carbone ou d'autres composés volatils issus du métabolisme. Elle a également pour rôle de réguler la température ainsi que la teneur en eau du substrat solide. Le choix d'un milieu poreux facilite la régulation de ces paramètres car les transferts sont facilités. Généralement, l'oxygène ne constitue pas un facteur limitant en fermentation solide lorsque le substrat est bien étudié ^{9,107}. La circulation de l'air peut se faire de manière active par injection d'air humidifié ou passive par passage de l'air à la surface des particules ¹¹⁸.

- *Apport de sources exogènes de carbone et d'azote*

Parmi les paramètres de culture, le ratio carbone/azote est un des facteurs les plus importants pour la croissance du microorganisme et pour orienter la production de biomasse et de produit d'intérêt. Un excès ou un manque d'azote dans le milieu de culture peut être le facteur limitant. Les coproduits agricoles et agroindustriels présentent des contenus en azote très variables. Un ratio supérieur à 20 est généralement favorable pour la plupart des champignons ¹²⁵. Le type et la nature de ces composés peuvent également affecter le procédé de fermentation. Le ratio C/N détermine aussi la sporulation qui peut être induite ou retardée. Des ratios C/N peuvent être spécialement appliqués pour l'obtention de certains produits qui sont partiellement ou non liés à la production de biomasse ¹²⁶. La supplémentation en azote et/ou en carbone n'est pas toujours nécessaire et dépend du contenu en azote du substrat de base ainsi que des besoins du microorganisme ¹²².

2.3. Estimation de la biomasse

La biomasse est un paramètre fondamental car il caractérise la croissance des microorganismes et permet d'établir sa cinétique. La mesure directe de biomasse est impossible à réaliser dans le cas des champignons filamenteux en raison du problème de séparation du mycélium avec le substrat. Plusieurs méthodes biochimiques et de spectrométrie permettent toutefois de faire une estimation, notamment grâce à la variation de certains composants cellulaires spécifiques comme la glucosamine et l'ergostérol. Les méthodes d'extraction et d'analyses de ces composés sont cependant laborieuses et ils peuvent varier au sein de la biomasse en fonction des conditions de culture, de l'état physiologique et de l'âge du microorganisme ¹²⁷.

D'après la littérature (**Tableau 6**), les méthodes disponibles ne sont pas toujours performantes et fiables en raison de problèmes d'interférences, de sensibilité et de difficultés opérationnelles et de préparation des échantillons. Le problème commun à ces méthodes est la relation entre la biomasse et le facteur mesuré qui peut changer au cours du temps ¹²⁸. De plus, une corrélation entre plusieurs facteurs est souvent difficile à mettre en évidence. Une méthode plus directe peut également être utilisée, comme la mesure de la production de dioxyde de carbone. Celle-ci peut notamment être corrélée à plusieurs paramètres mesurables comme la perte de masse sèche par exemple ^{129,130}.

Tableau 6. Bilan des méthodes les plus utilisées pour l'estimation de la biomasse en FMS ^{127,128 131,107,132,133}

Catégorie	Cible	Commentaire
Composants cellulaires spécifiques	Ergostérol	Propre à la biomasse fongique, instable, varie en fonction du stade de développement et des conditions de culture, difficulté de la méthode
	Glucosamine et chitine	Propre à la biomasse fongique, varie en fonction des conditions de culture et de l'état physiologique, difficulté de la méthode
	Spores	Fortes variations suivant les conditions de culture, peu précis, pas de distinction spore/mycélium pour la viabilité
	Acides nucléiques et ADN	Fortes variations, interférences suivant le milieu de culture, difficulté de la méthode
	Protéines	Non applicable si le substrat contient également des protéines
Activités métaboliques	Métabolites secondaires	Dépendants du stade de développement, difficulté des méthodes
	Respiration (consommation d'O ₂ et production de CO ₂)	Nécessite des installations étanches ou des mesures en ligne, rapidité de la méthode
	Activité enzymatique	Dépendante du substrat, de l'état physiologique et des conditions de culture
	Consommation de nutriments (ex sucres)	Dépendante du substrat, de l'activité métabolique et de l'état physiologique du microorganisme
	Production d'ATP	Estime l'activité microbienne, non corrélée à la croissance, résultats peu fiables
	Perte de masse sèche	Mesure corrélée à la respiration, nécessite une précision de mesure
Propriétés physiques	Analyse d'image par des techniques de microscopie	Equipements onéreux, difficile à appliquer, nécessite de développer des logiciels
	Production de chaleur métabolique, réflectance (réflexion de la lumière) et capacitance (charge électrique)	Mesures en ligne, interférences liés à la nature et à l'hétérogénéité du substrat

3. Les bioréacteurs

3.1. Caractéristiques générales des bioréacteurs

Le bioréacteur est le cœur du processus de fermentation, c'est le lieu de conversion de la matière première en produit désiré et c'est également l'outil qui permet d'optimiser globalement le procédé. L'augmentation d'échelle représente un défi majeur en raison de la présence de différents gradients (température, humidité, oxygène, concentration en nutriments) qui peuvent avoir des effets néfastes particulièrement en condition statique mais aussi dans le cas où la culture peut être agitée. L'ensemble des relations entre certains facteurs environnementaux comme le contenu en oxygène, en humidité et la température contribuent à la difficulté de réguler ces paramètres. Le bon choix du substrat solide, du réacteur ainsi que le suivi minutieux de la culture à l'aide de sondes de températures et d'humidité relative permet de mener à bien une culture ¹⁰⁵. D'après Raghavarao *et al.*, le bioréacteur doit comprendre un certain nombre de caractéristiques et fonctionnalités :

- Le matériau constituant le bioréacteur doit avoir un coût abordable, être solide, résistant à la corrosion et non toxique pour les microorganismes
- Un système de prévention concernant l'entrée et la sortie de contaminants doit être mis en place en utilisant des outils de stérilisation par vapeur vive et éventuellement un filtre retenant les spores en suspension dans l'air sortant du réacteur

- Il faut une agitation, une aération et une évacuation de chaleur efficace, pour contrôler la température, la teneur en eau et en oxygène dans le milieu
- Le maintien de l'uniformité du substrat se fait si possible par le brassage mécanique qui est crucial pour éviter les gradients thermiques
- Le bioréacteur doit pouvoir faciliter le processus de préparation de la fermentation, les étapes de chargement et déchargement, ainsi que la récupération du produit ¹²³

3.2. Classification

Depuis ces vingt dernières années de réels progrès ont été réalisés dans la conception de réacteurs pour la FMS. Généralement, les bioréacteurs peuvent être divisés en quatre grandes catégories basées sur leur fonctionnement, essentiellement concernant le type d'aération et le système de brassage (**Figure 5**) ¹¹⁸.

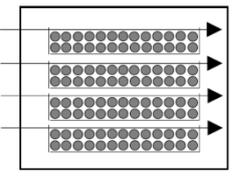
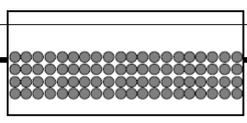
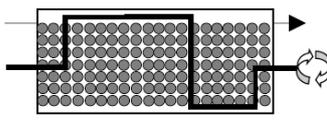
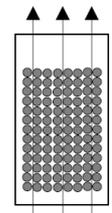
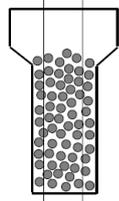
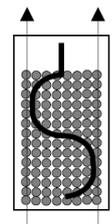
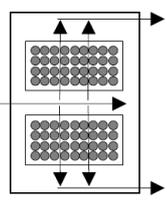
Aération	Agitation			
	Pas ou très peu d'agitations	Agitations continues ou intermittentes		
Aération non forcée (l'air passe autour de la couche)	 Réacteur à plateaux	 Tambour rotatif	 Tambour rotatif à agitation	
Aération forcée (l'air passe à travers la couche)	 Réacteur à lit fixe, couche profonde	 Lit fluidisé	 Réacteur agité couche profonde	 Tambour rotatif à aération forcée

Figure 5. Classification des réacteurs utilisés en FMS suivant leurs systèmes d'aération et d'agitation, adapté de Mitchell *et al.*, 2006 ¹¹⁸

Les réacteurs ont chacun leurs avantages et inconvénients, ce qui incite le développement de nouveaux designs. Leur configuration doit également permettre un fonctionnement continu en maintenant une forte productivité sur des périodes prolongées sans toutefois rencontrer des problèmes opérationnels. L'évacuation de chaleur ainsi que l'hétérogénéité du milieu solide sont les obstacles majeurs qui limitent la viabilité commerciale des bioréacteurs, plusieurs modèles ont donc été développés pour tenter de résoudre ces problèmes mais uniquement quelques-uns ont pu être utilisés à grande échelle ^{10,103}. C'est surtout la hauteur de couche et le système d'agitation qui définissent les types de réacteurs extrapolables industriellement. Les deux réacteurs les plus commercialisés sont

celui à couche profonde à aération forcée et à agitation mécanique et celui en couche mince à lit statique en plateau (type Koji). Ces fermenteurs ont d'ailleurs fait leur preuve dans le cadre d'études réalisées à échelle pilote au sein de la PPB à Dijon.

3.3. Les réacteurs les plus exploités au stade pilote et industriel

Le nombre de réacteurs utilisés au stade industriel est limité, les fournisseurs actuels sont tous asiatiques comme la société Fujiwara et certaines installations sont réalisées sur mesure à l'aide de cabinets d'ingénieries comme pour la PPB par exemple. Il existe donc peu d'informations sur les fermenteurs industriels ⁹. Les modèles développés au stade pilote sont cependant bien décrits dans la littérature et potentiellement extrapolables à échelle industrielle.

3.3.1. Le réacteur à plateaux

Le réacteur de type plateau est le plus simple des bioréacteurs utilisé en FMS. Il a été utilisé depuis plusieurs siècles pour la fabrication d'aliments fermentés traditionnels en Asie. La chambre de fermentation se rapproche du fonctionnement d'une étuve qui peut contenir un certain nombre de larges plateaux séparés de quelques centimètres pour garantir une aération homogène (**Figure 6**).

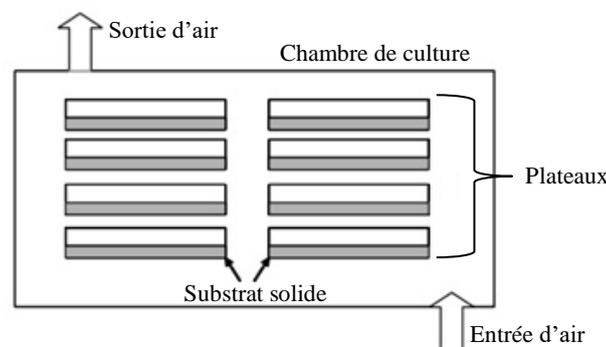


Figure 6. Schéma simplifié d'un réacteur à plateaux étagés de type « Koji », adapté de Cauto and Sanroman, 2006 ¹⁰³

L'inconvénient de cette technologie est la faible diffusion de l'air à travers la couche et la formation d'un gradient de température, c'est pourquoi la hauteur de couche reste limitée. Le substrat est donc principalement exploité en surface par le microorganisme et non en profondeur. Ce procédé reste tout de même bien adapté aux espèces à croissance lente ou qui ne supportent pas l'agitation comme les moisissures dont les hyphes ne sont pas cloisonnés ¹³⁴. Le fonctionnement de ce type de réacteur nécessite cependant une main-d'œuvre non négligeable et des infrastructures supplémentaires pour les opérations de stérilisation du substrat, chargement/déchargement des plateaux et d'inoculation ¹⁰³. La société Fujiwara a développé un réacteur plus efficace muni d'un système d'aération et d'agitation

avec des hélices à ruban et un plateau rotatif. La hauteur de couche reste toutefois limitée à 50 cm au stade industriel et son mode de fonctionnement n'est prévu que pour un seul plateau circulaire. En raison de l'automatisation de nombreuses fonctions la main-d'œuvre nécessaire au fonctionnement du bioréacteur est réduite par rapport aux traditionnels réacteurs à plateaux ¹⁰⁵.

3.3.2. Le réacteur à couche profonde

L'agitation combinée à une aération forcée et à une addition d'eau permet d'éviter les gradients de température et d'humidité qui peuvent se produire dans d'autres types de réacteurs. La capacité maximale des enceintes de fermentation est donc généralement plus importante. De plus le système d'aération forcée avec de l'air humidifié traverse toute la couche de la culture et permet ainsi un développement plus homogène des microorganismes (**Figure 7**). Le choix d'une agitation continue ou par intermittence dépend de la sensibilité du microorganisme et des propriétés des particules du substrat telles que leur résistance mécanique et la granulométrie ¹³⁴.

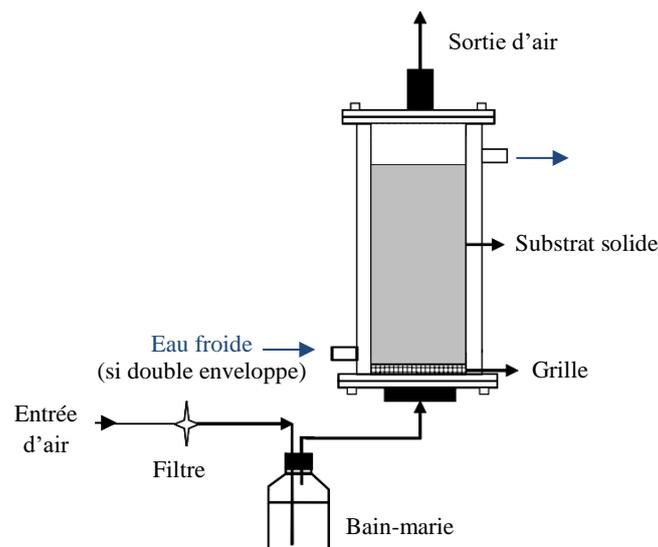


Figure 7. Schéma simplifié d'un réacteur à couche profonde sans système d'agitation, adapté de Cauto and Sanroman, 2006 ¹⁰³

Grâce à l'automatisation des fonctions et à l'efficacité de l'aération, la hauteur de couche peut être plus élevée (jusqu'à 1 m) par rapport à un réacteur de type plateau. La plupart des paramètres de cultures peuvent être contrôlés avec notamment des modèles mathématiques pour le maintien de l'humidité en prenant en compte la perte de masse sèche et l'évaporation. Ce type de réacteur au stade pilote a été utilisé avec succès à la PPB pour l'enrichissement en protéine de sous-produits agroalimentaires ainsi que pour la production d'enzymes et de biopesticides. D'une capacité d'une tonne et demie (1,6 m³), il répond parfaitement aux critères d'automatisation d'un certain nombre d'opérations, extrapolation possible au niveau industriel, études des bilans, estimation du coût de fonctionnement et production d'aliments pour des tests sur animaux ^{135,105}.

4. Intérêt de la technologie appliquée au tourteau de colza

4.1. Production d'aliments fermentés

L'aliment destiné aux animaux d'élevage est généralement produit à partir de sous-produits de l'agriculture qui sont plutôt pauvres en nutriments auxquels il faut apporter des ingrédients pour améliorer la digestibilité, les niveaux d'acides aminés essentiels, de vitamines et de minéraux. La plupart de ces sous-produits ne conviennent pas à l'alimentation des monogastriques et l'utilisation d'additifs contribue fortement à l'augmentation du coût de production et du prix final des aliments. Face à ces contraintes, la culture de microorganismes par le procédé FMS directement sur ces sous-produits offre de nombreux avantages¹³⁶.

Les moisissures et bactéries poussent rapidement et produisent une grande quantité de protéines dans leurs cellules estimée de l'ordre de 600 g.kg⁻¹. La biomasse microbienne apporte les acides aminés essentiels en plus des hauts niveaux de vitamines et de minéraux. La croissance de microorganismes entraîne également la sécrétion de nombreuses enzymes extracellulaires dont certaines sont habituellement additionnées aux aliments destinés aux animaux d'élevage. Ces biocatalyseurs sont produits et utilisés directement dans l'aliment limitant ainsi la supplémentation par des additifs. Les substrats utilisés peuvent être très diversifiés car les microorganismes sont capables de dégrader les composés récalcitrants tels que les fibres comme la lignine des déchets verts. Le **tableau 7** fait l'inventaire des travaux effectués jusqu'à présent en FMS sur différents substrats lignocellulosiques pour l'élaboration de nourriture pour animaux^{6,136}. Le procédé provoque un enrichissement en protéine qui est généralement accompagné d'une extraction de produits d'intérêt comme les enzymes et les acides organiques. La production d'aliments enrichis en protéines peut être particulièrement attractive lorsque le coût des matières premières est faible⁶.

Les tourteaux d'oléagineux représentent seuls ou en tant que cosubstrats une bonne source de nutriments pour le développement de microorganismes par FMS. La production industrielle d'enzymes montre d'ailleurs des résultats prometteurs pour plusieurs espèces fongiques notamment des *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Mucor*. Les tourteaux sont également utilisés pour la production de champignons comestibles (*Pleurotus*), de métabolites secondaires comme les antibiotiques et biopesticides et d'autres composés d'intérêt comme les acides organiques et les antioxydants⁸. Les moisissures sont généralement plus efficaces par rapport aux bactéries en raison de leur morphologie et physiologie leur permettant de coloniser plus aisément ce type de substrat⁴⁰. Les études citées jusqu'à présent dans la littérature concernant la bioconversion du tourteau de colza sont relativement limitées aux champignons filamenteux et à l'exploration de leur pouvoir hydrolytique pour la production d'enzymes et la détoxification. En effet, de nombreuses études montrent une réduction la teneur en facteurs antinutritionnels comme les glucosinolates et leurs

dérivés, les tannins et l'acide phytique^{137,43}. Une baisse de la quantité de fibres a également été mise en évidence par plusieurs auteurs grâce aux activités enzymatiques des champignons filamenteux (endoglucanases, xylanases, protéases et les phytases)⁷. Une étude a également été menée avec des champignons supérieurs (*Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus*) qui sont particulièrement efficaces pour la dégradation des composés phénoliques et la production de laccases¹³⁸.

Tableau 7. Microorganismes employés en FMS sur résidus agroindustriels pour la production d'aliments pour animaux enrichis en protéines^{6,139}

Substrat	Microorganismes utilisés	
	Champignons filamenteux et supérieurs	Bactéries et levures
Manioc (épluchure, bagasse, tubercule et amidon)	<i>Rhizopus oryzae</i> et spp. ; <i>Aspergillus niger</i> et spp. <i>Cephalosporium eichhorniae</i> ; <i>Pleurotus</i> spp. <i>Lentinus</i> spp. <i>Geotricum fragrans</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Brevibacterium divaricatum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Café (pulpe, coque et autres résidus)	<i>Pleurotus</i> spp	<i>Streptomyces</i> spp. et <i>cyaneus</i>
Blé (son, paille), moutarde (paille), haricot (paille), jacinthe d'eau	<i>Coprinus fimetarius</i> ; <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ; <i>Pleurotus ostreatus</i> et <i>eryngii</i> ; <i>Phlebia radiata</i> ; <i>Neurospora sitophila</i> ; <i>Trametes versicolor</i> et spp. ; <i>Ganoderma</i> spp. ; <i>Trichoderma</i> spp. ; <i>Lentinus edodes</i>	Bactéries cellulolytiques <i>Streptomyces cyaneus</i> <i>Rhodotorula gracilis</i>
Pomme, ananas et raisin (marc, pulpe et autres résidus), caroube (gousse)	<i>Rhizopus oligosporus</i> ; <i>Pleurotus ostreatus</i> et spp. ; <i>Penicillium funiculosum</i> ; <i>Myrothecium verrucaria</i> ; <i>Aspergillus niger</i>	<i>Candida utilis</i> <i>Saccharomyces</i> spp.
Riz (son, paille et autres résidus)	<i>Aspergillus niger</i> et <i>oryzae</i> ; <i>Trichoderma viride</i> et <i>reesei</i> ; <i>Pleurotus sajor-caju</i> et <i>ostreatus</i> ; <i>Rhizopus</i> spp.	<i>Candida utilis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Canne à sucre (bagasse et autres résidus)	<i>Trichoderma reesei</i> et <i>viride</i> ; <i>Aspergillus niger</i> ; <i>Pleurotus</i> spp.	-
Bois (sciure et autres résidus)	<i>Pleurotus</i> spp.	-
Pulpe de betterave	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>aureoviride</i> et spp.	-
Tourteau de palme	<i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>longiobrachiatum</i> et <i>koninggi</i> ; <i>Aspergillus niger</i>	-

4.2. Enrichissement en protéines et amélioration de la digestibilité

Dans la littérature uniquement quelques études se sont focalisées sur l'enrichissement en protéine du tourteau de colza (**Tableau 8**), la plupart des auteurs exploitant essentiellement les aspects décrits dans le paragraphe précédent.

La teneur en azote totale dans les produits fermentés est essentiellement déterminée par la méthode Kjeldhal ou Dumas et implique une augmentation de la quantité d'azote protéique selon la relation $N \times 6,25$. Les auteurs affirment que la perte de masse sèche, liée à la dégradation des sucres

fermentescibles est la raison possible de l'augmentation de la teneur en protéines après fermentation ⁵. Le profil en acide aminé varie également suite au procédé FMS avec notamment une conversion des protéines du tourteau en acides aminés libres ^{7,140}. Les niveaux des différents acides aminés du tourteau fermenté sont néanmoins dépendants du métabolisme de la souche considérée ¹⁴¹.

Différentes études rapportent également que la digestibilité des protéines est améliorée dans le cas d'une fermentation car elle est liée aux dégradations de protéines plus complexes. A titre d'exemple, un écart de 23% (digestibilité enzymatique) par rapport au contrôle a été mis en évidence pour une culture de trois jours avec un *Aspergillus niger* ⁷. La méthodologie employée pour la mesure *in vitro* de la qualité des protéines dans un aliment est très diversifiée. Une des approches la plus couramment utilisée est le traitement enzymatique avec des enzymes digestives telles que la pepsine, la trypsine et la pancréatine qui agissent dans des conditions mimant l'environnement du tractus digestif de l'animal (température, pH, cycles d'agitation) ^{7,141}. La solubilité des protéines du tourteau de colza peut également être déterminée dans l'hydroxyde de potassium. Cette méthode a d'ailleurs été corrélée à la digestibilité des acides aminés chez le poulet et donne une indication sur la qualité du tourteau qui est fortement influencée par les traitements thermiques appliqués lors du procédé de trituration des graines de colza ^{142,143,32}. La capacité de certaines souches à produire de nombreuses enzymes hydrolytiques permet d'obtenir une conversion des fibres et des oligosaccharides plus rapide en biomasse. C'est le cas par exemple de *T. reesei* dont l'augmentation relative de la teneur en protéines dans le tourteau de colza est de 23% en 7 jours de culture alors qu'une levure (*Pichia*) dépourvue d'activité cellulase affiche une teneur deux fois moindre dans le produit fermenté en fin de culture. Les phytases microbiennes capables de dégrader l'acide phytique, libèrent également le phosphore qui devient ainsi disponible pour être assimilé par l'animal ¹⁴⁴.

L'ajout d'éléments nutritifs permet généralement d'optimiser le milieu de culture et d'améliorer la production de biomasse en équilibrant par exemple le ratio C/N. Dans le cadre d'une étude réalisée avec la souche *A. niger*, la croissance de la souche est considérablement ralentie sur tourteau de colza seul car le ratio C/N n'est sans doute pas favorable au développement de la souche. L'ajout d'une source de carbone et d'azote supplémentaire comme le son de blé à hauteur de 30% est bénéfique non seulement par rapport aux nutriments apportés, mais également pour améliorer la granulométrie du substrat solide car le tourteau de colza a tendance à former des agglomérats une fois humidifié ⁷. Celui-ci contient généralement 5 à 6% d'azote et affiche un ratio C/N d'environ 8/1 ¹⁴⁵. Aussi, par rapport à la valeur donnée en protéine brute totale, le tourteau de colza contient une fraction d'environ 14% d'azote non protéique qui peut éventuellement être disponible pour la conversion en protéines microbiennes ^{146,147}. Les suppléments en source d'azote minérale (sels d'ammonium) ou organique (urée, extrait de malt, peptones, etc.) et de carbone par exemple sous forme de sucre optimisent les performances des microorganismes car ils fournissent des nutriments plus facilement

métabolisables. La stimulation de la croissance des microorganismes permet ainsi d'améliorer leur rendement pour la dégradation des facteurs antinutritionnels et la concentration en protéine ¹⁴⁸.

L'efficacité de certaines cocultures sur tourteau de colza a été mise en évidence en utilisant des champignons filamenteux du genre *Aspergillus*, *Geotrichum* et *Lichtheimia*, des levures du genre *Candida* ainsi que des bactéries du genre *Lactobacillus*. La synergie des réactions d'hydrolyse puis de consommation des nutriments sont à l'origine d'un produit fermenté plus riche en protéines par rapport aux monocultures étudiées dans les mêmes conditions. Les sucres libérés par l'activité enzymatique des champignons sont efficacement métabolisés par les levures ou les bactéries qui se développent ainsi en même temps. Les cocultures sont néanmoins difficiles à mettre en place en raison du risque d'inhibition inter-espèce ^{137,149}.

Tableau 8. Bilan des études réalisées en FMS sur tourteau de colza démontrant un enrichissement en protéines

Référence	Souche	Substrat	Equipement utilisé	Conditions de culture	Protéines totales par rapport au poids sec			
					Produit non fermenté (%)	Incubation (j)	Produit fermenté (%)	Augmentation / contrôle (%)
5	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Tourteau de colza autoclavé 15 min à 121°C	Boîte de Pétri (9 cm)	25°C, matière sèche environ 30%	27,1	2	33,3	23
						5	36,3	34
						8	39,9	47
7	<i>Aspergillus niger</i>	Tourteau de colza 70% avec son de blé 30% autoclavé 20 min à 121°C	Fiole Erlenmeyer (250 mL)	30°C, matière sèche 40%	31,8	2	38,1	20
						3	39,2	23
146	<i>Trichoderma reesei</i>	Tourteau de colza autoclavé 20 min à 121°C	Fiole Erlenmeyer (500 mL)	30°C, matière sèche 50%, pH optimum pour chaque souche	36,1	7	44,4	23
	<i>Fusarium venenatum</i>						40,2	11
	<i>Mucor circinelloides</i>						40,7	13
	<i>Aureobasidium pullulan</i>						41	14
	<i>Pichia kudriavzevii</i>						39,7	10
137	<i>Lichtheimia</i> + <i>Aspergillus terreus</i> + <i>Candida tropicalis</i>	Tourteau de colza autoclavé 15 min à 115°C + 2% (NH ₄) ₂ SO ₄ et 1% glucose	Fiole Erlenmeyer (150 mL)	30°C, matière sèche 40%	38	2	46,2	22
						4	48,4	27
141	<i>Aspergillus niger</i>	Tourteau de colza préhydrolysé et autoclavé 15 min à 121°C	Fiole Erlenmeyer (250 mL)	24°C, matière sèche 35%	48,1	3	55,8	16
150	<i>Aspergillus ficuum</i>	Tourteau de colza autoclavé 45 min à 121°C	Fiole Erlenmeyer (500 mL)	30°C, matière sèche environ 30%	ND	2	ND	25
148	<i>Aspergillus niger</i>	Tourteau de colza + urée, glucose et solution minérale	ND	25 °C, pH 6	37,2	1	43,5	17

151	<i>Bacillus subtilis</i>	Tourteau de colza	ND	30°C, matière sèche environ 30%	36,1	2	40,6	13
144	<i>Aspergillus niger</i>	Tourteau de colza	ND	ND	30,99	ND	35,81	16
	<i>Lactobacillus fermentum</i> +				33,8	7	35,2	4
67	<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Bacillus subtilis</i>	Tourteau de colza 75% + de son de blé 24% + sucre 1%	Sac multicouche (25 kg)	30°C, matière sèche 60%	33,8	12	36,1	7
43	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Tourteau de colza autoclavé 30 min à 110°C	Boîte de Pétri (19 cm)	32°C, matière sèche environ 40%, pH 5	37,8	1,7	41,1	9
152	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Tourteau de colza autoclavé 45 min à 121°C	Fiole Erlenmeyer (500 mL)	30°C	ND	2	ND	25

ND : Pas de données disponibles

4.3. Effets bénéfiques chez l'animal

A l'heure actuelle, les études publiées sont infimes concernant la détermination des effets du tourteau de colza fermenté chez l'animal. La plupart des essais FMS ont été effectués avec des microorganismes probiotiques et des levures dont les effets positifs chez l'animal sont déjà connus. Chiang *et al.*, démontrent que le tourteau de colza fermenté avec plusieurs microorganismes (bactéries et levure) améliore les performances et la digestibilité des nutriments chez le poulet. Les performances ont d'ailleurs été similaires à celles obtenues avec du tourteau de soja. L'apport de *Lactobacillus* a de plus une action probiotique bénéfique sur la structure intestinale des animaux et peut avoir des effets positifs contre la colonisation par des pathogènes comme *Salmonella*^{67,153}. L'augmentation des niveaux d'anticorps dans le sérum des animaux a également été mise en évidence suggérant la présence de peptides bioactifs qui ont la capacité de stimuler le système immunitaire^{154,155}. Des essais chez le porc montrent que le tourteau fermenté avec *A. niger* contient plus d'énergie digestible et métabolisable que le tourteau non fermenté¹⁴⁴.

Plusieurs auteurs se sont focalisés sur l'utilisation du tourteau de soja fermenté pour une utilisation chez les porcelets qui sont particulièrement sensibles à la présence de facteurs antinutritionnels dans les régimes à base de soja. Les microorganismes utilisés sont essentiellement des bactéries du genre *Bacillus* et *Lactobacillus* et des moisissures du genre *Aspergillus oryzae*. Les effets bénéfiques de ces études sont multiples et concernent surtout la digestibilité et l'utilisation des nutriments avec notamment une diminution des protéines allergènes et des diarrhées¹⁵⁶, mais aussi une amélioration de la microflore¹⁵⁷. Les performances de croissance obtenues sont significatives par rapport aux produits non fermentés ou à d'autres sources de protéines testées¹⁵⁸.

IV. Le potentiel immunomodulateur des polysaccharides fongiques

1. Les β -glucanes

La volonté de pouvoir manipuler le système immunitaire afin d'obtenir des effets bénéfiques sur la santé humaine et animale a conduit à la découverte d'une grande variété de composés naturels dont les polysaccharides, et en particulier les β -glucanes. Ce groupe très diversifié, constitué de polymères de glucose, suscite un intérêt considérable par la communauté scientifique ces dernières années.

1.1. Définition et caractéristiques des immunomodulateurs

Les composés qui sont capables d'interagir avec le système immunitaire en activant ou en inhibant des réponses spécifiques à l'hôte sont classifiés d'immunomodulateurs. L'effet de ce type de composé dépend d'un certain nombre de facteurs comme son mécanisme d'action propre, la dose et son mode d'administration. Parmi les nombreux composés naturels étudiés les polysaccharides ont été largement reconnus comme des molécules ayant un fort potentiel immunomodulateur ¹⁴.

Les polysaccharides d'origine naturelle gagnent de plus en plus d'importance en recherche biomédicale en raison de leur large spectre de propriétés thérapeutiques et leur faible toxicité. Les champignons sont depuis longtemps étudiés pour leurs effets pharmacologiques et particulièrement les levures ainsi que les *Basidiomycètes* qui regroupent la majorité des champignons médicinaux. Ces derniers ont été traditionnellement cultivés depuis plus de 1000 ans principalement en Asie et sont toujours commercialisés de nos jours à des fins thérapeutiques. L'importance des effets bénéfiques obtenus suite à leur consommation est associée principalement aux polysaccharides présents dans leur paroi cellulaire. Les immunomodulateurs fongiques ont été identifiés comme étant essentiellement des β -glucanes associés à la chitine, aux manannes et à des protéines ¹⁵. Les β -glucanes bénéficient de nos jours du statut GRAS délivré par la FDA pour une utilisation en tant qu'additif alimentaire chez l'homme et l'animal ¹⁵⁹. Ces polysaccharides sont également étudiés en tant qu'alternative à l'utilisation d'antibiotique en alimentation animale notamment chez la volaille. La stimulation des fonctions immunitaires est une approche stratégique visant à améliorer la santé des animaux et à réduire les pathogènes nuisibles du système digestif ⁹⁵.

1.2. Sources, propriétés physiques et chimiques des β -glucanes

Les β -glucanes sont des composants structurels des parois cellulaires présents chez plusieurs organismes vivants eucaryotes et procaryotes y compris les bactéries, champignons, levures, algues et plantes. La structure des β -glucanes varie suivant les sources et reflète les différences observées au niveau de leur fonctionnalité. Les β -glucanes constituent une des formes de polysaccharide la plus abondante dans les parois des bactéries et des champignons (**Figure 8**) ¹⁶⁰. Ces macromolécules sont liées à la chitine, une fibre cristalline composée de résidus de N-acétylglucosamine. L'ensemble de la matrice est également composé de manannes, des polymères linéaires de mannose, associées à des protéines qui forment ainsi des complexes de glycoprotéines ¹⁶¹. Les β -glucanes sont composés de polymères de glucose liés les uns aux autres par une liaison glycosidique linéaire $\beta(1\rightarrow3)$ et peuvent présenter des ramifications très diversifiées. Ceux-ci dérivent de la chaîne principale, et sont de type $\beta(1\rightarrow6)$ pour les champignons.

En solution aqueuse, les β -glucanes forment des structures complexes en hélice (simple, double et triple) et en ressort multiple et aléatoire suivant leur degré de ramification. En général les β -

glucanes de levure présentent des ramifications plus longues que ceux des champignons, quant aux bactéries la structure reste linéaire car elle est uniquement constituée de liaisons $\beta(1\rightarrow3)$ entre unité glucopyranosyle. L'activité immunomodulatrice est dépendante de leur complexité de conformation. Un haut degré de complexité structurale peut être associé à des effets immunomodulateurs et anticancéreux plus forts ^{160,95}. La solubilité dépend également du degré de polymérisation et de la structure physique des molécules, généralement les β -glucanes solubles ont des effets pharmacologiques plus puissants que les insolubles sachant que ceux qui sont administrés oralement sont par la suite dégradés en oligomères plus petits après ingestion favorisant leur dissémination dans l'organisme ¹⁶². Les différences entre poids moléculaire n'exercent pas une influence évidente sur les propriétés médicinales. En effet le poids moléculaire variable de certains β -glucanes comme le schizophyllane ($100\text{-}10^4$ kDa) ou le lentinane ($400\text{-}800$ kDa) n'a aucune incidence sur leur efficacité pharmacologique. De même pour d'autres polysaccharides isolés de différentes fractions de *Tremella fuciformis* dont la masse peut varier entre 53 et 1000 kDa ¹⁶³.

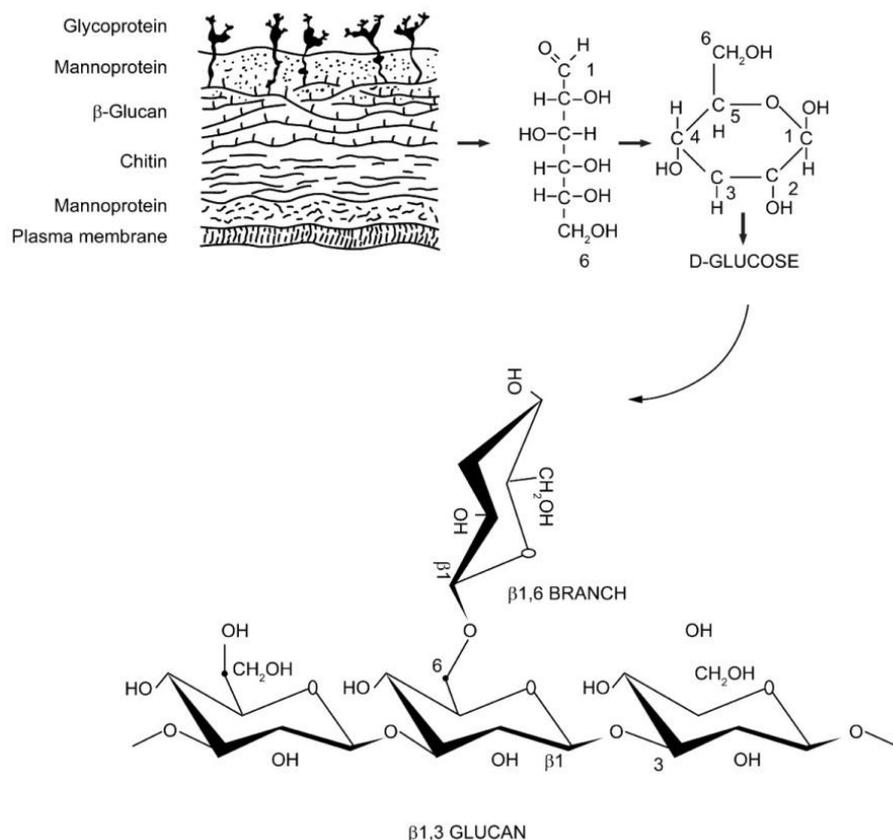


Figure 8. Structure moléculaire (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 6)- β -glucane fongique ¹⁶⁰

2. Mécanisme d'action sur le système immunitaire

2.1. Modèle mammifère

Une très faible quantité de β -glucane (< 0.5%) passe en réalité dans le sang après ingestion d'après des tests *in vivo* effectués chez l'animal. Malgré cette faible absorption, des effets significatifs sur le système immunitaire ont été démontrés en étudiant la réponse humorale et cellulaire. Après ingestion, les β -glucanes sont captés par les macrophages *via* le récepteur Dectin-1 le long du tractus digestif. Ces derniers vont les fragmenter et les transporter vers la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse. Les macrophages vont ainsi induire une cascade de signalisation entraînant l'activation d'autres cellules telles que les lymphocytes. Les deux types de réponses immunitaire, à savoir adaptative et innée, peuvent donc être modulées par les β -glucanes ¹⁶⁰ (Figure 9).

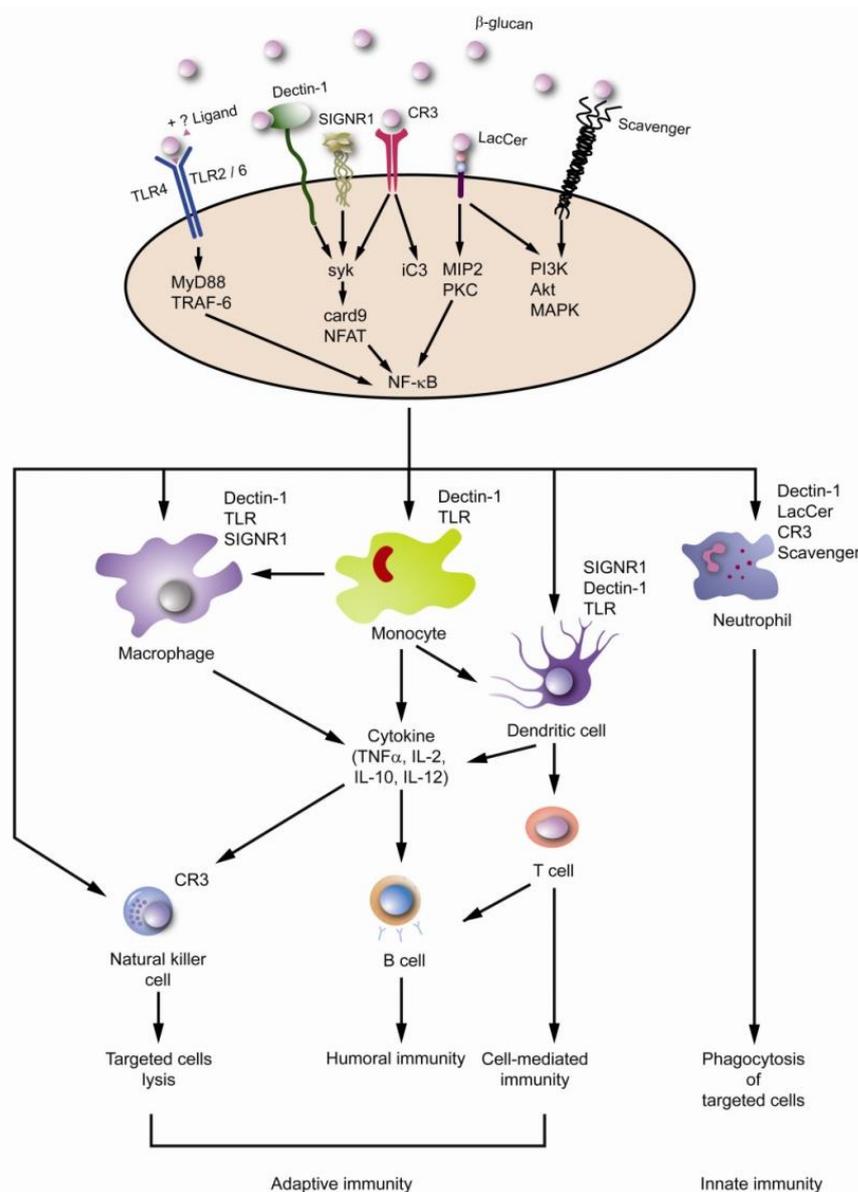


Figure 12. Activation du système immunitaire par les β -glucanes ¹⁶⁰

La réponse innée, présente dès la naissance, est relativement non spécifique et répond à plusieurs antigènes dont certains β -glucane bien connus tels que le zymosane (*S. cerevisiae*), grifolane (*G. frondosa*) et lentinane (*L. edodes*). Ces polysaccharides sont capables d'activer directement les phagocytes pour l'élimination de pathogènes par phagocytose et déclenchent la production de facteurs pro-inflammatoires. Les récepteurs cellulaires, comme le récepteur Dectin-1, reconnaissent des motifs pathogéniques appelées PAMPs comme le LPS bactérien ou les β -glucanes fongiques, et s'expriment à la surface des cellules responsables de l'immunité innée à savoir les macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et monocytes. Une fois activé, Dectin-1 déclenche en collaboration avec des récepteurs de type toll (TLR) une cascade d'activation moléculaire intracellulaire qui n'a pas encore été entièrement établie mais qui conduit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Ce dernier est une plaque tournante intracellulaire responsable de la sécrétion des cytokines inflammatoires comme les interleukines IL-2, IL-10, IL-1 β , IL-12 ainsi que le facteur de nécrose tumorale (TNF- α) aboutissant à la régulation de la réponse immunitaire adaptative. D'autres récepteurs impliqués dans la reconnaissance des β -glucanes ont également été mis en évidence comme le récepteur lactosylcéramide (LacCer) propre aux neutrophiles et aux cellules endothéliales, le récepteur scavenger présent à la surface des phagocytes et enfin celui impliqué dans la voie alterne du complément (CR3) présent à la surface des cellules tueuses ou NK (natural killer), neutrophiles, et lymphocytes. La spécificité des cellules NK est notamment leur capacité à lyser des cellules malades sans nécessité d'une activation préalable n'y d'entrer en contact avec l'agent pathogène. Les macrophages sont également capables de reconnaître d'autres polysaccharides présents dans les parois fongiques comme les mannanes *via* le récepteur mannose et le récepteur TLR 4 ¹⁶⁴.

Le système adaptatif permet d'amplifier la réponse de manière spécifique à un antigène représenté par un agent infectieux ou inconnu du système immunitaire. Il fait intervenir les lymphocytes B producteurs d'anticorps et les lymphocytes T ayant à la fois la faculté de produire des cytokines et possédant une activité cytotoxique. L'efficacité des β -glucanes fongiques varie suivant leur structure et donc l'affinité avec les récepteurs cellulaires considérés ^{162,160}. Grâce à la présence de lymphocytes B à mémoire, la réponse adaptative est caractérisée par une réponse efficace et rapide suite à un contact répétitif avec un même antigène ¹⁶⁵.

En plus de ces activités immunomodulatrices, les β -glucanes fongiques exercent de multiples effets sur les cellules cancéreuses (régression de tumeurs) et peuvent donc être utilisés pour la prévention de cancers mais aussi pour le traitement de plusieurs pathologies comme l'hypercholestérolémie et le diabète. Des activités antivirales, antibactériennes et antifongiques ont également été mises en évidence ¹⁶².

2.2. Modèle aviaire

Bien que le système immunitaire aviaire partage des similitudes avec le modèle mammifère, des différences subsistent concernant les gènes, molécules, cellules et organes impliqués ainsi que certains mécanismes fonctionnels. Par exemple l'équivalent des neutrophiles chez les mammifères est l'hétérophile chez les oiseaux et les nodules lymphatiques sont remplacés par la bourse de Fabricius qui produit les lymphocytes B. L'immunité innée est composée comme les mammifères de barrières physiques (plumes et peau) et chimiques (suc gastrique), et des cellules immunitaires qui sont les monocytes, macrophages, hétérophiles, thrombocytes et cellules NK qui reconnaissent et s'activent *via* les PAMPs. Les hétérophiles du sang détruisent les bactéries et relarguent par dégranulation des protéines spécifiques de type β -défensines qui ont pour rôle de former des pores à la surface des pathogènes et d'attirer par chimiotactisme d'autres cellules immunitaires comme les macrophages. Ces peptides de petits poids moléculaires sont également présents chez les mammifères et exercent une activité antimicrobienne dans un spectre d'activité très large. Les cytokines, très importantes pour la réponse à médiation cellulaire, sont également produites par une grande variété de type cellulaire et permettent ainsi la régulation de la réponse immunitaire comme pour les mammifères ⁹⁵. L'interleukine IL-1 β qui appartient à la superfamille des IL-1 est d'ailleurs une des premières interleukines pro-inflammatoire décrite chez la volaille et qui entraîne une réponse inflammatoire similaire au modèle mammifère ¹⁶⁶.

2.3. Limites actuelles des études concernant les β -glucanes

La plupart des travaux réalisés dans le cadre de recherches portant sur les microorganismes riches en β -glucanes sont basés sur des extraits dont la pureté n'est pas forcément déterminée, aucun standard n'est d'ailleurs disponible avec une structure et un poids moléculaire spécifique. La plupart des chercheurs utilisent généralement des produits plus ou moins purifiés comme le zymosane qui est un mélange de composant de paroi de levure (β -glucanes, mannanes, glycoprotéines et chitosanes). Les méthodes de caractérisations quantitatives et qualitatives sont limitées pour évaluer le potentiel et comparer les molécules purifiées provenant de différentes sources. De plus, les mécanismes immunologiques impliqués notamment les liaisons avec les récepteurs et les voies de signalisation induites par les β -glucanes n'ont pas encore été clairement élucidés.

Des études supplémentaires *in vitro* et *in vivo*, sont nécessaires pour comprendre ces mécanismes et produire des β -glucanes ayant une structure optimale par ingénierie microbienne ou en sélectionnant des conditions de cultures appropriées. Ces données permettront une utilisation future effective et rationnelle de ces polysaccharides chez des patients atteints de cancer par exemple. Plusieurs essais cliniques, d'ores et déjà effectués chez l'homme, montrent des résultats prometteurs mais ces données restent insuffisantes et controversées ¹⁶⁰.

3. Effet pharmacologique des β -glucanes fongiques et microorganismes impliqués

3.1. Production et domaine d'application

Depuis des décennies, les champignons suscitent un grand intérêt en raison de leur valeur médicinale. Les espèces les plus populaires et cultivés de nos jours sont *Ganoderma lucidum* (Reishi), *Lentinus edodes* (Shiitake) et *Grifola frondosa* (Maitake). Les composés issus de ces souches sont bénéfiques pour le traitement et la prévention de certaines maladies chez l'homme en cas d'immunodéficience ou en combinaison avec une thérapie à base d'antibiotique.

La culture des champignons pour l'obtention du carpophore est longue (un voire plusieurs mois) avec des difficultés à contrôler la qualité du produit final. L'alternative à ces contraintes est la culture de mycélium en milieu liquide. Celle-ci permet de récolter du mycélium pur avec les substances bioactives en quelques jours¹⁶. Le procédé est déjà mise en œuvre pour quelques champignons tels qu'*Agaricus brasiliensis*, *Grifola frondosa* et *Phellinus linteus*. Toutefois, le manque de connaissance sur ce mode de culture appliqué à ces organismes pose des problèmes d'ingénieries, biologiques et physiologiques^{167,168}. La production industrielle de β -glucane est plus largement répandue à partir de la levure de boulangerie dont les effets bénéfiques ont été démontrés chez de nombreuses espèces animales¹³.

3.2. Contenu en β -glucane des souches fongiques

La quantification de la teneur en β -glucane fongique reste difficile à standardiser en raison de leur grande diversité. Les méthodes de détection rapide employées ne sont pas parfaites et sont essentiellement basées sur des techniques enzymatiques (kit Megazyme), immuno-enzymatiques (ELISA), de fluorimétries (bleu d'aniline), et colorimétriques (rouge congo)¹⁶⁹.

Le contenu en β -glucane des champignons comestibles et médicinaux est extrêmement variable avec des valeurs allant de 8 à 60 g pour 100 g de produit sec suivant l'espèce considérée et la zone de prélèvement à savoir le carpophore ou le pied¹¹⁶. Ce composé est rarement analysé dans le cas des champignons filamenteux qui contiennent pourtant des quantités non négligeables de β -glucane. Kyanko *et al.*, sont en outre les seuls chercheurs à avoir déterminé le contenu en β -glucane de quelques souches comprenant les genre *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Aspergillus* et *Penicillium* à partir de mycélium provenant de cultures en milieu liquide. Parmi ces souches, *Paecilomyces* et *Penicillium* présentent des niveaux particulièrement élevés avec respectivement 24 et 17 g de β -glucane pour 100 g de produit sec ce qui est supérieur par rapport aux valeurs rapportées pour certains Basidiomycètes¹⁷⁰. Quant à la levure *S. cerevisiae*, la teneur en β -glucane est élevée et se situe aux alentours de 40 g pour 100 g de produit sec¹⁷¹.

3.3. Réponses du système immunitaire

La plupart des travaux mettant en évidence une activité immunomodulatrice ne donnent pas les détails concernant les voies de signalisation impliquées. Les différentes réponses observées à l'aide d'essais effectués *in vivo* et *in vitro* chez les mammifères résultent cependant de ces cascades de signalisation¹⁷².

Les cellules utilisées sont majoritairement les neutrophiles, macrophages, monocytes, cellules NK et les cellules dendritiques qui peuvent être mises en culture *in vitro*. L'avantage des essais *in vivo* chez la souris est de pouvoir étudier la réponse à l'échelle de l'organisme vivant en incluant l'ensemble des types cellulaires et le développement de certains organes cibles comme la rate par exemple. Des stimulations (LPS, substances cancérigènes, organismes pathogènes) ou des modèles particuliers (irradiation, animaux immunodéficients, modèles de cancer) peuvent être appliqués avant la mise en contact avec le produit testé afin de déterminer ses effets sur l'organisme en cas de pathologie ou de déficience du système immunitaire. Les réponses observées sont soit de type cellulaire comme la phagocytose, la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et la réduction de tumeurs soit de type biochimique avec la production et la modification des niveaux de cytokines, chimiokines, dérivés réactifs de l'oxygène, et immunoglobulines^{16,164,173}. Il est également important de prendre en considération le type d'extrait utilisé ainsi que son mode d'administration. Le **tableau 9** résume les travaux les plus pertinents publiés dans la littérature démontrant une activation du système immunitaire.

D'après la littérature, en plus de ces effets immunomodulateurs, les polysaccharides d'origine fongique exercent des actions prébiotiques. Le pleurane de *Pleurotus ostreatus* et le lentinane de *Lentinus edodes*, ont des effets positifs sur l'intestin en augmentant la résistance à l'inflammation et en inhibant la formation des ulcères. Les β -glucanes modifient également la flore intestinale en favorisant le métabolisme et la prolifération de microorganismes bénéfiques comme les bifidobactéries et les bactéries lactiques¹⁷⁴.

Tableau 9. Effets pharmacologiques des polysaccharides d'origine fongique ^{16,162,175,64,173}

Micro-organisme	Type d'extrait fongique	Effet sur le système immunitaire et les cellules cancéreuses
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Extrait brut composé de β -glucane et mannane associés à des protéines (Zyosan)	Macrophage : \uparrow activité cellulaire, IL-2, IL-10, IL-12, TNF- α , IL-6 et IL-1 β Lymphocyte Th : \uparrow activité cellulaire Activation du complément Réduction des tumeurs
	β -glucanes	Macrophage, neutrophile et monocyte : \uparrow activité cellulaire Splénocyte : \uparrow IL-2 Lymphocytes T : \uparrow activité cellulaire, IFN- γ Réduction des tumeurs
<i>Grifola frondosa</i>	Fraction soluble, ratio β -glucane/protéine de 7/3 du carpophore	Macrophage : \uparrow IL-1 β Cellules NK : \uparrow activité cellulaire, TNF- α , IFN- γ Lymphocyte T et Th : \uparrow activité cellulaire Réduction des tumeurs
	β -glucane lié à des protéines, extrait du carpophore	Cellules souches hématopoïétiques : \uparrow activation, prolifération et différenciation en macrophage et granulocyte
	β -glucane extrait du mycélium	Activation du complément
	Grifolane	Macrophage : \uparrow IL-1, IL-6, TNF- α
	Biomasse en poudre	Macrophage : \uparrow activité cellulaire Réduction des tumeurs Différenciation des lymphocytes et activité cytotoxique
<i>Lentinus lepideus</i>	Extrait soluble du mycélium	Cellule souche hématopoïétique : \uparrow différenciation en macrophage et granulocyte, IL-1 β , IL-6 \downarrow TNF- α chez la souris irradiée Macrophage : \uparrow TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-12, IL-18
	Hétéroglycane	Cellule souche hématopoïétique : \uparrow prolifération et différenciation en granulocyte, IL-1 β , IL-6
<i>Lentinus edodes</i>	Lentinane	Macrophage : \uparrow prolifération Lymphocyte T, Th et B : \uparrow activité cellulaire, \uparrow IL-2, IL-1 β Activation du complément Réduction des tumeurs
	β -glucane	Splénocyte : \uparrow prolifération Réduction des tumeurs
	Glucomannane et Mannogalactoglucane	Réduction des tumeurs
	Biomasse en poudre	Macrophage et lymphocyte T : \uparrow activité cellulaire Réduction des tumeurs
<i>Agaricus blazei</i>	Extrait soluble du mycélium et carpophore	Macrophage : \uparrow TNF- α Cellule NK : \uparrow activité cellulaire Lymphocyte T : \uparrow activité cellulaire Réduction des tumeurs
	Extrait éthanolique	Macrophage : \uparrow TNF- α , IL-8, NO
	Particules du carpophore et mycélium	Activation du complément
<i>Ganoderma lucidum</i>	Polysaccharides du carpophore	Macrophage : \uparrow IL-1 β , TNF- α , IL-6 Cellule dendritique : \uparrow prolifération et maturation Lymphocyte B et T : \uparrow prolifération Réduction des tumeurs
	Extrait alcalin du mycélium et triterpénoides	Activation du complément
	Protéoglycane	Lymphocyte B : \uparrow prolifération, activation, différenciation et production des immunoglobulines
<i>Morchella esculenta</i>	Galactomannanes du carpophore	Macrophage : \uparrow activité cellulaire

<i>Phellinus linteus</i>	Polysaccharides	Macrophage : ↑ NO, ↓ IL-2, IFN- γ , TNF- α , ↑ apoptose des macrophages et lymphocytes chez des souris traitées au LPS Cellule dendritique : ↑ maturation et induit la prolifération de lymphocyte T Lymphocyte B : ↑ activation
	Extrait soluble et éthanologique du carpophore	Lymphocytes T : ↑ prolifération, IFN- γ
<i>Cordyceps pruinosa</i>	Extrait méthanolique du carpophore	Macrophage : ↓ IL-1 β , TNF- α , NO
<i>Sparassis crispa</i>	β -glucanes	Cellule souche hématopoïétique : ↑ granulocytes, monocytes, et cellules NK chez des souris leucopénique (déficitaires en globules blancs)
<i>Trametes versicolor</i>	Polysaccharides liés à des protéines du mycélium	Cellule NK : ↑ activité cellulaire Cellule dendritique : ↑ maturation Réduction des tumeurs
	β -glucane	Prolifération et différenciation des lymphocytes, ↑ immunoglobulines Réduction des tumeurs
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Biomasse en poudre	Macrophage : ↑ activité cellulaire Prolifération et différenciation des lymphocytes Réduction des tumeurs
	Glucogalactane	Lymphocytes : prolifération
<i>Flammulina velutipes</i>	Mannofucogalactane et protéine du mycélium	Lymphocyte Th1 : ↑ activité et différenciation

↑ : Augmentation par rapport au contrôle ; ↓ : Diminution par rapport au contrôle

3.4. Etudes menées chez la volaille

Le rôle des β -glucanes en tant qu'immunomodulateur chez les mammifères a été largement démontré et publié. Cependant, grâce à la volonté de trouver des alternatives à l'utilisation d'antibiotique chez la volaille, les recherches concernant le modèle aviaire se sont récemment intensifiées. Comme pour les mammifères, l'exposition aux β -glucanes a mis en évidence une augmentation de l'activité et de la prolifération des macrophages et des hétérophiles aviaires. Les animaux auxquels ces polysaccharides ont été apportés en tant qu'additif alimentaire ont des réponses humorales et cellulaires améliorées avec une augmentation significative de l'activité phagocytaire des macrophages, une production d'interleukine et d'anticorps et un développement plus important des organes lymphoïdes comme la Bourse de Fabricius, le thymus et la rate⁹⁵. Les essais avec l'utilisation de microorganismes pathogènes ont également démontré une efficacité concernant la prévention de la colonisation de ces microorganismes comme *Salmonella enteritidis* chez les adultes¹⁷⁶ et particulièrement chez les jeunes oiseaux qui sont les plus vulnérables¹⁷⁷. Des résultats prometteurs ont également été obtenus concernant des infections par *Escherichia coli*¹⁵⁹ et la colonisation du tube digestif par des parasites du genre *Eimeria* responsable de la coccidiose¹⁷⁸.

En plus d'améliorer les fonctions immunitaires, les β -glucanes améliorent aussi les performances de croissance, l'efficacité a d'ailleurs été comparable à celle obtenue avec l'addition de virginiamycine chez le poulet¹⁷⁹. Une étude portant sur un apport de β -glucane dérivé de la levure *S. cerevisiae* a démontré une résistance accrue des poulets en maintenant des niveaux élevés en cytokines

(IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF- α) et immunoglobulines (IgG et IgA) ¹⁸⁰. La dose permettant de démontrer l'efficacité des polysaccharides varie selon les études, la pureté du produit et le stade de développement des animaux, elle est de l'ordre de 0.002% ¹⁷⁹ à 0.02% ^{181,182} chez le poulet de chair d'après les données disponibles dans la littérature. Ces études sont difficilement comparables et l'efficacité du traitement suivant la dose administrée est extrêmement variable car la teneur en principe actif dans l'aliment est souvent inconnue, voire la composition même de l'additif n'est pas communiquée. Les fréquences d'administration et la diversité des schémas expérimentaux ou des paramètres mesurés expliquent également les discordances observés concernant les effets bénéfiques constatés chez les animaux ⁶².

4. Production de polysaccharides fongiques par fermentation en milieu solide

Très peu d'études ont été publiées à ce jour sur la production de polysaccharides fongiques en utilisant le procédé de fermentation en milieu solide. Certaines espèces de champignons supérieurs comme *F. velutipes* ¹⁸³, *H. erinaceum* ¹⁸⁴, *G. lucidum* ^{185,186}, *Trametes robiniophila* ¹⁸⁷ et *G. frondosa* ¹⁸⁸ ont été cultivées avec succès sur divers agrorésidus pour la production de biomasse riche en polysaccharides fongiques. Les effets bénéfiques des extraits ont d'ailleurs été démontrés sur des macrophages, PBMC et chez des souris atteintes de tumeurs. Concernant les champignons filamenteux, les données disponibles dans la littérature sont quasi inexistantes et sont essentiellement limitées à la production d'exopolysaccharides en milieu liquide comme pour le scleroglucane d'espèces du genre *Sclerotium* et le pullulane d'*Aureobasidium pullulans* ¹⁸⁹. Quelques auteurs ont utilisé la FMS pour la production de chitosane dans des conditions optimisées par des souches du genre *Absidia*, *Gongronella*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sur patate douce, résidus de soja et paille de riz. Des études comparatives montrent que le rendement de production est particulièrement intéressant par rapport à un procédé de fermentation liquide ^{190,191}. Le faible coût des matières premières encourage également le développement des procédés FMS comme pour la production de pullulane sur divers sous-produits provenant d'agro-industries ¹⁹². Quelques chercheurs ont aussi mis en évidence des effets sur le système immunitaire avec des extraits provenant de cultures FMS d'*Aspergillus*, de *Monascus* et de *Morchella esculenta* mais les composés impliqués dans ces réponses n'ont pas été clairement identifiés ^{193,194}.

La potentialité du procédé reste donc inexploitée concernant la production de molécules bioactives ou l'élaboration d'aliments fermentés fonctionnels capable d'améliorer la santé humaine ou animale. Les bénéfices sur la santé humaine d'un certain nombre d'aliments fermentés ont d'ores et déjà été mis en évidence mais des études supplémentaires restent nécessaires pour valider leur mérite notamment par des modèles animaux et des essais cliniques ¹⁹⁵.

CHAPITRE II

CROISSANCE DES MICROORGANISMES SUR TOURTEAU DE COLZA ET ENRICHISSEMENT EN PROTÉINES

1. Introduction

L'étude bibliographique du chapitre précédent permet d'élaborer un tableau répertoriant l'ensemble des microorganismes potentiellement intéressants dans le cadre de cette étude pour une application en alimentation animale (**Tableau 10**). Un code numérique est attribué à chaque microorganisme afin de faciliter la lecture des données.

Tableau 10. Liste des souches utilisées dans le cadre du projet

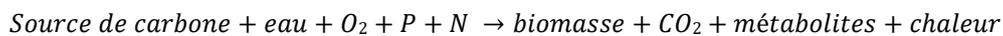
Type de microorganisme	Souche	Code	Collection ou provenance
Champignons inférieurs	<i>Aspergillus niger</i>	1	PPB*
		2	Agrene*
		3	Agrene
	<i>Aspergillus sp.</i>	4	Agrene
		5	Agrene
		6	Agrene
		7	Agrene
	<i>Aspergillus oryzae</i>	8	UMIP 1042.72
	<i>Aspergillus sojae</i>	9	CBS 100934
	<i>Rhizopus oryzae</i>	10	CBS 131512
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	11	CBS 338.62
	<i>Rhizopus sp.</i>	42	PPB
	<i>Penicillium brasilianum</i>	12	Agrene
	<i>Penicillium sp.</i>	13	Agrene
	<i>Geotrichum candidum</i>	14	PPB
		15	Agrene
	<i>Monascus pupureus</i>	16	CBS 280.34
	<i>Monascus ruber</i>	17	PPB
	<i>Rhizomucor miehei</i>	18	CBS 182.67
<i>Trichoderma harzianum</i>	28	IMI 325045	
<i>Trichoderma atroviride</i>	29	PPB	
Champignons supérieurs	<i>Morchella hortensis</i>	19	CBS 273.49
	<i>Morchella esculenta</i>	20	CBS 369.68
	<i>Morchella sp.</i>	40	PPB
	<i>Trametes versicolor</i>	21	CBS 73785
		41	ATCC 12679
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	22	CBS 34269
	<i>Grifola frondosa</i>	23	CBS 31729
	<i>Ganoderma lucidum</i>	24	CBS 27081
	<i>Lentinus edodes</i>	25	CBS 83387
	<i>Phellinus linteus</i>	26	CBS 45476
<i>Agaricus bisporus</i>	27	PPB	
Bactéries filamenteuses	<i>Streptomyces sp.</i>	30	CBS 411.63
		33	Agrene
		34	Agrene
		35	Agrene
		36	Agrene
		37	Agrene
		38	Agrene
	39	Agrene	

*Souches isolées principalement du sol par les laboratoires PPB (Dijon) et Agrene (Bretenière)

Les quarante souches ont été sélectionnées d'après la littérature en tenant compte de leur aptitude à se développer par fermentation en milieu solide sur un substrat de type résidu agricole et de leur utilisation en alimentation humaine ou animale pour l'élaboration de divers produits fermentés et/ou d'additifs alimentaires. La capacité à produire des molécules bioactives d'intérêt

(immunomodulateurs, peptides bioactifs, etc.) constitue également un critère de sélection majeur. Les travaux de recherche menés avec le groupe Avril étant orientés vers l'innovation en matière de nutrition animale, certains microorganismes ont été volontairement exclus de cette liste. C'est le cas des levures, comme *S. cerevisiae* et certaines bactéries, comme les lactiques et les *Bacillus*, classiquement utilisées en alimentation animale notamment en tant qu'apport nutritionnel et probiotique. En effet, les bienfaits sur la santé animale de ces derniers sont aujourd'hui bien connus avec une large gamme de produits commercialisés disponibles sur le marché à base de microorganismes vivants ou déshydratés et divers additifs dont la majorité sont composés d'extraits de parois cellulaires de levure (β -glucanes et mannanes).

La biomasse est un paramètre fondamental pour caractériser la croissance microbienne. En fermentation en milieu solide (FMS) l'estimation de la biomasse est essentielle pour les études en cinétique. Cependant celle-ci pose problème en raison de l'impossibilité de séparer les microorganismes de la matrice solide particulièrement dans le cas de microorganismes fongiques car le mycélium est solidement ancré aux particules solides. Un certain nombre de mesures indirectes peuvent toutefois être employées pour estimer la croissance microbienne comme discuté dans le chapitre I, partie III - 2.3. D'après Raimbault, l'équation stœchiométrique globale suivante peut être considérée pour décrire la croissance microbienne en FMS ¹⁹⁶ :



La variation de chaque composant étant strictement liée aux autres lorsque tous les coefficients sont maintenus constants. Parmi ces approches indirectes, la détermination de la respiration *via* la production de CO₂ ainsi que la perte de masse sèche sont couramment utilisées en FMS ^{132,131}. Lorsque les sources de carbone du milieu solide sont métabolisées par les microorganismes elles sont transformées en biomasse et CO₂ entraînant une perte de masse sèche du substrat solide. La quantité de poids sec perdue est donc corrélée à l'évolution du métabolisme respiratoire. Ce qui signifie donc que la quantité de biomasse produite par unité de gaz métabolisé est constante ¹⁹⁶. D'après la littérature, la production de CO₂ et la perte de masse sèche représentent des indicateurs satisfaisants de l'évolution de la biomasse fongique en FMS. Par rapport aux techniques de quantification de composants cellulaires spécifiques qui sont souvent sujets aux interférences liées à des composants présents dans les substrats solides complexes, ces deux paramètres sont relativement simples et rapides à mesurer ¹³⁰. Aussi, la mesure de l'évolution de la production de CO₂ est avantageuse car elle détermine uniquement la biomasse physiologiquement active ¹⁹⁶.

Les modèles mathématiques sont des outils importants pour représenter et décrire la cinétique de croissance des microorganismes particulièrement pour les études d'optimisation et de changement d'échelle. Les équations associées aux modèles, dont la plus couramment utilisée en FMS est la

fonction logistique, permettent de décrire le profil de croissance expérimental des microorganismes et d'estimer les paramètres de cinétique liés au modèle. Ces derniers sont évidemment dépendants de la composition du milieu de culture, des conditions environnementales (température, humidité et pH) ainsi que de l'état physiologique du microorganisme^{197,198}. La corrélation entre l'évolution du pourcentage de CO₂ et la perte de masse sèche a été mise en évidence par Smits *et al.* et Larroche *et al.*, avec des souches du genre *Trichoderma* et *Aspergillus* cultivées respectivement en boîte de Pétri et dans un réacteur à lit fixe à aération forcée^{199,200}. Les relations entre les mesures de la biomasse fongique (glucosamine), les activités biologiques (CO₂, O₂, perte de masse, ATP, température) et les produits de la fermentation (enzymes, métabolites secondaires) restent difficiles à établir souvent en raison d'un manque de précision et de difficultés expérimentales pour la détermination des différentes variables. C'est pourquoi certains modèles mathématiques ne prédisent pas toujours les résultats attendus, les modèles empiriques simples concernant la cinétique de croissance ont d'ailleurs peu évolué ces dernières années^{201,197}.

L'enrichissement en protéines du tourteau de colza est un défi majeur pour son application en alimentation animale. L'amélioration de sa qualité nutritionnelle permettra en outre de le rendre plus compétitif vis-à-vis d'autres sous-produits plus riches en protéines comme le soja. D'après la littérature, la teneur en protéines d'un produit fermenté évolue en fonction de la perte de masse sèche. Une concentration en protéines du tourteau de colza a ainsi été systématiquement observée en fin de fermentation par rapport au produit non fermenté^{5,146}. La faculté des microorganismes à se développer sur substrat lignocellulosique sous-entend un profil enzymatique adapté à la dégradation de ce type de substrat, la croissance du microorganisme étant dépendante de sa capacité à extraire et à utiliser les nutriments présents dans son environnement. L'altération du tourteau de colza par la production d'enzymes met en évidence un critère supplémentaire, celui de la solubilisation des protéines. En effet, la digestibilité plus faible du tourteau de colza par rapport au tourteau de soja est sans doute liée à une solubilité réduite des protéines due à un confinement de celles-ci dans la matrice lignocellulosique. Les quantités de protéines plus élevées et des fibres plus réduites pour le tourteau de soja par rapport au colza contribuent considérablement à la différence observée pour l'énergie métabolisable chez la volaille (cf. Chapitre I, partie I - 3.1). Les fibres ont pour effet d'accélérer la digestion et par conséquent de réduire l'absorption des nutriments passant dans le tractus digestif de l'animal. L'utilisation d'additifs alimentaires à base d'enzymes dégradant les polysaccharides non amylacés améliore la qualité du tourteau en atténuant l'effet de réclusion des nutriments par les composants des parois cellulaires végétales⁴. Les composés nutritionnels du tourteau de colza auraient donc davantage d'interactions plus ou moins fortes avec d'autres molécules les rendant très peu solubles. Ceci entraîne, chez l'animal consommant le tourteau de colza, une plus faible biodisponibilité des protéines lors de leur passage dans le tractus digestif. L'activité des enzymes microbiennes permettrait de réduire le contenu en fibre et de libérer davantage de protéines et par conséquent d'augmenter la digestibilité du tourteau de colza suite à sa fermentation en milieu solide. La digestibilité plus faible

des protéines et des acides aminés est aussi en partie liée au procédé de trituration des graines de colza provoquant la réaction de Maillard à haute température ⁴. Il s'agit d'une réaction chimique entre les acides aminés et les carbohydrates qui a pour conséquences la modification des protéines et la formation de composés inhibant l'activité des enzymes digestives ²⁰². La fraction azotée hautement indigestible représente environ 10% des protéines totales du tourteau de colza ⁴.

L'objectif majeur de ce premier chapitre est la mise en place d'un criblage, avec des cultures sur tourteau de colza effectuées en fiole Erlenmeyer, à partir des quarante souches choisies d'après l'étude bibliographique. La sélection des souches sera effectuée en prenant en compte dans un premier temps les performances en matière de croissance puis d'enrichissement en protéines totales et solubles (ou digestibles) du tourteau de colza fermenté dans des conditions non optimisées.

Les paramètres physicochimiques du tourteau de colza sont préalablement déterminés afin de le caractériser en tant que substrat pour le procédé de fermentation en milieu solide. Il est notamment confronté au son de blé qui représente un substrat de référence couramment utilisé en FMS. La croissance microbienne est ensuite appréciée à partir de l'évolution de la respiration (production de CO₂) et de la perte de masse sèche obtenus avec un *Aspergillus niger* utilisé comme organisme modèle dans cette étude. La modélisation de la cinétique de croissance est appliquée sur les données expérimentales comme outil permettant de décrire la croissance des microorganismes au cours du temps. Les modèles offrent également une aide à la décision pour la discrimination des souches entre elles grâce à la détermination des paramètres de cinétiques, à savoir le taux de croissance spécifique et la biomasse maximale produite. L'influence de la stérilisation et de la composition des lots de tourteau est également étudiée en utilisant la souche *Aspergillus niger* cultivée dans des conditions strictement identiques. Une fois les souches sélectionnées sur le premier critère, à savoir la respiration, les microorganismes restants sont différenciés suivant l'enrichissement en protéines totales et solubles obtenu au cours de la fermentation.

2. Matériels et méthodes

2.1. Microorganismes

2.1.1. Entretien des microorganismes

Parmi les quarante souches de microorganismes utilisées dans cette étude, la majorité a été isolée du sol, sauf la souche *Monascus ruber* qui a été isolée d'un produit fermenté (riz rouge), ces isollements ont été effectués par la PPB et la société Agrene. Les autres souches proviennent de collections de microorganismes (**Tableau 10**). Toutes les souches sont mises en culture à 25°C dans des tubes de gélose inclinée pendant 5 à 14 jours selon l'espèce puis maintenues en banque de travail à

4°C, elles sont repiquées chaque mois. Avant chaque repiquage un état frais au microscope est réalisé avec éventuellement un étalement par épaissement sur boîte de Pétri contenant du milieu PCA (Plate Count Agar) pour garantir la pureté des souches. Les milieux de culture favorables à chaque souche sont répertoriés dans le **tableau 11** tandis que leur composition est détaillée en **annexe 1**. Uniquement les souches ayant la capacité à sporuler sont conservées sous forme de suspensions de spores en cryotubes à -80°C. La production de spores est réalisée en fiole de Roux contenant chacune 160 mL de milieu gélosé. Après une à trois semaines d'incubation à 25°C, les spores sont récoltées en présence d'une solution aqueuse de glycérol à 20% par grattage de la surface de la gélose à l'aide d'un grattoir à cellule. Après homogénéisation, un comptage des spores est effectué au microscope en triplicata à la cellule de Malassez. Un indice de sporulation a été attribué à chacune des souches suivant la quantité de spores récupérée. Les champignons supérieurs ainsi que les *Streptomyces* ne produisent pas de spores et doivent être entretenus régulièrement.

Tableau 11 : Milieux de culture utilisés et indice de sporulation des microorganismes

Type de microorganisme	Souches	Code	Milieu gélosé	Sporulation
Champignons inférieurs	<i>Aspergillus et Rhizopus</i>	1 à 10 et 42	PDA	++
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	11	PDA	+
	<i>Penicillium et Geotrichum</i>	12 à 15	PDA	++
	<i>Monascus</i>	16 et 17	PDA	+
	<i>Rhizomucor miehei</i>	18	PDA	++
	<i>Trichoderma harzianum</i>	28	PDA	+
	<i>Trichoderma atroviride</i>	29	PDA	++
Champignons supérieurs	<i>Morchella</i>	19, 20 et 40	MEA	-
	Autres supérieurs	21 à 27 et 41	PDYA	-
Bactéries filamenteuses	<i>Streptomyces</i>	30 et 33 à 39	YMA	-

++ : suspension $\geq 5.10^7$ spores.mL⁻¹ ; + : suspension $< 5.10^7$ spores.mL⁻¹ ; - : pas de spores visibles

2.1.2. Production d'inoculum pour les essais en milieu solide

Les précultures sont réalisées en fiole de Roux sur milieu gélosé pour toutes les souches sauf les *Streptomyces* en raison de la quantité insuffisante de biomasse produite dans ces conditions. Ces dernières sont cultivées dans 200 mL de milieu liquide YM dans des fioles bafflées sous agitation à 120 rpm dans un incubateur (CH-4103, Infors HT). Toutes les précultures sont incubées pendant 1 à 2 semaines à 25°C ou 30°C selon la souche considérée pour obtenir un maximum de biomasse et de spores. La récupération du mycélium et des spores des microorganismes fongiques cultivés en fiole de Roux est réalisée par grattage de la surface de la gélose en présence d'une solution de Tween 80 à 0.1%. Pour les bactéries cultivées en milieux liquide la biomasse est simplement récupérée par pipetage.

2.2. Substrats solides

2.2.1. Origine des matières premières et mesures physicochimiques

Le son de blé provient du groupe Dijon céréales, le tourteau de soja de Gamm vert, tandis que les trois lots de tourteaux de colza utilisés pour les essais FMS ont été fournis par la société Saipol (Rouen). La caractérisation des milieux solides (tourteau de colza et son de blé) a été effectuée selon les protocoles suivants :

- La densité volumique brute et humide : Ce paramètre détermine la masse en gramme qu'occupe le substrat brut et humide dans un litre. Il peut éventuellement mettre en évidence le phénomène de compaction lorsque le produit est humide. La densité volumique est mesurée par pesée d'un volume donné de substrat dans une éprouvette graduée.
- Le pourcentage de matière sèche et la capacité maximale de rétention en eau : Le pourcentage de matière sèche du produit est déterminé selon la méthode AOAC ²⁰³. Le substrat solide est déposé dans des coupelles en aluminium pour un séchage à l'étuve 24h à 105°C, trois répétitions sont réalisées par échantillon. La coupelle est pesée avant et après séchage. Pour la capacité maximale de rétention en eau, le substrat est d'abord totalement immergé dans de l'eau pendant une heure à température ambiante puis déposé sur un tamis pour retirer l'eau en excès avant d'appliquer la dessiccation à 105°C.
- Le pH spontané humide : Le pH est déterminé à l'aide d'un pH mètre de laboratoire (H2210, HANNA Instruments) après broyage à 9500 rpm du substrat solide dans de l'eau osmosée à l'aide d'un Ultra-turrax (T25, IKA).

Toutes les mesures ont été effectuées en triplicata et les résultats sont exprimés en pourcentage moyen \pm écart-type.

2.2.2. Composition des lots de tourteau de colza

Les lots de tourteau de colza ont été analysés par Euronutrition afin d'évaluer leur qualité nutritionnelle dans le cadre de l'alimentation animale. La teneur en humidité a été déterminée avec une dessiccation à l'étuve à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à l'équilibre selon la norme ISO 771 tandis que les matières grasses totales sont évaluées par la méthode d'extraction des huiles résiduelles à l'hexane ou à l'éther de pétrole selon la norme ISO 22630. La cellulose brute est déterminée suivant la méthode de Weende (norme AFNOR NF V03-040) faisant intervenir d'abord une hydrolyse acide et alcaline puis une séparation du résidu par filtration, rinçage et calcination à 500°C. Les protéines totales sont dosées

selon la méthode Kjeldahl ISO 5983-2 utilisant la digestion en bloc, le cuivre comme catalyseur et une distillation à la vapeur dans de l'acide borique. La matière azotée soluble (MAS) relative à la quantité de protéine soluble ($N \times 6.25$) est quant à elle évaluée suivant la méthode Bipea en appliquant la méthode de Kjeldahl suite à une digestion dans de la salive artificielle²⁰⁴. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen par rapport à la masse sèche.

2.3. Conditions de culture

Les cultures sont réalisées en fiole Erlenmeyer à col large de 500 mL munies de bouchons en coton et contenant chacune 45 g brut de tourteau de colza. Celui-ci est d'abord pré humidifié puis stérilisé 20 minutes à 121°C à l'autoclave afin de garantir l'élimination des contaminants. Après refroidissement le tourteau est ajusté à 40% de matière sèche avec de l'eau osmosée contenant les spores pour obtenir un taux de 1.10^7 spores.g⁻¹ sec ou avec 5 mL d'une suspension concentrée en biomasse (mycélium ou bactéries) dans le cas où la souche ne produit pas de spores. Ces inoculums sont obtenus suivant le mode opératoire décrit dans la partie 2.1.2. La hauteur de couche humide est de 3 cm ce qui permet d'avoir un espace de tête conséquent d'environ 425 mL pour favoriser les échanges de gaz. Plusieurs fioles par souche sont préparées afin d'effectuer les différentes mesures en cinétique lors de la croissance des microorganismes. La température d'incubation est la même quelle que soit la souche, c'est-à-dire 25°C. Il s'agit d'une température moyenne à laquelle la plupart des microorganismes sont capables de se développer.

2.4. Mesures des paramètres liés à la croissance

2.4.1. Production de CO₂

Des mesures régulières du pourcentage de CO₂ sont effectuées avec un analyseur de gaz O₂/CO₂ (canal 120, Vigaz) muni d'un capteur infrarouge. Ces mesures sont effectuées sur trois fioles différentes afin de s'assurer de la représentativité de la valeur obtenue. Le gaz à l'intérieur de chaque fiole est prélevé à l'aide d'une aiguille traversant le bouchon en coton. Le bouchon en coton assure une faible aération passive permettant de rester en condition aérobie, le CO₂ ne s'accumule pas constamment à l'intérieur de la fiole.

2.4.2. Perte de masse sèche

La perte de masse sèche représente la perte de masse du substrat essentiellement sous forme de CO₂ et d'autres composés organiques volatils comme les arômes et les acides gras à courte chaîne par exemple. Exprimé en pourcentage, la perte de masse sèche représente la différence entre le poids sec

mesuré au temps initial et à un certain temps au cours de la culture. La mesure de ce paramètre nécessite le prélèvement et l'homogénéisation de l'entièreté de la culture d'une fiole Erlenmeyer par temps de cinétique. La dessiccation est réalisée selon la méthode AOAC ²⁰³ à l'étuve pendant 24h à 105°C.

$$\text{Perte de masse sèche (\%)} = \frac{MS_i - MS_t}{MS_i} \times 100$$

Avec MS_i : Masse sèche au temps initial t_0 et MS_t : Masse sèche à un instant $t+1$

2.4.3. Protéines totales et solubles

Les protéines totales ont uniquement été dosées pour obtenir la valeur initiale des différents lots de tourteau ainsi que dans le cadre de l'essai préliminaire de ce chapitre sur substrat fermenté afin de valider le calcul théorique du contenu en protéine qui prend en compte la perte de masse sèche au cours du temps. Le dosage des protéines brutes ($N \times 6.25$) est réalisé suivant la méthode de Kjeldahl décrite dans le paragraphe 2.2.2. Le calcul théorique de la teneur en protéine totale du produit fermenté prend en compte le contenu initial en protéines du tourteau de colza (déterminé par la méthode Kjeldahl) et la perte de masse sèche finale obtenue en fin de fermentation :

$$\text{Contenu théorique en protéine (\%)} = \frac{Prot_i}{100 - PMS_t} \times 100$$

Avec $Prot_i$: Contenu initial en protéines (%) et PMS_t : Perte de masse sèche à un instant $t+1$ (%)

La quantité de protéines solubles donne une indication sur l'évolution de la qualité nutritionnelle du tourteau de colza après fermentation en matière de digestibilité des protéines. L'extraction des protéines solubles est effectuée dans l'hydroxyde de potassium selon la norme ISO 14244 modifiée. L'échantillon est d'abord broyé à l'Ultra-turrax à 9500 rpm pendant 30 secondes puis placé sous agitation à 500 rpm dans une solution de KOH à 0.036 mol.L^{-1} (0.2%) pendant 20 minutes à température ambiante. Après centrifugation pendant 10 minutes à 1250 g le surnageant est prélevé et filtré sur fibre de verre $1.2 \mu\text{m}$ (GF/C, Whatman). Le filtrat est ensuite utilisé pour la détermination des protéines avec la méthode de Bradford comme indiqué dans le protocole standard de Sigma (B6915). La BSA (Bovine Serum Albumin) est la protéine soluble de référence employée pour la gamme lors du dosage de Bradford. La méthode de Bradford est en accord avec la technique conventionnelle Kjeldahl pour la détermination de la quantité de protéine soluble dans un extrait de tourteau de colza ²⁰⁵. Cette méthode permet d'obtenir rapidement les résultats et permet de traiter une grande quantité d'échantillons. Chaque échantillon est dosé en triplicata. La matière azotée soluble (MAS) utilisant la salive artificielle a également été dosée pour certains échantillons.

2.5. Traitement des données et modélisation

Les différentes analyses statistiques des résultats ainsi que la modélisation des données (régressions linéaires et non linéaires) ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT Base version 2017 (Addinsoft). La méthode de classification ascendante hiérarchique (CAH) est utilisée pour former des classes dans lesquelles les données peuvent être regroupées. Le test de Student est appliqué pour comparer deux échantillons. Un test de Fisher est réalisé pour valider la corrélation linéaire entre deux échantillons. Les différences ont été considérées comme significatives pour un risque $\alpha \leq 5\%$.

2.5.1. Etablissement du profil de croissance dans le système fiole Erlenmeyer

Dans la littérature, l'accumulation du pourcentage de CO_2 est obtenue suite à des enregistrements en ligne à partir de chambres de mesure closes contenant des cultures sur boîte de Pétri^{201,198,199} ou des systèmes utilisant des bioréacteurs à colonnes mis sous aération forcée^{206,207}. L'utilisation de la fiole Erlenmeyer dans le cadre de cette étude est une autre approche qui ne peut en aucun cas donner la valeur exacte de la quantité de CO_2 produite par le microorganisme en raison d'une diffusion d'air constante et donc de CO_2 à travers le bouchon qui ne peut pas être comptabilisée. En effet, par rapport aux appareils utilisés par les différents auteurs, la fiole ne représente pas un système clos ni un réacteur sous aération forcée munis d'un système d'analyse et d'enregistrement en ligne. La présence du bouchon minimise la perte d'eau par évaporation et empêche la contamination de la culture mais la composition de l'air dans l'espace de tête varie au cours de la fermentation¹¹⁸. L'aération passive en fiole Erlenmeyer peut toutefois être considérée comme faible par rapport à la respiration des microorganismes étant donné qu'il est possible de visualiser les différentes phases de croissance selon les variations du pourcentage de CO_2 au cours du temps. Les mesures sont limitées à deux par jour afin que les proportions de gaz ne soit pas trop déséquilibrées dans l'espace de tête. L'appareil ne prélève que des petites quantités de l'ordre de 10 à 15 mL par mesure. Des prélèvements trop fréquents entraînent un biais car le CO_2 n'a pas le temps de s'accumuler entre les mesures. Le taux de production de CO_2 (TPC) ainsi que la quantité de CO_2 émise sont déterminés à partir des équations suivantes établies par Smits *et al.* utilisant une chambre de mesure close^{199,201} :

$$TPC(\text{mmol. h}^{-1}. \text{g}^{-1}) = \frac{\Delta\%CO_2}{\Delta t} \times \frac{1}{100} \times \frac{V \cdot p}{R \cdot T} \times 1000 \times \frac{1}{MS}$$

Avec t : temps (h) ; V : volume occupé par les gaz dans l'espace de tête d'une fiole Erlenmeyer (425 mL soit $4.25 \times 10^{-4} \text{ m}^3$) ; p : pression atmosphérique enregistré à la station météo Dijon-Longvic (Pa) ; R : constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$) ; T : température (25°C soit 298 K) ; MS : masse sèche du substrat (g)

$$CO_2 (\text{mmol. g}^{-1}) = TPC \times \Delta t$$

Il est important de noter que ces relations ne prennent pas en compte les échanges de gaz, c'est à dire la perte constante de CO_2 liée à la présence du bouchon en coton dans le système fiole Erlenmeyer.

Par conséquent, la production de CO₂ est dans ce cas inéluctablement sous-estimée. Le profil du CO₂ accumulé au cours du temps peut toutefois être établi suite à ces estimations. Ce dernier est indispensable pour appliquer les modèles et réaliser la corrélation avec la perte de masse sèche.

2.5.2. Application des modèles

La croissance microbienne est couramment caractérisée par des modèles mathématiques simples. Ces modèles dits primaires décrivent la croissance d'un microorganisme bien défini dans un contexte environnemental donné. Dans ces modèles, l'évolution de la quantité de biomasse microbienne peut être décrite par un ensemble de paramètres, à savoir la biomasse initiale (X₀), la phase de latence (λ), la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) et la biomasse maximale (X_m). Si les conditions sont favorables à la croissance, l'évolution de la biomasse microbienne suit toujours le même profil (**Figure 10**)²⁰⁸.

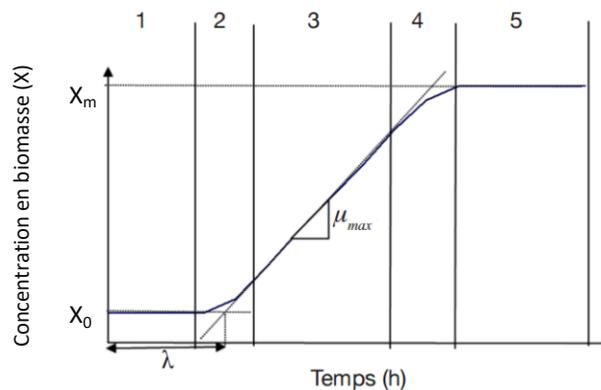


Figure 10. Courbe de croissance d'un microorganisme avec ses différentes phases²⁰⁸. 1 : phase de latence (μ = 0 et X = X₀) ; 2 : phase d'accélération (0 < μ < μ_{max}) ; 3 : phase exponentielle (μ = μ_{max}) ; 4 : phase de décélération (μ_{max} > μ > 0) ; 5 : phase stationnaire (μ = 0 et X = X_m).

Les fonctions appliquées dans les systèmes FMS utilisant des mesures de respiration et de perte de masse sont essentiellement de types exponentiels et logistiques. Les formes différenciées et intégrées de ces équations sont les suivantes^{197,209} :

Exponentielle : $\frac{dX}{dt} = \mu X$ $X = X_0 e^{\mu t}$ ou $\ln X = \ln X_0 + \mu t$

Logistique : $\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)$ $X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1 \right) e^{-\mu t}}$

Avec X : biomasse microbienne ; t : temps ; X₀ : biomasse initiale ; X_m : biomasse maximale ; μ : taux ou vitesse spécifique de croissance

Plusieurs auteurs ont utilisé ces deux équations pour la détermination du taux spécifique de croissance à partir du CO₂ accumulé dans le système FMS considéré^{198,199,206,207,210}. Concernant la perte de masse, uniquement le modèle logistique a été appliqué^{130,211}. Ces équations ne tiennent pas compte de l'effet de la concentration en nutriments. D'autres équations secondaires plus complexes sont utilisées pour décrire l'influence des facteurs environnementaux (température, humidité, etc.) sur les paramètres des modèles primaires. Des modèles tertiaires utilisent également des systèmes experts afin d'établir des relations entre les modèles primaires et secondaires²⁰⁸.

Bien que les différentes phases de croissance puissent être graphiquement représentées par la courbe du logarithme naturel ou népérien, les paramètres de croissance sont propres à chaque phase dans le cas du modèle exponentiel. La courbe de croissance doit donc être séparée en plusieurs phases avec une équation différente pour chacune d'elle. Pendant la phase exponentielle de croissance, la vitesse spécifique de croissance (μ) est maximale et constante, il s'agit de la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{\max}) déterminée par une régression linéaire. Ce modèle très simple décrit dans ce cas la phase exponentielle, mais ne tient pas compte des autres stades de développement comme la phase de latence et la phase stationnaire. Contrairement au modèle exponentiel, le modèle logistique donne une approximation globale de la croissance microbienne incluant toutes les phases de la croissance. Il suppose qu'il n'y a pas de possibilité de croissance lors de la phase de latence et qu'au-dessus d'un certain point, la population microbienne ne peut continuer à se multiplier, faute de ressources. Il représente ainsi les limites (spatiale et nutritive) de la croissance. Le μ_{\max} ainsi que la biomasse maximale associée (X_m) sont obtenus à partir de l'entièreté du profil de croissance élaboré par les données expérimentales. C'est pourquoi cette approche est souvent privilégiée par rapport aux autres modèles proposés dans la littérature^{197,209}.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation du tourteau de colza comme substrat pour le procédé FMS

3.1.1. Propriétés physicochimiques

Les propriétés du substrat solide affectent considérablement le procédé de fermentation en milieu solide et peuvent compromettre le changement d'échelle. En plus de la composition chimique, la taille des particules, la porosité, la résistance mécanique ainsi que la capacité de rétention en eau de la matrice solide influencent le choix de la technologie ainsi que la conduite du procédé en bioréacteur. A l'échelle du microorganisme ces propriétés agissent sur la surface disponible à la colonisation ainsi que sur les transferts d'oxygène, de chaleur, de nutriments et d'eau qui sont indispensables à leur

développement^{118,129}. Parmi les résidus d'agroindustries les plus utilisés en FMS, le son de blé est un des plus intéressants, il a donc été choisi pour le comparer au tourteau de colza (**Tableau 12**).

Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques du tourteau de colza et du son de blé

Substrat	Tourteau de colza		Son de blé	
	Produit brut	Produit à 40% de MS	Produit brut	Produit à 40% de MS
Matière sèche (%)	85,71 ± 0,06	40,89 ± 0,08	88,27 ± 0,19	38,83 ± 0,12
Densité volumique (g/L)	571,11 ± 9,44	648,14 ± 8,79	158,77 ± 2,10	277,12 ± 2,13
Capacité maximale de rétention en eau (%)	71,54 ± 0,49		83,63 ± 0,27	
pH spontané humide	5,46 ± 0,21		6,53 ± 0,10	

Le son de blé est un substrat bon marché couramment utilisé en FMS pour la production d'enzymes et de métabolites secondaires. En dehors de la présence d'importants composés nutritionnels, principalement des polysaccharides non amylacés (~58%), de l'amidon (~19%) et des protéines brutes (~18%), ses caractéristiques physiques jouent un rôle important en FMS²¹². La capacité maximale de rétention en eau est élevée (83.6%) ce qui favorise l'absorption de l'eau et donc la croissance des microorganismes fongiques qui ont besoin d'un environnement humide pour se développer. L'eau peut s'évaporer rapidement lors du développement du champignon filamenteux qui dégage de la chaleur métabolique lors de sa croissance. La surface élevée de ses particules et les liaisons faibles entre celles-ci assurent une bonne accessibilité pour la colonisation des microorganismes. Sa densité une fois humide reste faible, la compaction est limitée ce qui représente un avantage considérable pour la dissipation de la chaleur métabolique et la circulation de l'air. Par rapport au son de blé, la granulométrie du tourteau de colza est plus fine ce qui a une incidence sur la densité volumique qui est donc trois fois plus importante pour le produit brut. Cette différence est moins marquée entre les produits humidifiés à 40% de matière sèche grâce à sa capacité de gonflement en présence d'eau. Le tourteau ne peut pas être ajusté à la capacité maximale de rétention en eau, car dans ces conditions, la compaction et la viscosité deviennent trop importantes en raison d'une granulométrie très fine et de la présence de matière grasse. Les petites particules offrent généralement une plus vaste surface mais peuvent facilement former des agglomérats et se compacter tandis que les grosses particules offrent une meilleure aération¹⁰³. Une fois humidifié le tourteau de colza devient plus dense par rapport à la condition brute (sans addition d'eau) mais présente une texture plus aérée et moins collante et donc plus favorable au procédé FMS par rapport à son état saturé en eau. Ces analyses ont mis en exergue les problèmes que pourra poser le tourteau de colza lors du changement d'échelle car ce phénomène de compaction sera encore plus marqué avec l'augmentation de la hauteur de couche en fermenteur. L'addition d'un cosubstrat ou d'un excipient pourrait être envisageable pour

améliorer la texture et l'aération du milieu de culture. Quant au pH de 5.6, ils conviennent parfaitement au développement des microorganismes fongiques. Les *Streptomyces* sont capables d'évoluer sur une gamme de pH plutôt large même si elles sont considérées comme évoluant de préférence dans les environnements neutres et alcalins (6.5 – 8). Les souches isolées du sol se développent d'ailleurs dans une gamme de pH plus acide (3.5 – 6.8)²¹³.

3.1.2. Composition des différents lots et teneur en protéines totales et solubles

Les trois lots de tourteau utilisés dans ce projet proviennent d'une même usine de trituration mais diffèrent selon leur composition (**Tableau 13**). Le lot 1 est le plus riche en matière grasse tandis que le lot 2 est le plus pauvre en protéines (totales et solubles). La solubilité des protéines étant un indicateur de la qualité nutritionnelle du tourteau de colza chez l'animal, le lot 2 serait donc le plus pauvre en protéine assimilable^{142,214}. Ces différences peuvent également avoir un effet sur la croissance des microorganismes par rapport à la disponibilité en source d'azote. La proportion de la fraction soluble est minime et ne représente que 15 à 27% des protéines totales. La composition des lots est globalement proche de celle indiquée par la littérature (cf. Chapitre I, partie I - 3.1). Les données issues des ouvrages consultés sont exprimées par rapport au produit brut et non sec, c'est pourquoi les valeurs affichées ici sont légèrement plus élevées.

Tableau 13. Composition des lots de tourteau de colza

Tourteau de colza	Lot 1	Lot 2	Lot 3
Matières grasses totales (%)	4,95	1,66	1,67
Cellulose brute (%)	14,30	14,98	12,78
Protéines totales (%)	37,40	36,07	40,88
Matières azotées solubles (%)	10,23	5,44	6,89

Par rapport au tourteau de soja, principal concurrent sur le marché des protéines végétales, la quantité de protéines totales relative au poids brut est 10% plus faible avec 34% pour le tourteau de colza et une moyenne de 45% pour le tourteau de soja. La différence est davantage marquée en ce qui concerne la teneur en protéines solubles des deux tourteaux obtenue avec la méthode au KOH 0.2%, avec plus du double pour le soja c'est à dire 32.04 ± 1.4 % et seulement 13.24 ± 0.5 % pour le colza. Relativement aux travaux de Fernandez *et al.*, ces résultats sont similaires une fois exprimés par rapport aux protéines totales. L'écart d'environ 30% entre les deux substrats est conservé avec 70.72% de protéines solubles pour le soja et 39.27% pour le colza par rapport à la teneur respective en protéines totales²⁰⁵. Ces écarts entre les deux tourteaux sont conséquents et reflètent en partie les résultats obtenus en matière de performance chez l'animal puisque la valeur nutritionnelle du point de

vue des protéines est plus réduite pour le colza par rapport au soja. Le tourteau de colza est par conséquent moins bien adapté à l'alimentation des volailles qui sont des animaux à croissance rapide réclamant une alimentation concentrée en protéines. L'objectif est de réduire au maximum cette différence en utilisant le procédé de fermentation en milieu solide.

3.2. Estimation de la croissance en fiole Erlenmeyer

La littérature recense un certain nombre de méthodologies pour l'estimation indirecte de la biomasse en FMS dans le but de décrire la croissance des microorganismes. Parmi ces méthodes, la détermination de la production de CO₂ et de la perte de masse sèche semble particulièrement pertinente en raison de la rapidité et de la simplicité des mesures pour une application dans le cadre d'un criblage de souche mené au stade laboratoire en fiole Erlenmeyer. Ces variables ont notamment été corrélées entre elles ainsi qu'à l'évolution de la glucosamine^{130,199}. La fiole Erlenmeyer, considérée comme étant un système à aération passive, est utilisée comme nouveau modèle pour obtenir le profil de la production de CO₂ au cours de temps. Cette approche est tout à fait valable dans l'hypothèse où les pertes de CO₂ sont relativement faibles par rapport à la respiration du microorganisme. Normalement les mesures de respiration sont effectuées de manière rigoureuse *via* un enregistrement en ligne à partir de systèmes FMS sous aération ou clos. La méthodologie appliquée dans cette étude ne peut évidemment pas rivaliser pour ce qui est de la précision au niveau des analyses effectuées mais permet toutefois d'obtenir une courbe cinétique de l'évolution de la production de CO₂. Afin de vérifier la fiabilité du profil obtenu, celui-ci est corrélé à la perte de masse sèche. Cette approche est inédite et peut représenter une alternative à l'utilisation des systèmes de mesure plus complexes qui sont difficiles à mettre en place dans le cadre d'un criblage de souche.

Toutes les données expérimentales sont importantes dans la mesure où elles donnent une idée du profil de croissance et de la productivité d'une souche dans des conditions données. La modélisation est un outil apportant des informations supplémentaires grâce à l'estimation des paramètres de cinétique de croissance microbienne comme la vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{\max}) et la biomasse maximale (X_m) obtenues en utilisant les modèles exponentiel et logistique décrits par Mitchell *et al.* et appliqués au procédé FMS¹⁹⁷. Ces paramètres de cinétique seront comparés et utilisés pour discriminer les souches entre elles dans le cadre d'un criblage.

3.2.1. Evolution de la production de CO₂

Une des approches possible pour estimer la croissance microbienne est la mesure de la respiration par la libération de dioxyde de carbone. Les résultats présentés ci-dessous (**Figure 11A**) montrent une augmentation du pourcentage de CO₂ après ensemencement avec la souche *A. niger*

utilisée comme modèle dans cette étude. La série témoin avec le tourteau seul libère au maximum 1% de CO₂ mais ne présente pas de contaminants suite à une vérification sur milieu gélosé non sélectif PCA (Plate Count Agar). Ce dégagement peut être lié à des phénomènes d'oxydation chimique des acides gras (rancissement). La première phase qui peut être observée en présence de l'*Aspergillus niger* est une phase de latence qui dure approximativement 12h lors de la germination des spores. La moisissure commence à se développer en consommant les nutriments du tourteau de colza directement disponibles et elle synthétise en même temps des enzymes pour dégrader les composants plus complexes. La croissance s'accélère ensuite faisant apparaître le mycélium sous forme de filaments blancs. Cette étape est suivie de la phase exponentielle qui se termine au moment du pic de CO₂ (13%) vers 48h de culture lorsque la souche commence à sporuler. L'aspect de la culture devient granuleux et le mycélium bien visible au niveau de la surface du substrat change de couleur et devient de plus en plus foncé (**Figure 12**). La pigmentation noire progressive des spores est un indicateur de leur maturation car elle contribue à leur résistance aux ultraviolets²¹⁵.

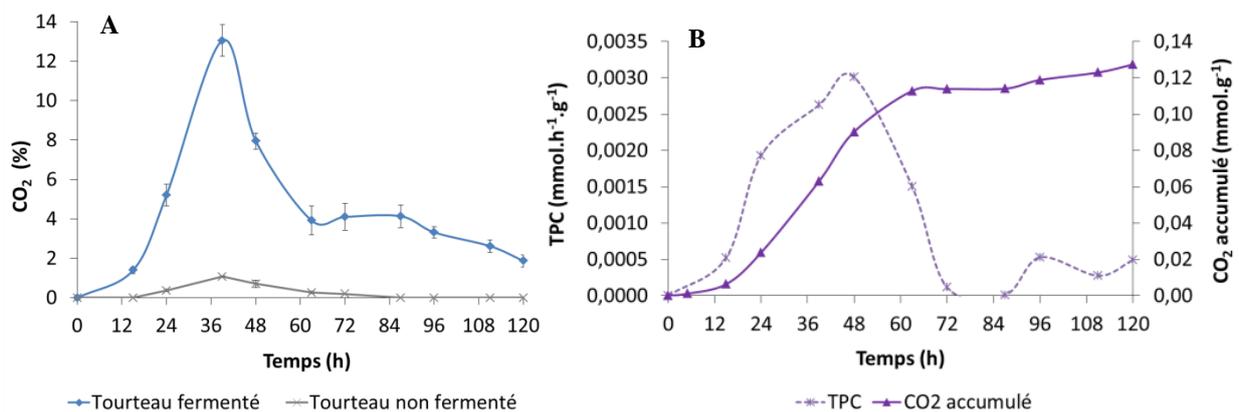


Figure 11. Evolution du pourcentage de CO₂ lors de la croissance d'*A. niger* sur tourteau de colza. **A** : Pourcentage de CO₂ sur tourteau fermenté et non fermenté. **B** : Taux de production de CO₂ (TPC) et quantité correspondante de CO₂ accumulé par rapport au poids sec de la culture.

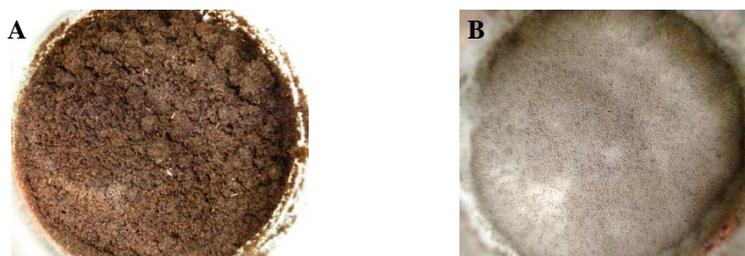


Figure 12. Aspect macroscopique de la culture d'*A. niger* sur tourteau de colza en fiole Erlenmeyer. **A** : Culture au temps initial (T0). **B** : Culture à 72h.

A partir de ce moment, le pourcentage de CO₂ chute progressivement, la croissance ralentit en raison de l'épuisement des nutriments indispensables au maintien de la croissance d'*A. niger*. Une limitation en oxygène peut également être responsable de ce ralentissement puisqu'il s'agit d'un système passif, les échanges gazeux sont en effet limités au niveau du bouchon en coton puisqu'une élévation du pourcentage de CO₂ est constatée lors de la phase de croissance exponentielle. La reproduction du microorganisme par la sporulation est une stratégie d'adaptation qui lui permet de se multiplier et de coloniser des milieux plus favorables à son développement. Les spores présentent des caractéristiques remarquables de résistances (température, dessiccation, etc.) et leur nature volatile et hydrophobe permet une dispersion de l'espèce, parfois à une grande distance de son point d'origine.

Les différentes étapes de la cinétique de croissance sont également observées dans le cas du taux de production de CO₂ (TPC) ainsi que la quantité de CO₂ accumulé au cours du temps (**Figure 11B**). La quantité de CO₂ produit en fin de fermentation de 0.12 mmol.g⁻¹ est très faible car elle est sous-estimée par rapport aux valeurs de l'ordre de 5 à 10 mmol.g⁻¹ obtenues respectivement dans des systèmes FMS de stade laboratoire utilisant des colonnes sous aération et des boîtes de Pétri en chambre close^{199,206}. Malgré l'imperfection de cette approche au niveau des mesures réalisées, le profil de l'accumulation du CO₂ reflète bien les différentes phases de croissance qui ont été observées avec la variation du pourcentage de CO₂ dans l'espace de tête des fioles Erlenmeyer. La perte de CO₂ est donc suffisamment faible pour visualiser une accumulation lors de la phase exponentielle de croissance. Celle-ci se termine clairement au moment du pic de CO₂ puisque l'abaissement progressif lors de la phase de ralentissement indique que la production de CO₂ devient trop faible et ne s'accumule plus dans l'espace de tête. Par conséquent, la concentration en O₂ augmente en se rapprochant de la composition de l'air ambiant *via* les échanges constants avec le bouchon en coton. Le pourcentage de CO₂ ne devient cependant pas nul car le microorganisme se maintient en phase stationnaire et conserve une faible activité métabolique mais la biomasse n'augmente plus et a atteint sa densité maximale. La respiration va cependant finir par s'arrêter car la concentration en cellule métaboliquement active diminue.

3.2.2. Evolution de la perte de masse sèche

La perte de masse ainsi que le pH sont déterminés à partir de trois fioles qui sont intégralement sacrifiées à chaque temps de cinétique pour garantir davantage de précision. Contrairement à la perte de masse sèche, le pH n'est pas suivi pour l'estimation de la croissance du microorganisme car celui-ci est essentiellement lié aux activités métaboliques. Le pH peut néanmoins être un indicateur du stade de développement de la souche et de la production de molécules d'intérêt comme les enzymes. L'apparition de celles-ci peut éventuellement être mise en relation avec la production de CO₂ comme l'a démontré Farinas *et al.* en bioréacteur avec des espèces du genre *A. niger*²¹⁶.

D'après la **figure 13**, le pH est plutôt stable en début de culture puis augmente après 48h lors de la phase de ralentissement de la croissance. Ce phénomène peut être lié à la sécrétion de protéases qui dégradent les acides aminés, libérant de l'ammoniac ²¹⁷. L'évolution de la perte de masse sèche est comparable à celle du CO₂ accumulé. Elle atteint un maximum de 23% en fin de fermentation. En début de culture aucune perte de masse n'est constatée probablement en raison d'une respiration très faible et non détectable mais par la suite il se produit une accélération similaire correspondante à la phase exponentielle de croissance entre 24 et 48h de culture. Ce paramètre semble donc bien lié à la libération du CO₂ au cours du temps *via* la consommation des sucres fermentescibles ⁷.

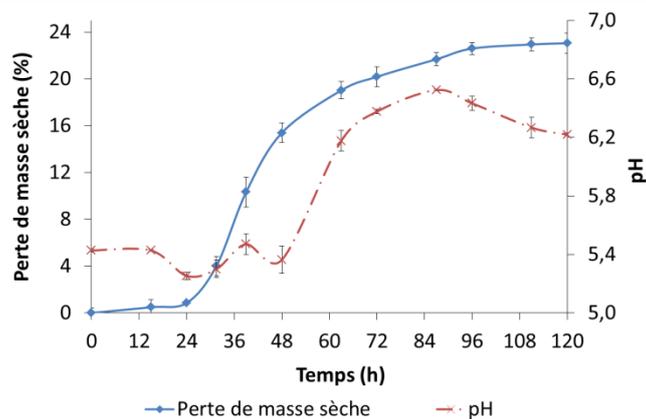


Figure 13. Evolution du pourcentage de perte de masse sèche et du pH lors de la croissance d'*A. niger* sur tourteau de colza

3.2.3. Corrélation entre le CO₂ accumulé et la perte de masse sèche

La corrélation entre la quantité de CO₂ produit et la perte de masse sèche a déjà été mise en évidence au stade laboratoire en FMS ^{199,200}. Une relation similaire sur tourteau de colza avec *A. niger* a été obtenue (**Figure 14**) démontrant que plus de 98% de la variabilité de l'accumulation de CO₂ est expliquée par la perte de masse sèche, ce qui constitue un excellent résultat ($R^2 = 0.986$). L'indépendance et la normalité des résidus ayant été préalablement vérifiées, le test de Fisher, donne une p-valeur inférieure à 0,0001. Il existe donc une relation linéaire significative entre la perte de masse sèche et l'accumulation du CO₂ au risque α de 5%. Cette corrélation démontre que le profil du CO₂ accumulé, basé sur une estimation de la quantité de CO₂ produit, est pertinent pour prédire la perte de masse sèche et donc la croissance du microorganisme. La perte de masse sèche est occasionnée par le changement du contenu en substrat carboné comme les fibres et les sucres. Les carbohydrates sont dégradés par les voies métaboliques sous forme de CO₂ (cycle de Krebs). L'évolution de ce dernier peut ainsi être prédite sur la base de ces changements de composition ¹⁹⁹.

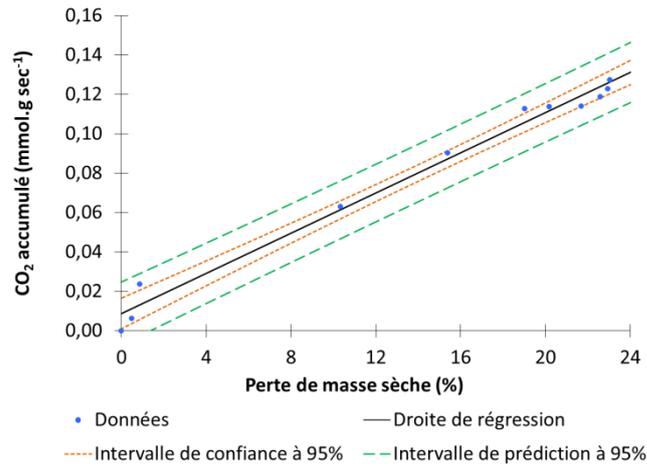
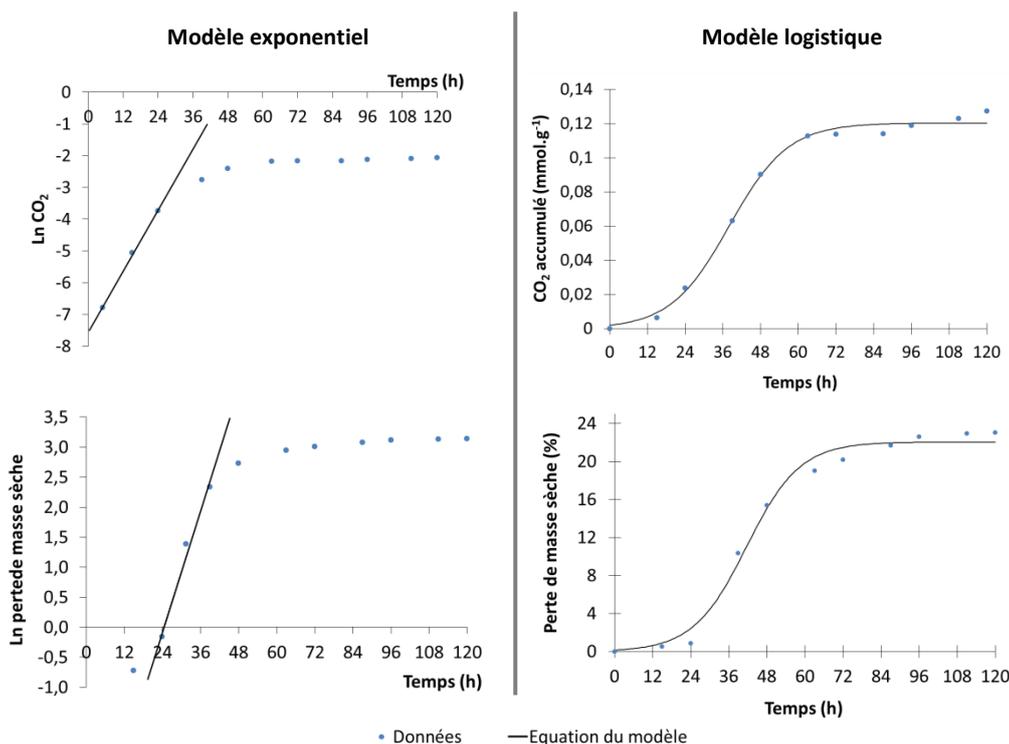


Figure 5. Corrélation entre le CO₂ accumulé et la perte de masse sèche. L'intervalle de confiance donne une étendue de valeurs plus petite, parce qu'il s'agit d'une estimation d'un intervalle pour une moyenne alors que l'intervalle de prédiction estime un intervalle pour une seule observation. En effet pour cette nouvelle observation il est nécessaire de prendre en compte la variabilité individuelle, ce qui augmente la variance de l'estimateur et donc la largeur de l'intervalle.

3.2.4. Détermination des paramètres de cinétique

La production de CO₂ et la perte de masse ont été modélisées pour estimer les paramètres de cinétique de la croissance microbienne dans le système étudié. La vitesse spécifique maximale de croissance est déterminée en utilisant le modèle exponentiel et logistique (**Figure 15 et tableau 14**). Le modèle exponentiel ne permet pas de donner une prédiction de la biomasse maximale (X_m) correspondante à la quantité maximale de CO₂ produit ou à la perte de masse sèche maximale. L'équation considère uniquement la phase exponentielle mais cette évolution théorique ne reflète pas l'entièreté des données de l'expérience car le microorganisme ne peut croître indéfiniment puisque sa croissance est limitée par l'environnement dans lequel il se trouve. La valeur de X_m affichée dans le **tableau 14** pour le modèle exponentiel ne correspond pas à une prédiction mais à la donnée expérimentale maximale enregistrée pour chacune des deux variables. D'après les résultats de l'estimation des paramètres de cinétique, les deux modèles utilisés décrivent parfaitement la croissance du microorganisme. En effet les coefficients de détermination, représentant la part de variabilité expliquée par les modèles, sont élevés et proches de un. Les valeurs des μ_{max} sont équivalentes pour un même modèle. La méthode des moindres carrés est utilisée pour ajuster le modèle logistique en minimisant la somme des carrés des écarts entre les valeurs observées et les valeurs données par le modèle. L'analyse des résidus confirme la fiabilité du résultat obtenu car ils sont faibles autant pour les paramètres du modèle que pour les observations. Les valeurs initiales sont toutefois surestimées par le modèle logistique pour la perte de masse (0,15%) et la quantité de CO₂ (0,002 mmol.g⁻¹). Quant aux valeurs maximales (X_m), les prédictions du modèle logistique sont très voisines des observations expérimentales.



Figures 15. Profils obtenus à partir du CO₂ accumulé et de la perte de masse sèche en utilisant l'équation exponentielle (colonne de gauche) et logistique (colonne de droite).

Tableau 14. Estimation des paramètres de cinétique à partir du modèle exponentiel et logistique

Variable	Production de CO ₂			Perte de masse sèche		
	μ_{\max} (h ⁻¹)	X _m (mmol.g ⁻¹)	R ²	μ_{\max} (h ⁻¹)	X _m (%)	R ²
Modèle exponentiel*	0,161	0,127	0,998	0,166	23,045	0,981
Modèle logistique	0,107	0,120	0,995	0,119	22,058	0,990

* X_m correspond à la valeur maximale obtenue à partir des données expérimentales pour le modèle exponentiel

Bien que les μ_{\max} soient très proches pour les deux variables, en ce qui concerne le modèle exponentiel, le nombre de données expérimentales est insuffisant pour représenter avec certitude la phase de croissance exponentielle d'*A. niger*. En effet, il a été rapporté que pour réaliser des analyses de cinétique convenable le profil de croissance doit au moins compter dix points de données dont la majorité doit être située dans la zone de croissance exponentielle et dans les phases d'accélération et de décélération²¹⁸. Il est évident que le modèle exponentiel n'est pas approprié pour expliquer de manière précise la croissance des microorganismes car il ne prend en compte que trois points de données. Ce dernier ne peut donc pas être retenu car il nécessite des mesures de CO₂ ainsi que des prélèvements pour la perte de masse trop fréquents jusqu'au ralentissement de la croissance du microorganisme. Le suivi répété de la perte de masse sèche, qui requiert le prélèvement systématique

de l'entièreté de la culture à chaque point de cinétique, n'est pas envisageable lors d'un criblage de souche sachant que l'apparition ainsi que la durée de cette phase sont inconnues pour l'ensemble des quarante souches à étudier. La valeur de μ_{\max} n'est pas la même entre les deux modèles puisque l'évolution de la biomasse n'est pas représentée par la même équation. Le modèle logistique considère l'entièreté du profil de croissance tandis que le modèle exponentiel prend en compte exclusivement la phase de croissance exponentielle. Cette différence a notamment été constatée par Lareo *et al.*, les valeurs de μ_{\max} sont propres à chaque modèle et aux hypothèses qui les caractérisent ²⁰⁷.

A l'aide du modèle logistique appliqué à la perte de masse sèche Wang *et al.* ont obtenu un μ_{\max} du même ordre de grandeur (0.14 h^{-1}) avec un *A. oryzae* cultivé à 30°C sur du tourteau de colza. Lorsque cette même souche est cultivée strictement dans les mêmes conditions sur du blé, le μ_{\max} est pratiquement doublé (0.21 h^{-1}) avec une perte de masse maximale (X_m) associée également plus importante. Cette différence peut s'expliquer par une quantité plus réduite de carbone disponible dans le tourteau de colza entraînant une croissance plus faible ²¹¹. Dans le même cas de figure l'équipe de Nagel *et al.*, a testé l'addition de différents nutriments (sources d'azote et vitamines) pour améliorer le μ_{\max} ¹⁹⁸. La vitesse spécifique maximale de croissance est dépendante du milieu de culture, notamment du type de substrat et de la concentration en nutriment, mais aussi des conditions de culture telles que la température et l'humidité, c'est pourquoi elle est couramment employée dans les études d'optimisation ^{219,220}. L'effet du taux d'inoculation initial a également été examiné avec une levure cultivée en FMS. Concernant ces essais, le temps de latence ainsi que la quantité de CO_2 produit sont directement liés à la quantité de biomasse introduite dans le milieu en début de fermentation. La quantité de cellules a d'ailleurs été corrélée avec la production de CO_2 . Comme attendu, le μ_{\max} ne varie pas en fonction du taux d'inoculation, en revanche il peut être impacté par la présence de contaminants ²⁰⁶. Dans le cadre d'un criblage, les souches peuvent aussi être discriminées d'après leur performance en matière de croissance et d'activités métaboliques comme la consommation des nutriments et la synthèse de molécules d'intérêt ^{221,222}. La production maximale de biomasse est essentielle à prendre en compte en même temps que le taux spécifique de croissance. En effet, pour une même valeur de μ_{\max} , la phase stationnaire peut être plus ou moins rapidement atteinte suivant la souche considérée, donc la quantité de biomasse maximale produite n'est évidemment pas la même. Le taux spécifique de croissance propre à chaque microorganisme et la biomasse maximale associée, sont des paramètres importants de cinétique de croissance qui peuvent être utilisés comme critère de sélection dans le cadre d'un criblage de souche pour les différencier dans des conditions de culture identiques.

3.2.5. Relation entre la perte de masse sèche et la concentration en protéine totale

Plusieurs études se sont focalisées sur l'enrichissement en protéines de divers sous-produits d'agriculture par FMS pour une application en alimentation animale. Suite au traitement fongique, il a

été rapporté une amélioration de la qualité nutritionnelle avec notamment une teneur en protéines plus élevée par rapport au produit non fermenté. Il s'avère que cette augmentation est étroitement associée à la perte de masse sèche lorsqu'aucune source d'azote n'a été additionnée au milieu de culture. L'azote présent dans les substrats solides, contrairement aux carbohydrates majoritairement convertis sous forme de CO₂, ne se volatilise pas au cours de la croissance mais il est converti en biomasse microbienne car les microorganismes utilisent une partie de l'azote pour se développer. Une fois les ressources épuisées le phénomène de protéolyse peut toutefois apparaître en fin de fermentation convertissant les acides aminés en ammoniacque qui se volatilise uniquement à des valeurs de pH élevés (7.5 – 8) ce qui n'est pas le cas dans cet essai puisque celui-ci reste inférieur à 7 en fin de fermentation avec la souche *A. niger* (**Figure 13**)²²³. La perte de masse a donc pour effet de concentrer la teneur en azote présente initialement dans le substrat solide. Un certain nombre de facteurs comme le pH, la température, l'humidité, l'aération, le type de microorganisme et de substrat solide ainsi que la durée du procédé influencent l'efficacité de l'enrichissement en protéines^{5,224,225}.

En considérant ces éléments, le contenu en protéines du produit fermenté peut donc être déterminé de manière théorique en prenant en compte la teneur initiale en protéines du substrat solide et la perte de masse sèche finale. Une culture sur le tourteau de colza a été effectuée avec la souche modèle *A. niger* afin de valider cette hypothèse qui a déjà été citée à plusieurs reprises dans la littérature. La culture a été stoppée après 5 jours et les mesures ont été effectuées en triplicata à partir de trois fioles Erlenmeyer (**Tableau 15**). La valeur théorique du contenu en protéines totales obtenue est assez proche, à 2.6% près, de celle indiquée par le dosage conventionnel Kjeldahl. La perte de masse sèche est donc bien liée à l'enrichissement en protéines totales. Sachant qu'aucune perte d'azote ne peut être occasionnée dans les cultures en milieu solide, la différence peut être due à des imprécisions au niveau des mesures de perte de masse notamment concernant le poids des cultures et le pourcentage de matière sèche. Etant donné que les écart-types sont d'environ 1% pour le dosage, le calcul semble pertinent pour estimer l'azote total protéique dans les cultures sur tourteau de colza.

Tableau 15 : Estimation de la quantité de protéines totales contenue dans le produit fermenté

Temps de culture (h)	Perte de masse sèche (%)	Protéines totales	
		Méthode Kjeldahl (%)	Calcul théorique (%)
0	0,01 ± 0,26	37,17 ± 1,1	-
115	20,13 ± 1,01	43,93 ± 1,3	46,54

3.3. Etude comparative des lots de tourteau de colza

Dans ce premier chapitre deux lots de tourteau de colza sont utilisés pour réaliser les deux phases de sélection des microorganismes. Or d'après les résultats présentés précédemment dans la partie 3.1.2. ces lots diffèrent de par leur composition. Les écarts pourraient affecter la croissance des

microorganismes particulièrement en ce qui concerne la quantité d'azote digestible sachant que celle-ci est deux fois plus importante dans le lot 1. Préalablement aux essais de cultures sur les deux lots de tourteau avec la souche modèle *A. niger*, l'effet de la stérilisation est étudié car la solubilité des protéines est sensible aux traitements thermiques.

3.3.1. Impact de la stérilisation à l'autoclave

Le dosage des protéines totales a tout d'abord été effectué en utilisant la méthode Kjeldahl sur le lot 1 à partir d'un échantillon de tourteau de colza avant et après sa stérilisation à l'autoclave 20 minutes à 121°C. La teneur en protéine de ces échantillons est respectivement de 37.29% et 37.51%. L'azote total protéique n'est donc pas affecté par le traitement thermique. En revanche pour les protéines solubles des différences significatives ont été observées quelle que soit la méthode d'extraction employée (**Figure 16**).

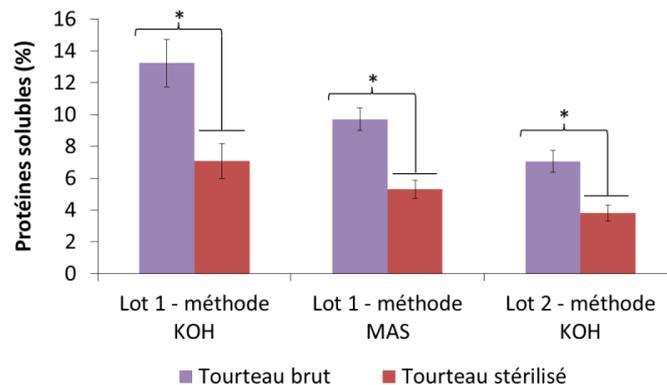


Figure 16. Impact de la stérilisation sur le contenu en protéines solubles des deux lots de tourteau de colza. Le pourcentage de protéines solubles est exprimé par rapport à la matière sèche. KOH : extraction dans l'hydroxyde de potassium à 0.2% ; MAS : extraction dans la salive artificielle. * $P < 0.003$ (test t de Student sur échantillons appariés).

L'application des deux méthodes de dosage montre que la qualité du tourteau diminue après sa stérilisation, la réaction de Maillard est sans doute responsable de cette perte au niveau des protéines solubles. Il est important de noter que la méthode Bipea utilisé par Euronutrition est différente de celle appliquée dans notre laboratoire. Les valeurs plus faibles obtenues avec le lot 1 indiquent une efficacité moindre pour extraire les protéines solubles du tourteau de colza par rapport à la méthode au KOH. Concernant la condition non stérilisée, le pourcentage de protéines solubles est deux fois plus faible dans le second lot de tourteau, ces résultats sont également confirmés par ceux obtenus avec la salive artificielle (**Tableau 13**, partie 3.1.2). Le traitement thermique à l'autoclave fait baisser encore davantage les quantités de protéines solubles. En effet, ces dernières sont divisées par deux après stérilisation. Les valeurs de solubilité pour le soja ont été corrélées avec le taux de croissance chez la volaille et le porc, avec un net déclin des performances à mesure que la durée des traitements

thermiques augmente ^{226,227}. D'après des essais menés chez le rat, la digestibilité plus faible du tourteau de colza après les traitements thermiques serait liée à une plus grande proportion de protéines associées aux fibres. La relation entre les protéines solubles et la lysine disponible a d'ailleurs été mise en évidence en utilisant la méthode au KOH appliquée comme indicateur du degré de transformation des tourteaux. Plusieurs auteurs ont démontré que le temps de chauffage est le facteur le plus important dans la mesure où il affecte significativement la valeur nutritionnelle du tourteau de colza pour les monogastriques ^{142,205,228}.

L'étape de stérilisation ne sera bien évidemment plus applicable au stade industriel car elle est trop onéreuse, le tourteau sera directement fermenté en sortie de trituration ce qui limitera également sa contamination lors d'un stockage prolongé. Cette contamination évolue en cours de stockage, la stérilisation est donc nécessaire à ce stade de l'étude. La différence entre les deux lots de tourteau n'est pas négligeable puisque les protéines solubles représentent une source d'azote directement disponible pour le développement des champignons du fait qu'aucune source d'azote exogène n'est apportée au milieu de culture. La croissance des microorganismes peut donc être plus ou moins affectée selon la souche et sa capacité à prélever les sources d'azote moins accessibles.

3.3.2. Culture d'*Aspergillus niger* sur les deux lots de tourteau

Afin de confirmer les hypothèses évoquées dans le paragraphe précédent, *Aspergillus niger* a été choisi pour cette étude comparative. Ce microorganisme pousse relativement bien sur le lot 1 et les résultats obtenus ont déjà été confirmés sur deux essais distincts. *A. niger* est mis en culture sur les deux lots de tourteau dans les mêmes conditions que les cultures effectuées lors du crible. Cette étude comparative est basée sur la croissance du microorganisme en prenant en compte les mesures de respiration et de perte de masse sèche et les performances en matière d'enrichissement en protéines. La digestibilité des protéines est également évaluée au cours du temps en appliquant la méthode au KOH à 0.2% sur quatre temps de cinétique.

- Etude des paramètres liés à la croissance

L'évolution du pourcentage de CO₂ n'est pas la même sur les deux lots de tourteau au cours du temps (**Figure 17**). La croissance sur lot 1 est comparable à celle observée dans la partie 3.2.1 de ce chapitre. Le pic de CO₂ apparaît au même moment pour les deux séries mais avec une différence significative de 8% pour les valeurs maximales. Cette différence a évidemment un impact sur la perte de masse qui est plus faible sur le lot 2 surtout après 48h de culture au moment du pic de CO₂. L'écart devient ensuite moins marqué avec à peine 3% de différence pour le point final à 96h de culture. Le modèle logistique appliqué aux profils du CO₂ accumulé donne des valeurs de μ_{\max} similaires, 0.102 et 0.104 h⁻¹, respectivement pour le lot 1 et 2. En revanche, la production maximale de CO₂ (X_m) est

triplée pour la culture sur lot 1 par rapport au lot 2. *A. niger* semble donc avoir eu plus de difficultés à se développer sur le second lot de tourteau avec une respiration et donc des activités métaboliques plus réduites surtout en début de culture. L'activité métabolique peut être en partie confirmée par l'évolution du pourcentage de perte de masse sèche dont la différence entre les deux cultures est la plus importante à 48h lorsque la respiration a été maximale après les pics de CO₂. Le ralentissement du développement est ensuite moins prononcé pour le lot 2, la croissance est maintenue jusqu'à atteindre une perte de masse sèche finale pratiquement équivalente aux cultures sur lot 1.

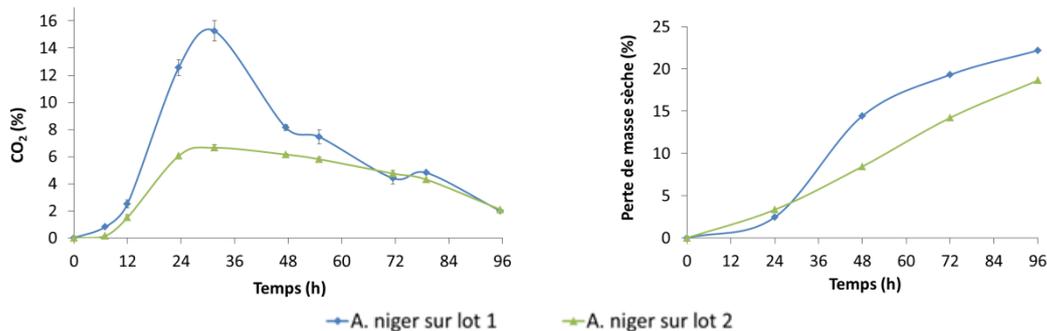


Figure 17. Evolution du pourcentage de CO₂ et de la perte de masse sèche des cultures d'*Aspergillus niger* sur les deux lots de tourteau de colza

- Enrichissement en protéines totales et solubles

Les pourcentages de protéines totales et solubles sont plus élevés dans les cultures sur lot 1 (**Figure 18**).

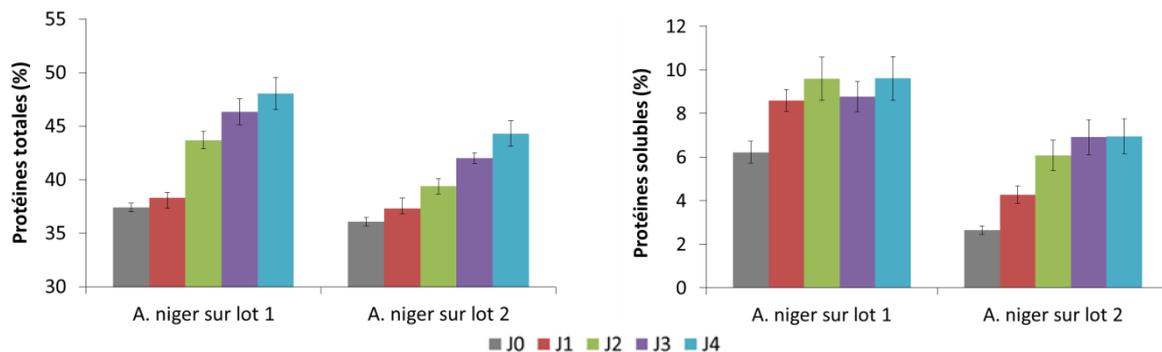


Figure 18. Contenu en protéines totales et solubles des cultures d'*Aspergillus niger* sur les deux lots de tourteau de colza. Les pourcentages sont exprimés par rapport à la masse sèche. J : jour de culture.

Le contenu théorique en protéines totales dépend de l'évolution du pourcentage de perte de masse sèche et celle-ci est plus élevée pour le lot 1 d'après les résultats présentés précédemment. Concernant les protéines solubles, les écarts entre produit brut à J0 et fermenté à J4 respectifs à chaque lot sont à peu près égaux (3.4% pour le lot 1 et 4.3% pour le lot 2) suggérant une efficacité métabolique similaire de la souche. La référence J0, représentée par le tourteau de colza stérilisé à

l'autoclave, est toutefois beaucoup plus faible dans le cas du lot 2. Par conséquent, la culture d'*A. niger* sur celui-ci permet d'obtenir pratiquement le double d'enrichissement en protéines solubles à J4. L'accroissement de la quantité de protéines solubles est plus rapide pour le lot 1 mais elle n'évolue pratiquement plus les jours suivants contrairement aux cultures sur lot 2. Ce phénomène laisse supposer une activité métabolique plus intense à ce moment-là qui est par ailleurs corrélée à la croissance, avec probablement une quantité de nutriments directement disponibles plus importante dans le lot 1 par rapport au lot 2. La digestibilité augmente certainement en fonction des activités enzymatiques qui libèrent des composés essentiels (source de carbone et d'azote) pour assurer le développement de la souche. Il est difficile de conclure précisément sur ce sujet car très peu d'éléments sont disponibles notamment au niveau de l'incidence de la trituration sur les modifications des hydrates de carbone et des protéines et donc leur disponibilité comme substrats pour le métabolisme fongique.

La capacité des enzymes à améliorer la digestibilité des protéines est bien connue. L'équipe de Shi *et al.*, a démontré une amélioration de la digestibilité *in vitro* des acides aminés dont certains essentiels à savoir la méthionine, lysine, arginine et histamine après fermentation du tourteau de colza avec *A. niger*. Ces changements sont étroitement associés à la croissance du microorganisme qui a la capacité de sécréter un certain nombre d'enzymes, notamment des protéases, endoglucanases, xylanases, et phytases⁷. L'addition d'enzymes exogènes dégradant les polysaccharides non amyliques au régime alimentaire du poulet, composé en partie de tourteau de colza, permet d'améliorer la digestibilité des protéines mais ces effets bénéfiques n'ont pas été systématiquement observés et sont dépendants du type d'aliment. Il est en effet difficile d'établir une relation évidente entre ingrédient et enzymes dans ce type de régime mixte²²⁹.

3.4. Première phase de criblage des souches

La première étape de sélection réalisée à partir des quarante souches consiste à les différencier par rapport à leur capacité à se développer sur tourteau de colza (lot 1) dans des conditions identiques, c'est-à-dire à 25°C et à un pourcentage initial de matière sèche fixé à 40%. Le seul critère retenu à ce stade est la production de CO₂. Afin de faciliter la lecture des résultats, les souches testées sont numérotées et classées en trois grands groupes (**Tableau 10**). Concernant les champignons, cette classification ne correspond pas à la taxonomie habituelle, mais cela permet de simplifier en distinguant ceux qui ne font pas de carpophore, c'est-à-dire les moisissures ou champignons inférieurs, de ceux qui en font à savoir les champignons supérieurs. La durée maximale des cultures est fixée à 6 jours car au-delà la fermentation est considérée comme étant trop longue. Toutes les souches qui ne sont pas capables de sporuler ou ayant une quantité de spores trop faible sont incorporées au tourteau de colza sous forme d'un inoculum liquide contenant de la biomasse concentrée (mycélium ou

bactéries selon la souche). Cette opération a été réalisée pour les *Streptomyces*, les champignons supérieurs et quelques inférieurs (souches n° 11, 16 et 28). Pour les autres souches, le taux d'ensemencement est fixé à 1.10^7 spores.g⁻¹ de matière sèche. Le modèle logistique est choisi pour représenter la dynamique de croissance pour l'ensemble des souches étudiées à partir des profils du CO₂ accumulé. L'équation permet d'estimer la quantité maximale de CO₂ produit dans les conditions de l'essai et de déduire la vitesse maximale de croissance spécifique propre à chaque souche.

3.4.1. Croissance des champignons inférieurs

Parmi les champignons inférieurs, plusieurs souches se distinguent des autres par une plus forte production de CO₂ avec des pics entre 8 et 10% vers 48h de culture (**Figure 19A**). Ces souches qui appartiennent majoritairement au genre *Aspergillus* (n° 1 à 9) et *Rhizopus* (n° 10, 11 et 42), auraient donc une meilleure croissance par rapport aux *Geotrichum* (n° 14 et 15) et *Monascus* (n° 16 et 17) dont la respiration est nettement plus faible. Certaines de ces souches présentent néanmoins une chute brutale du pourcentage de CO₂ alors que les souches n° 12, 1, 6 et 2 se maintiennent sur une plus longue durée. Ce ralentissement plus progressif de la croissance après le pic, peut indiquer la présence d'un métabolisme mieux adapté au milieu de culture avec notamment la synthèse d'enzymes permettant de dégrader davantage le substrat. Cette capacité permettrait de maintenir plus longtemps la croissance après l'épuisement des nutriments plus facilement disponibles. De plus suivant la nature de ces activités enzymatiques, les protéines solubles du tourteau de colza pourraient aussi être augmentées. Tous les microorganismes de cette catégorie sont en fin de croissance au bout du cinquième jour de culture sauf le *Monascus ruber* (n° 17) qui a le développement le plus lent.

L'estimation des paramètres de cinétique (**Figure 19B**) met en évidence des différences significatives entre certaines souches comme pour les *Aspergillus* (n° 1 à 9) qui n'auraient pas pu être discriminées uniquement en observant les variations du pourcentage de CO₂ car les courbes sont en réalité très proches.

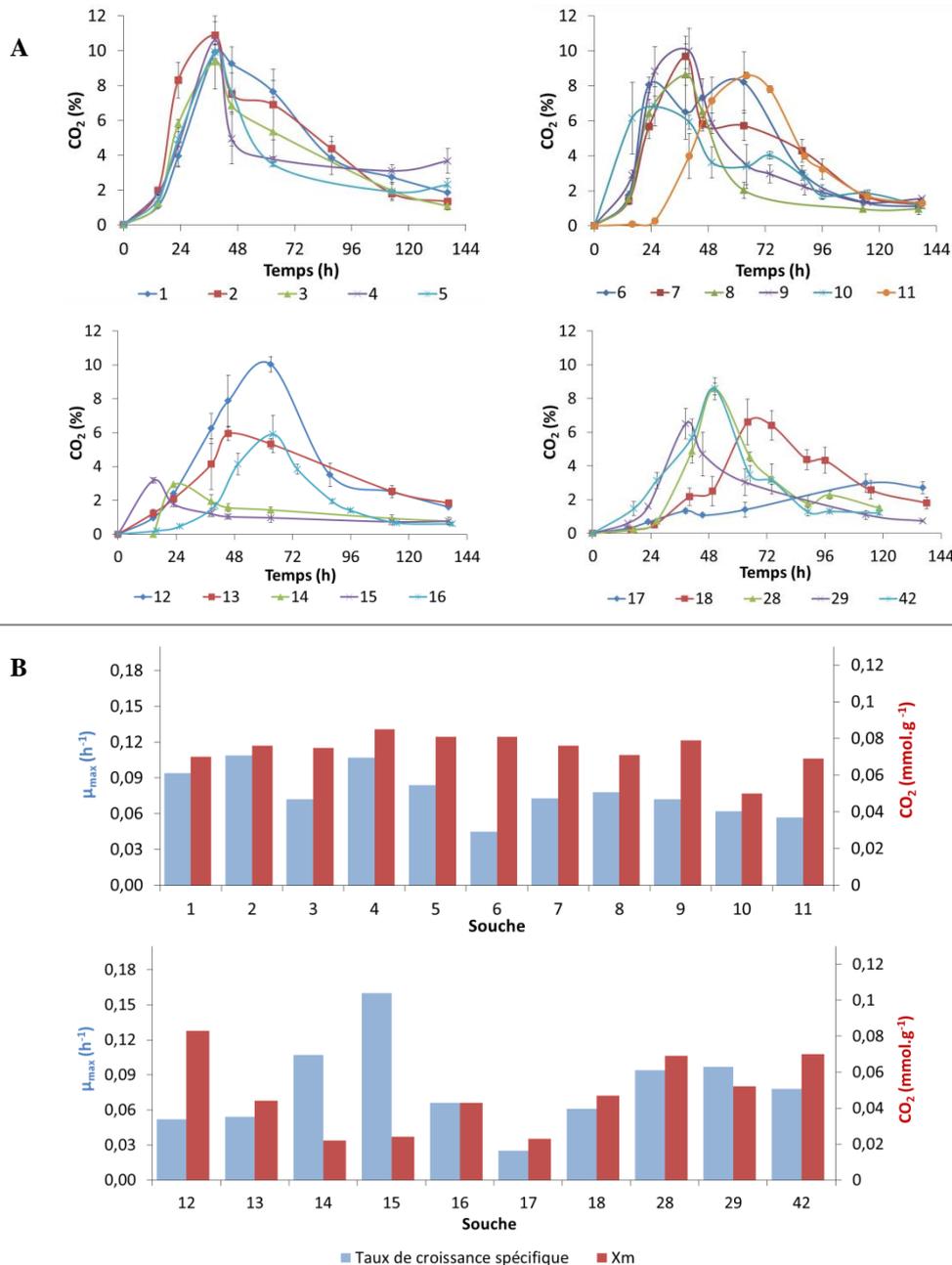


Figure 19. Dynamique de croissance des champignons inférieurs d'après les mesures de CO₂. **A** : Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B** : Paramètres de cinétique déterminés avec le modèle logistique. μ_{max} : vitesse spécifique de croissance ; X_m : quantité maximale de CO₂ produit.

La classification ascendante hiérarchique des données (CAH) permet de regrouper les souches en trois classes en effectuant une mesure de dissimilarité entre elles en prenant en compte les valeurs de μ_{max} et de X_m (**Figure 20**). Le premier groupe rassemble la majorité des souches, notamment l'ensemble des *Aspergillus*, et présente deux sous classes fusionnées qui sont proches. Il s'agit des microorganismes dont le X_m est particulièrement élevé. Le second groupe est représenté par les

Geotrichum (n° 14 et 15) caractérisés par une valeur de μ_{\max} élevé mais un X_m faible. Enfin le dernier groupe réuni les souches n° 10, 13 et 16 à 18 qui possèdent les paramètres de cinétique les plus petits.

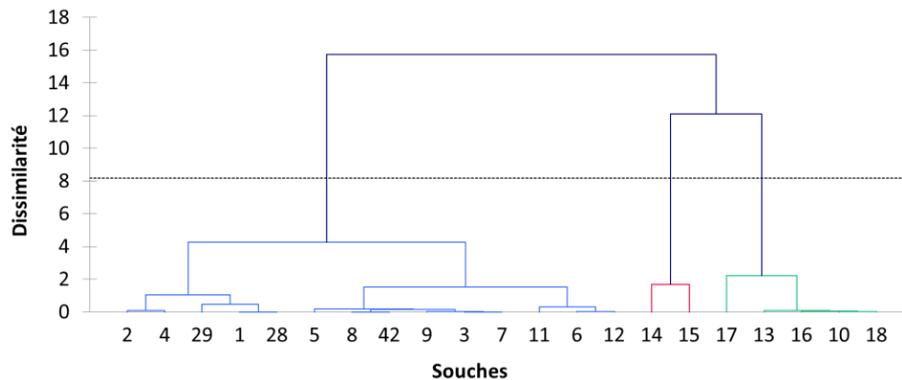


Figure 20. Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique appliquée sur les paramètres de cinétiques des champignons inférieurs. L'algorithme a identifié trois groupes homogènes en appliquant la troncature automatique. Les classes choisies pour être fusionnées sont celles dont la dissimilarité (ou indice d'agrégation) entre elles est minimale.

Les souches n° 13 à 18 sont considérées d'après les valeurs de μ_{\max} et X_m comme ayant une capacité moindre à se développer sur tourteau de colza, et sont donc éliminées pour la suite de l'étude. Le *Rhizopus oryzae* n° 10 est conservé en raison de sa rapidité à produire de la biomasse, d'ailleurs la valeur de μ_{\max} a sans doute été sous-estimée car la mesure de CO_2 a été réalisée trop tardivement pour cette souche. Une forte hétérogénéité au niveau de la croissance en milieu gélosé des précultures a été constatée à plusieurs reprises pour la souche n° 29. Cette dernière est ainsi également supprimée au profit de la n° 28 qui est la plus efficace des deux *Trichoderma* par rapport à la quantité maximale de CO_2 produit. Pour cette première série de microorganisme, il est d'ores et déjà évident que le suivi de la respiration ne constitue pas un critère suffisant car quelques souches, notamment les *Aspergillus*, sont trop proches les unes des autres pour pouvoir les différencier.

3.4.2. Croissance des *Streptomyces*

Les bactéries filamenteuses (n° 30 et 33 à 39) cultivées sur tourteau de colza sont caractérisées par un développement retardé dans le temps avec des pics de CO_2 à partir de 72h et 96h (**Figure 21A**). Une phase de latence trop longue associée à une respiration relativement limitée entraîne des valeurs assez faibles de X_m (**Figure 21B**). Bien que certaines souches soient intéressantes par rapport à leur μ_{\max} , la quantité maximale de biomasse générée est insuffisante, les *Streptomyces* sont ainsi toutes éliminées à ce stade de l'étude.

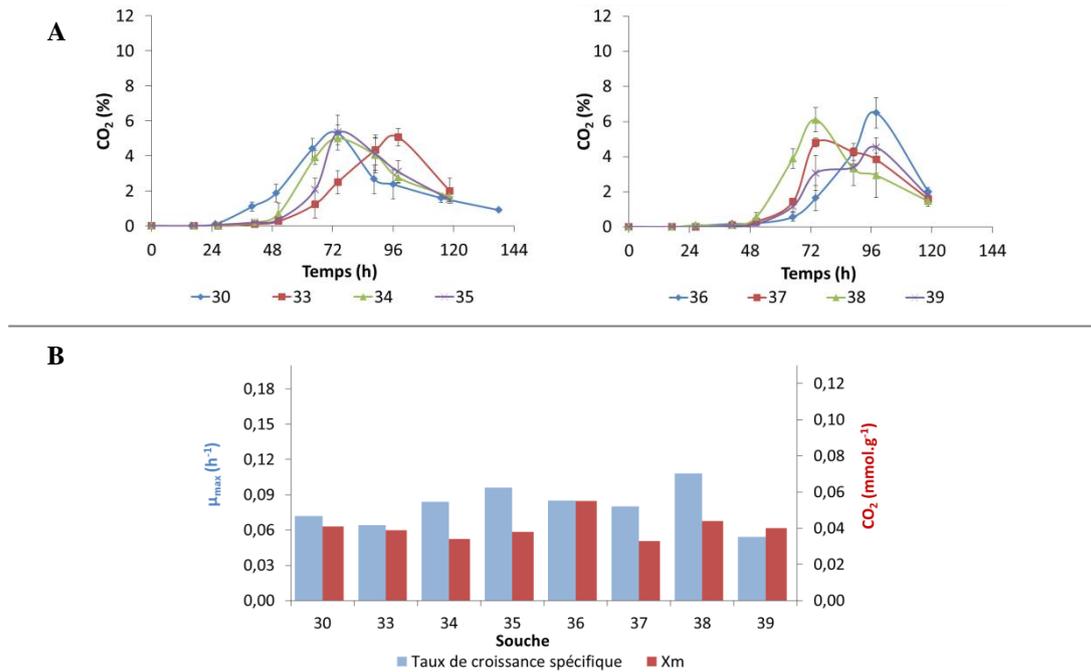


Figure 21. Dynamique de croissance des *Streptomyces* d'après les mesures de CO₂. **A** : Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B** : Paramètres de cinétique déterminés avec le modèle logistique. μ_{max} : vitesse spécifique de croissance ; X_m : quantité maximale de CO₂ produit.

3.4.3. Croissance des champignons supérieurs

Concernant la dernière catégorie de microorganismes, à savoir les champignons supérieurs, *Agaricus bisporus* (n° 27) et les deux *Trametes* (n° 40 et 41) sortent du lot avec des pourcentages de CO₂ supérieurs à 8% (**Figure 22A**). *Morchella* sp. (n° 40) est la seule à avoir un pic de CO₂ à 48h les autres souches de cette série ont des pics plus tardifs observés à 72h de culture. Les cultures sont ainsi retardées dans le temps par rapport à la plupart des champignons inférieurs. La détermination des paramètres de cinétique (**Figure 22B**) confirme cette tendance, les trois souches retenues sont d'ailleurs les seules où le mycélium apparaît comme étant le plus épais à l'œil nu. Lorsque les paramètres de cinétique sont considérés *Morchella hortensis* (n° 19) peut également être retenue car elle a été classée parmi les trois meilleures d'après la méthode de classification CAH (**Figure 23**). Deux autres souches (n° 21 et 22) faisant partie du second groupe peuvent éventuellement être conservées car elles ont des paramètres de cinétiques légèrement supérieurs aux autres membres. Un total de six champignons supérieurs est finalement sélectionné. Ce groupe de microorganisme a un comportement identique, avec une croissance nettement plus lente, par rapport aux moisissures. En effet, le temps de latence est plus long et la quantité maximale de CO₂ produit est globalement plus basse.

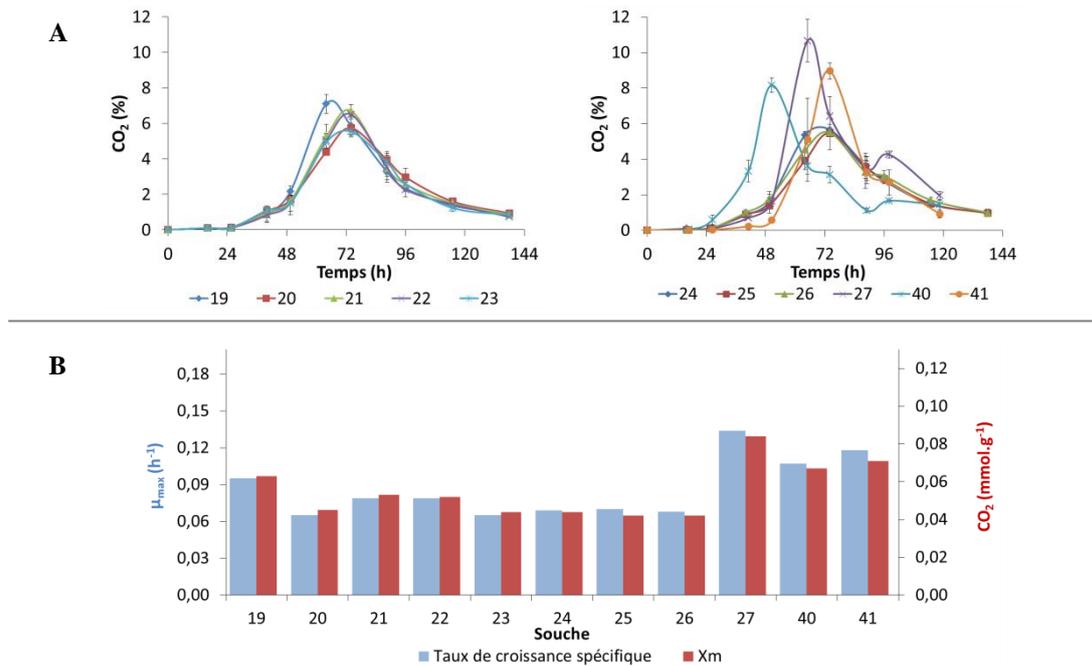


Figure 22. Dynamique de croissance des champignons supérieurs d’après les mesures de CO₂. **A** : Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B** : Paramètres de cinétique déterminés avec le modèle exponentiel. μ_{max} : vitesse spécifique de croissance ; Xm : quantité maximale de CO₂ produit.

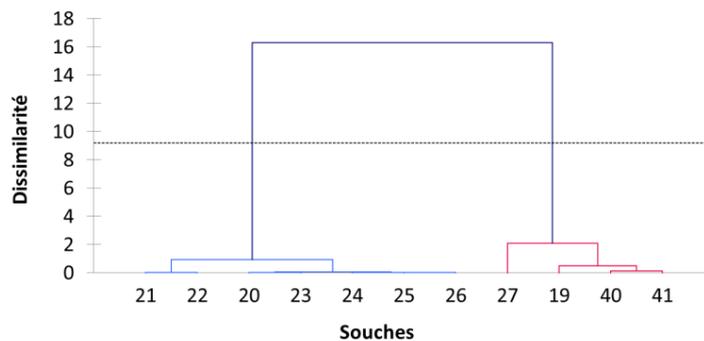


Figure 23. Dendrogramme de la classification ascendante hiérarchique appliquée sur les paramètres de cinétiques des champignons supérieurs. L’algorithme a identifié deux groupes homogènes en appliquant la troncature automatique. Les classes choisies pour être fusionnées sont celles dont la dissimilarité (ou indice d’agrégation) entre elles est minimale.

Sur les quarante souches présentes au départ de cette première phase de sélection, vingt souches ont été présélectionnées sur le critère choisi au départ c’est-à-dire la croissance des microorganismes suivant la production de CO₂. Sur ces vingt souches, quatorze moisissures et six champignons supérieurs ont été sélectionnés. Les souches restantes sont néanmoins trop proches les unes des autres suivant les résultats de l’évolution du pourcentage de CO₂ pour pouvoir les discriminer. Il est donc nécessaire d’introduire des critères supplémentaires afin d’affiner le criblage.

3.5. Deuxième phase de criblage des souches

Les critères supplémentaires retenus pour la seconde phase de sélection sont la perte de masse sèche et le contenu en protéines totales et solubles des cultures en milieu solide. La perte de masse sèche, paramètre de mesure indirecte de la croissance, est corrélée à la production de CO₂ et détermine l'efficacité du métabolisme microbien entraînant un enrichissement en protéines. L'objectif étant de rendre le tourteau de colza plus compétitif face à d'autres sources de protéines, le procédé FMS a pour but de concentrer le tourteau en protéines totales tout en augmentant leur digestibilité pour garantir une meilleure assimilation chez l'animal.

Les conditions de cultures restent identiques à la première phase de sélection. Néanmoins, en raison d'une quantité insuffisante de tourteau lot 1 seuls les champignons inférieurs sont à nouveau cultivés sur ce même lot tandis que les six champignons supérieurs sont cultivés sur le lot 2. Chaque jour, l'intégralité d'une fiole est récoltée pour les mesures de perte de masse et le dosage des protéines solubles. Les échantillons de culture sont décongelés et quatre temps de cinétique par souche sont analysés pour la détermination des protéines solubles, c'est à dire les champignons inférieurs de J1 à J4 et les champignons supérieurs de J3 à J6 car leur croissance est décalée dans le temps par rapport aux inférieurs. L'analyse est réalisée en triplicata pour un même temps de cinétique. Il en est de même pour les lots de tourteau stérilisé représentant la condition initiale à J0. La teneur en protéines totales est quant à elle appréciée par le calcul théorique qui prend en compte la perte de masse sèche relevée à chaque temps de cinétique.

3.5.1. Enrichissement en protéines obtenu avec les champignons inférieurs

L'évolution de la perte de masse sèche présente des profils variables suivant les souches (**Figure 24A**). La perte de masse sèche finale se situe entre 15 et 23% pour la plupart des souches. Parmi les *Aspergillus*, six souches (n° 2 à 4 et 7 à 9) sur les neuf occasionnent une perte supérieure à 20% en fin de culture. Le *Penicillium brasilianum* (n° 12) fait également partie de ces souches particulièrement efficaces concernant la perte de masse sèche sur tourteau de colza. Les résultats présentés ci-dessous dans la **figure 24B** montrent que certaines souches sont particulièrement performantes pour la concentration en protéines totales dès le second jour de culture notamment les *Aspergillus* (souches n° 1 à 9). En fin de fermentation, plusieurs souches atteignent un contenu en protéines totales égal ou supérieur à 47%, c'est-à-dire 10% de plus par rapport au tourteau de colza non fermenté, grâce à leur activité métabolique entraînant les pertes de masse les plus importantes.

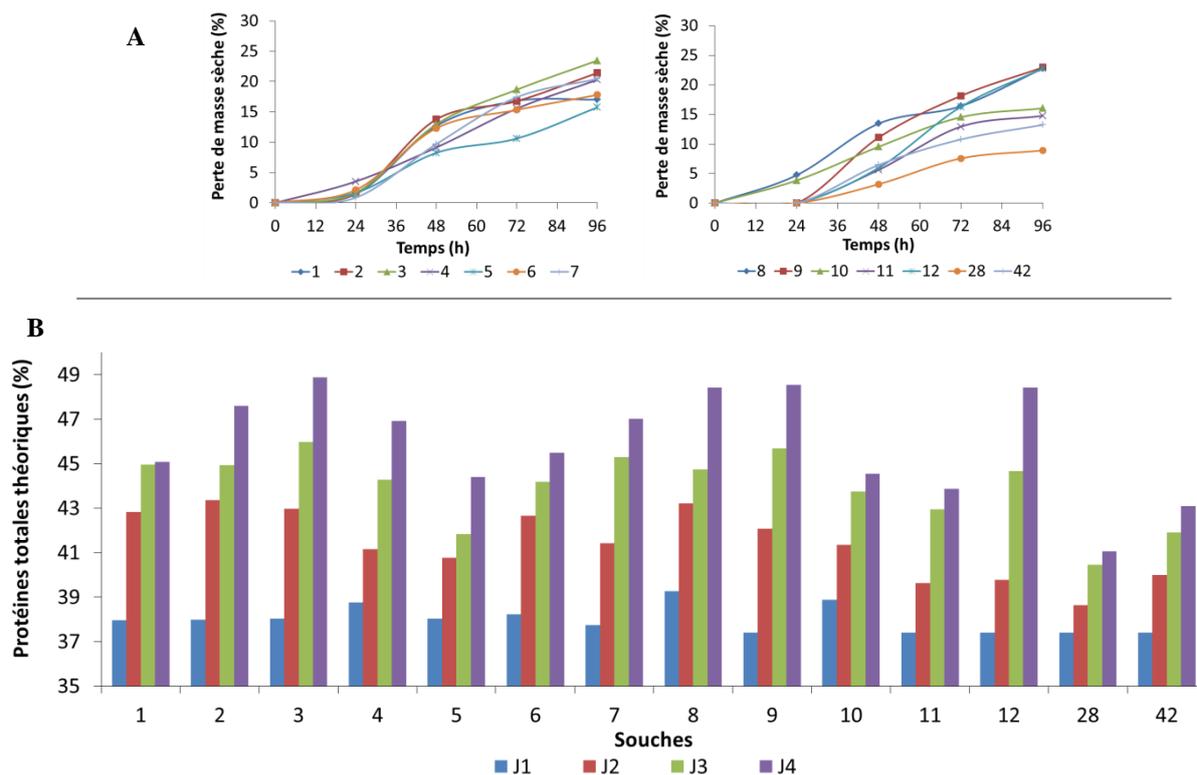


Figure 24. Enrichissement en protéines totales des cultures de champignons inférieurs suivant la perte de masse sèche sur tourteau lot 1 **A** : Evolution de la perte de masse sèche au cours du temps. **B** : Contenu en protéines totales théoriques. Le pourcentage de protéines est exprimé par rapport à la masse sèche. La teneur initiale en protéines totales du tourteau de colza lot 1 est de 37.4%.

Le comportement des microorganismes est très différent lorsque l'on considère l'enrichissement en protéines solubles au cours du temps (**Figure 25**). Les *Aspergillus*, bien qu'ayant des courbes de développement assez voisines (CO_2 et perte de masse sèche) ont sans doute des aptitudes d'hydrolyse distinctes sur tourteau de colza affectant la digestibilité des protéines au cours du temps. En effet, suivant la souche considérée les activités enzymatiques peuvent être extrêmement variables sur un même substrat et dans des conditions identiques de culture²³⁰. Les cultures avec les souches n° 11 (*Rhizopus oligosporus*) et n° 12 (*Penicillium brasilianum*) révèlent un accroissement important à J2 par rapport à la valeur de référence. Par contre, la quantité de protéines solubles chute ensuite brutalement pour la n° 11 tandis que pour la n° 12 elle est maintenue dans le temps. La baisse observée pour certaines souches pourrait être la conséquence de la production de protéases qui détruisent les protéines en cassant les liaisons peptidiques. Cette hypothèse est tout à fait plausible puisque les acides aminés, les peptides et les protéines de bas poids moléculaire (< 3000 Da) ne sont pas détectés par la méthode de Bradford²³¹. La souche n° 10 (*Rhizopus oryzae*) se distingue des autres par un enrichissement en protéines solubles particulièrement élevé (11.5%) dès le premier jour de culture ce qui est en accord avec son développement qui est en avance d'après les résultats concernant la respiration. L'activité métabolique et donc la libération de protéines solubles dans le milieu de

culture serait donc la plus importante en début de croissance au moment du pic de CO₂ représentant la fin de la phase de croissance exponentielle.

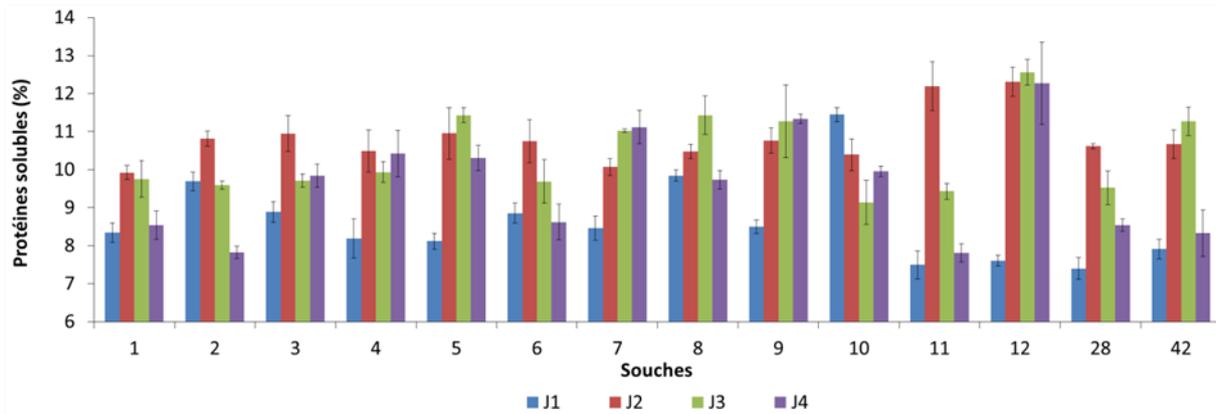


Figure 25. Contenu en protéines solubles des cultures avec les champignons inférieurs sur tourteau lot 1. Le pourcentage de protéines est exprimé par rapport à la masse sèche. La teneur initiale en protéines solubles du tourteau de colza lot 1 est de $6,26 \pm 0,48\%$.

Les souches n° 8 (*Aspergillus oryzae*) et n° 9 (*Aspergillus sojae*) sont des *Aspergillus* couramment utilisés en alimentation humaine pour l'élaboration de produits fermentés asiatiques. Les autres espèces isolées du sol n'ont pas encore été identifiées. Malgré une production massive de spores, les *Aspergillus* pourraient convenir à une application en alimentation animale. Le *Penicillium brasilianum* (n° 12) est la souche la plus intéressante des champignons inférieurs car elle permet d'obtenir d'une part, un enrichissement en protéines totales conséquent dès le troisième jour de culture et d'autre part un doublement de la fraction soluble dès le second jour sachant que celle-ci reste ensuite constante. Le *Rhizopus oligosporus* (n° 11) possède un avantage supplémentaire, celui de ne produire que très peu de spores. La production de spores par un microorganisme peut, pour l'application visée, constituer un handicap et dans ce cas, la gestion du procédé doit être parfaitement maîtrisée afin de limiter la sporulation. Ces résultats sont prometteurs car ils sont obtenus relativement rapidement (2 à 3 jours suivant les souches) à partir du tourteau de colza lot 1 dans des conditions non optimisées. Le produit fermenté est jusqu'à deux fois plus digestible en matière de protéines par rapport au tourteau de colza seul.

3.5.2. Enrichissement en protéines obtenu avec les champignons supérieurs

Le développement des champignons supérieurs est différent du premier crible qui a été effectué avec le premier lot de tourteau. Seules quatre souches sur les six ont pu se développer, il s'agit de *Morchella hortensis* (n° 19), *Agaricus bisporus* (n° 27) et les deux *Trametes versicolor* (n° 21 et 41). Sachant que les inoculums de *Morchella* sp. (n° 40) et *Pleurotus ostreatus* (n° 22) n'ont présenté aucune anomalie lors de leur vérification par des étalements sur milieu gélosé, l'inhibition de la croissance est par conséquent certainement liée au deuxième lot de tourteau de colza. Certains

champignons supérieurs auraient donc plus de difficultés à se développer sur ce nouveau lot. L'étude de l'évolution de la perte de masse sèche montre que la croissance est décalée dans le temps et les cultures avec les souches n° 27 et 41 ont la perte de masse la plus importante (**Figure 26A**). La tendance observée au niveau des protéines totales n'est pas surprenante en ce qui concerne les cultures avec champignons supérieurs (**Figure 26B**). Le pourcentage est le plus élevé avec *Agaricus bisporus* (n° 27) et *Trametes versicolor* (n° 41) compte tenu d'une perte de masse sèche plus importante.

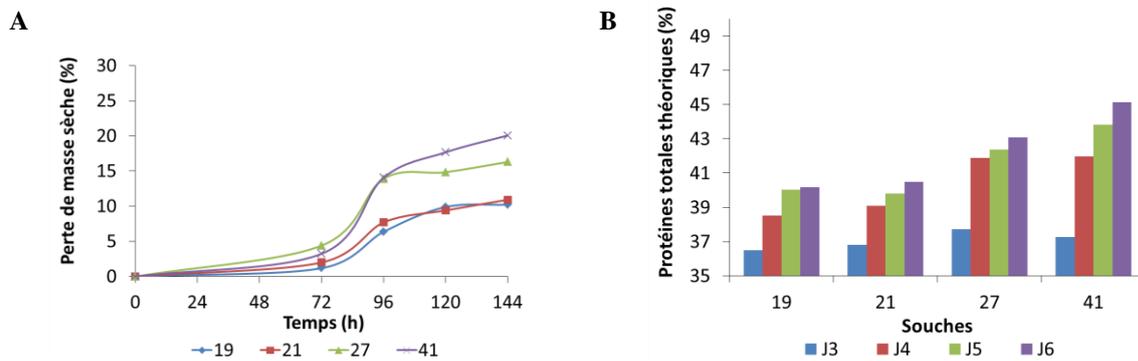


Figure 26. Enrichissement en protéines totales des cultures de champignons supérieurs suivant la perte de masse sèche sur tourteau lot 2 **A** : Evolution de la perte de masse sèche au cours du temps. **B** : Contenu en protéines totales théoriques. Le pourcentage de protéines est exprimé par rapport à la masse sèche. La teneur initiale en protéines totales du tourteau de colza lot 2 est de 36.07%.

Le contenu en protéines solubles est deux fois moindre pour le second lot de tourteau de colza comme constaté précédemment en utilisant la méthode avec la salive artificielle (**Figure 27**).

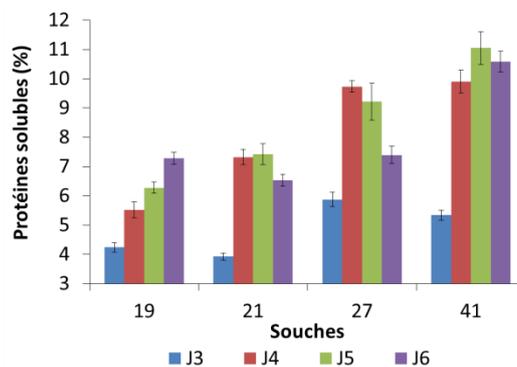


Figure 27. Contenu en protéines solubles des cultures avec les champignons supérieurs sur tourteau lot 2. Le pourcentage de protéines est exprimé par rapport à la masse sèche. La teneur initiale en protéines solubles du tourteau de colza lot 2 est de $3,35 \pm 0,16\%$.

La souche n° 41 affiche le meilleur score avec un triplement de la quantité de protéines solubles après quatre jours de culture. Cet accroissement est plus élevé que le maximum observé pour les champignons inférieurs sur tourteau lot 1. Il faut toutefois rester prudent car les compositions ne sont pas les mêmes entre les deux tourteaux. Le second lot présente des quantités plus faibles en nutriments disponibles, surtout en source d'azote. Les souches ayant les activités métaboliques les plus adaptées seraient privilégiées. Cette hypothèse a déjà été évoquée lors de l'essai mené avec

Aspergillus niger dans la partie 3.3.2. de ce chapitre. L'activité enzymatique serait plus importante et mieux adaptée pour les souches n° 27 et 41. Cela se traduit par une augmentation supérieure des protéines solubles par rapport aux deux autres souches. Bien que les souches n° 21 et 41 soient toutes les deux des *Trametes versicolor*, leur efficacité n'est pas la même. Les quatre souches testées semblent produire moins de protéases par rapport aux champignons inférieurs car le pourcentage de protéines solubles reste plus stable au cours du temps. En revanche les valeurs maximales sont obtenues avec deux à trois jours de décalage par rapport aux moisissures cultivées sur lot 1. Ce laps de temps n'est pas négligeable pour un procédé FMS, mais il est important de préciser que le lot utilisé n'est pas le même et ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la composition du tourteau a un impact conséquent suivant la souche considérée.

Finalement quatre champignons supérieurs peuvent uniquement être retenus du fait des résultats obtenus sur le second lot de tourteau qui est plus faible en azote et en matière grasse. Bien que les lots de tourteaux ne soient pas identiques entre les deux catégories de microorganismes, les résultats concernant l'ensemble des microorganismes sont pertinents sur ces nouveaux critères. Les champignons inférieurs ont également été cultivés sur le second lot de tourteau, les résultats qui figurent dans le chapitre III de ce manuscrit valident le choix des microorganismes et leur capacité à se développer sur les deux lots de tourteau.

4. Conclusion

La première partie de ce chapitre a permis de caractériser le tourteau de colza comme substrat pour le procédé de fermentation en milieu solide. En dehors de sa composition qui lui est propre, ses propriétés physicochimiques exercent un rôle essentiel pour mener à bien le procédé FMS. Comparativement au son de blé, un substrat particulièrement intéressant, la granulométrie du tourteau de colza et la présence de matière grasse jouent en sa défaveur. Bien qu'il ait la capacité de gonfler une fois humidifié, sa granulométrie et sa viscosité peuvent occasionner des phénomènes de compaction qui seront d'autant plus marqués lors du changement d'échelle impliquant une augmentation de la hauteur de couche. En ce qui concerne sa composition, des écarts considérables sont observés par rapport au soja autant sur le contenu en protéines totales que solubles déterminées avec une extraction au KOH. L'enrichissement en protéine *via* le procédé FMS représente ainsi une opportunité pour réduire ces différences.

La mise en place d'un criblage de souche implique la sélection d'un certain nombre de critères concernant la croissance des microorganismes et leur capacité à enrichir le tourteau de colza en protéines. La croissance microbienne, difficile à mesurer en FMS, est estimée à partir de l'évolution de la respiration et de la perte de masse sèche obtenus avec un *Aspergillus niger* utilisé comme organisme modèle. La détermination de la perte de masse sèche est d'ailleurs primordiale car elle est étroitement

liée à la concentration en azote protéique totale. Malgré les imperfections propres à l'utilisation de la fiole Erlenmeyer, notamment liées à des pertes de gaz non comptabilisables, le profil de croissance a pu être établi en estimant les quantités de CO₂ produit. La corrélation avec la perte de masse sèche démontre que cette appréciation est pertinente pour décrire la croissance du microorganisme. En plus d'être corrélées, ces deux variables sont relativement simples et rapides à mesurer dans le cadre d'un criblage. Cette méthodologie avantageuse devra être comparée avec un système de mesure en ligne. La modélisation appliquée aux profils de croissance représente un outil supplémentaire dans la mesure où il permet de déterminer les paramètres de cinétique. Le modèle logistique est le plus approprié pour décrire la croissance des microorganismes au cours du temps sur les données relatives à la quantité de CO₂ produit. La vitesse spécifique maximale de croissance propre à chaque microorganisme ainsi que la biomasse maximale associée sont des critères de sélection importants à considérer dans le cadre d'un criblage de souche pour les différencier dans des conditions de culture identiques.

Les premiers essais de culture à partir des quarante souches ont montré la faisabilité d'un procédé FMS sur tourteaux de colza en présence de champignons inférieurs, supérieurs et de bactéries filamenteuse (*Streptomyces*). La première phase de sélection des souches qui prend uniquement en compte les performances en matière de croissance a permis d'éliminer la moitié des souches présentes au départ de l'étude. La seconde phase de sélection focalisée notamment sur l'évolution du contenu en protéines totales donne des résultats prometteurs. En effet, les pourcentages obtenus après fermentation se rapprochent sensiblement de la valeur affichée par le tourteau de soja brut (45%). Un gain de plus de 10% par rapport à la valeur de départ a été obtenu pour les meilleures souches avec un total de 48% de protéines pour le lot 1 à 4 jours de cultures avec les *Aspergillus* (n° 3,8 et 9) et le *Penicillium* (n° 12) et 45% pour le lot 2 après 6 jours de culture avec le *Trametes* (n° 41). Lors de cette seconde phase de sélection le lot de tourteau a dû être modifié pour les champignons supérieurs. Ce changement implique des différences de croissance et de performance en matière d'enrichissement en protéines qui ont préalablement été mis en évidence avec la souche *A. niger*. Le pourcentage de protéines solubles, critère supplémentaire indiquant la qualité nutritionnelle des tourteaux, est particulièrement affecté par les traitements thermiques qui peuvent être plus ou moins intenses lors du procédé de trituration des graines de colza. La solubilisation peut cependant être améliorée sous l'action d'enzymes hydrolytiques sécrétées par les microorganismes fongiques qui vont libérer les protéines en dégradant les fibres. Le métabolisme microbien est mis à rude épreuve pour dégrader davantage la matrice solide et assurer le développement de la souche puisque la teneur initiale en azote digestible est pauvre particulièrement dans le second lot de tourteau. Les microorganismes n'ont cependant pas les mêmes capacités et certains champignons supérieurs n'ont pas pu s'adapter à cette nouvelle composition. La quantité de protéines digestibles a toutefois pu être doublée sur le lot 1 avec les champignons inférieurs et triplée sur le lot 2 avec le *Trametes* (n° 41). L'efficacité n'est cependant pas la même car la teneur en protéines solubles n'est pas maintenue constante au cours du temps sans

doute en raison de la présence de protéases pour certaines souches. Comparativement aux tourteaux non stérilisés, si le résultat est fondé sur un doublement des protéines solubles après fermentation le tourteau de colza passerait de 13% à 26%, sachant que le soja est à 32%. Là encore les deux produits seraient équivalents concernant la digestibilité des protéines basée sur l'extraction au KOH.

Malgré ces résultats très encourageants, sur le plan économique, le seul enrichissement en protéines totales et solubles ne sera pas suffisant car l'écart d'environ 100 € par tonne entre les tourteaux de colza et de soja est faible pour justifier de la mise en place d'un procédé de fermentation. De ce fait, il est nécessaire d'ajouter une valeur supplémentaire au produit et donc la recherche d'activités biologiques d'intérêt capables d'améliorer les performances en zootechnie. Dans l'optique d'une application industrielle, plusieurs avantages et inconvénients peuvent d'ores et déjà être mis en évidence pour l'utilisation future des champignons inférieurs et supérieurs. Les avantages concernant les inférieurs sont nombreux. Ils se développent rapidement y compris sur un substrat à l'origine contaminé en limitant la croissance de ces derniers. Quelques-unes de ces souches sont couramment utilisées pour l'élaboration de produits fermentés. La production de spores représente un atout pour leur conservation et la préparation des inoculums. Mais ces spores peuvent être rapidement produites en grande quantité et leur propriété très volatile rend le procédé de fermentation plus difficile à maîtriser. En effet, la fermentation devra impérativement être stoppée avant la sporulation sachant que l'enrichissement en protéines et éventuellement en molécules d'intérêt devra à ce moment-là être satisfaisant par rapport aux objectifs fixés. L'inconvénient majeur des champignons supérieurs est leur développement qui est généralement beaucoup plus lent par rapport aux moisissures les rendant également plus vulnérables à une possible contamination. Cela signifie qu'au niveau industriel il sera nécessaire de maîtriser parfaitement l'étape de l'inoculation afin d'éviter une introduction de contaminants dans le milieu de culture.

Parmi les composés ou activités biologiques d'intérêt issus de microorganismes répertoriés dans la littérature, les immunomodulateurs sont particulièrement attrayants en raison de leur caractère innovant pour une application en alimentation animale par rapport à d'autres apports bénéfiques plus connus (enzymes, acides organiques, probiotiques, etc.). Le rôle des polysaccharides fongiques dans le développement des réponses immunitaires des animaux d'élevage est reconnu. Les activités immunomodulatrices n'ont manifestement été que très rarement recherchées chez les champignons inférieurs. Les supérieurs sont en revanche largement réputés pour leurs effets pharmacologiques à travers l'étude des β -glucanes. Mais aucune de ces catégories de microorganisme n'a été pour le moment cultivée par FMS dans l'optique d'élaborer un aliment fonctionnel destiné à améliorer la santé des animaux et les performances en zootechnie.

CHAPITRE III

RECHERCHE D'UNE ACTIVITÉ BIOLOGIQUE D'INTÉRÊT

1. Introduction

La bioconversion des tourteaux par fermentation en milieu solide représente une alternative prometteuse pour améliorer leur valeur nutritionnelle et obtenir des produits à valeur ajoutée destinés à la nutrition animale, particulièrement concernant la teneur en protéines et vitamines avec une digestibilité considérablement améliorée^{77,136,232}. Cependant, en raison de l'abondance des sources de protéines végétales sur le marché à des prix compétitifs, les produits fermentés doivent apporter des bénéfices supplémentaires¹⁷⁰. Aujourd'hui l'alimentation animale ne compte pas seulement répondre aux besoins nutritionnels des animaux mais aussi aux attentes en matière de sécurité sanitaire, de rendement et qualité des productions issues de l'élevage, du bien-être de l'animal, du respect de l'environnement et des pratiques d'élevage durables.

Depuis des siècles, les champignons sont considérés comme des sources naturelles de composés bioactifs pour le traitement de diverses maladies. Plusieurs composés majeurs à activité immunomodulatrice et/ou anti tumorale ont été isolés d'espèces comestibles comme *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Trametes versicolor* et *Lentinus edodes*. La plupart des souches étudiées dans la littérature scientifique sont populaires et relèvent de la pharmacopée traditionnelle asiatique. Les substances actives identifiées sont principalement des polysaccharides, en particulier des β -glucanes, qui font partie intégrante des parois des microorganismes fongiques. Jusqu'à présent les activités immunomodulatrices ont uniquement été étudiées à partir des levures et des champignons supérieurs, par conséquent le potentiel des champignons inférieurs (moisissures) reste à explorer. L'activation du système immunitaire a été démontrée à partir d'extraits fongiques bruts ou des composés isolés et purifiés comme les β -glucanes. Des essais *in vitro* et *in vivo* permettent de caractériser les effets principaux sur le système immunitaire impliquant la prolifération, la différenciation et l'activité d'une grande variété de cellules immunitaires productrices de cytokines¹⁶. La sécrétion de l'interleukine pro-inflammatoire 1 (IL-1 β), principalement étudiée chez les mammifères (homme et souris)^{16,173,233} et plus rarement dans le modèle aviaire (poulet)^{234,235}, est particulièrement influencée suite à un traitement par des β -glucanes fongiques. Ces derniers sont capables de se lier directement à des récepteurs cellulaires spécifiques présents à la surface des cellules dendritiques, monocytes, macrophages et neutrophiles entraînant une cascade de signalisation qui déclenche la réponse immunitaire innée et adaptative^{160,165}.

Suite à l'interdiction européenne d'utiliser des antibiotiques en tant que facteur de croissance, les immunomodulateurs naturels suscitent actuellement un intérêt croissant et leur application en alimentation animale s'intensifie avec la commercialisation de divers additifs à base de β -glucanes de levure. Ces composés sont obtenus par fermentation en milieu liquide avec des milieux synthétiques ou solide sur biomasse végétale nécessitant un temps de culture relativement long pour obtenir les carpophores dans le cas des champignons supérieurs²³⁶. Très peu d'études s'intéressent à la production de ces substances bioactives (glycoprotéines²³⁷, β -glucanes¹⁶⁵ et exopolysaccharides²³⁸)

chez les champignons inférieurs qui sont pourtant couramment utilisés en alimentation²³⁹. Aussi, peu d'informations ont été publiées concernant la production de polysaccharides par FMS à partir de résidus naturels bon marché comme le tourteau de colza¹³⁸. Quelques travaux ont toutefois été effectués avec des champignons supérieurs médicinaux (*F. velutipes*, *H. erinaceum* et *G. frondosa*) pour la production de mycélium et de polysaccharides sur divers résidus agroindustriels. Les extraits issus de ces cultures permettent d'induire une activité immunomodulatrice significative chez les macrophages et les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)^{183,184,188}. A ce jour, les propriétés immunomodulatrices du tourteau de colza fermenté n'ont pas été recherchées malgré l'éventualité de convertir ce sous-produit d'oléagineux en aliment fonctionnel pouvant améliorer la santé des animaux et donc leur performance de croissance. Des chercheurs ont toutefois évalué le taux de production de certains polysaccharides par FMS, notamment des complexes formés de chitosanes et de glucanes par des souches du genre *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* et *Rhizopus*¹⁹⁰ ainsi que la production de pullulane avec *A. pullulans* sur divers résidus lignocellulosiques¹⁹². Dans les deux cas le procédé biotechnologique s'est avéré avantageux après optimisation en matière de rendement et de coûts avec en prime la possibilité de valoriser les déchets verts utilisés comme substrat de culture en milieu solide. Les essais réalisés démontrant une activité biologique à partir d'extraits de cultures issus du procédé FMS sont extrêmement limités. Les effets sur cellules immunitaires ont été rapportés pour des souches du genre *Aspergillus* et *Monascus* cultivées sur son de riz¹⁹³ et *Morchella esculenta* sur des résidus de soja¹⁹⁴.

Dans ce chapitre, la recherche d'une activité immunomodulatrice à partir de cultures FMS a été réalisée *in vitro* en utilisant plusieurs cellules cibles du système immunitaire. Des produits commerciaux concentrés en β -glucanes de levure ainsi que le tourteau de colza ont systématiquement été inclus à chaque test afin de déterminer et de comparer les éventuels effets pharmacologiques. Le contenu en β -glucanes des échantillons a été déterminé en parallèle pour vérifier s'il existe bien un lien entre ce composé bioactif et la réponse immunitaire associée. Une première phase de sélection à partir des 18 souches restantes du précédent chapitre est d'abord effectuée en utilisant comme modèle le neutrophile sanguin avec un test rapide au NBT permettant une détermination des niveaux d'activation cellulaire. Des extraits de mycélium sont également utilisés dans le but d'obtenir des échantillons davantage concentrés en biomasse fongique et de confirmer les effets sur l'activité métabolique des cellules. L'activité immunomodulatrice des souches sélectionnées est ensuite évaluée à partir de deux modèles cellulaires, à savoir les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM). Une étude de cytotoxicité ainsi que la recherche du profil de modulation de la cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine IL-1 β , par les cellules stimulées par une endotoxine inflammatoire (LPS) sont effectuées pour chacun des modèles.

L'activité antimicrobienne, axe secondaire dans la recherche d'une activité biologique d'intérêt, a également été recherchée pour les extraits de cultures FMS en utilisant des souches pathogènes du poulet. L'activité antimicrobienne n'est pas forcément liée à la présence de métabolites secondaires, comme les antibiotiques qui sont interdits, mais peut être provoquée par une acidification *via* la synthèse d'acides organiques ou la présence de peptides bioactifs tels que les défensines. Cette voie a finalement été abandonnée en raison de l'absence de résultats probants et du cadre réglementaire obscur pour une application en alimentation animale (**Annexe 2**).

2. Matériels et méthodes

2.1. Cultures des microorganismes

2.1.1. Cultures FMS sur tourteau de colza

Les cultures en milieu solide sont réalisées en fiole Erlenmeyer strictement dans les mêmes conditions que celles effectuées dans le chapitre précédent (cf. chapitre II, partie 2.1.2.). Le tourteau lot 2 est utilisé comme substrat FMS. Des mesures de CO₂ ont été effectuées pour suivre la croissance des microorganismes. Suivant les essais réalisés les cultures sont arrêtées à différents moments. Les prélèvements (témoin et cultures), sont immédiatement mis en séchage 24h à 105°C à l'étuve dans des boîtes de Pétri en verre puis broyés en fine poudre (< 0.5 mm) au mortier sous hotte à flux laminaire pour éviter tout risque de contamination. Les échantillons secs sont ensuite conservés dans des pots stériles à température ambiante et à l'obscurité. Avant les essais de détermination de l'activité immunomodulatrice, des étalements sur gélose non sélective PCA et sur milieux favorables à la croissance de chaque microorganisme (cf. chapitre II, **Tableau 11**, partie 2.1.1.) sont systématiquement exécutés pour détecter d'éventuels contaminants et vérifier l'inactivation des souches fongiques. La présence de microorganismes viables peut en effet donner lieu à des faux positifs. Etant donné que le futur produit fermenté ne doit pas contenir de souches viables, le séchage à 105°C représente un moyen de les désactiver.

2.1.2. Production de mycélium en milieu liquide

Les cultures sont effectuées en fiole Erlenmeyer à baffle de 250 mL contenant le milieu PDB (Potato Dextrose Broth) supplémenté en extrait de levure à 2 g.L⁻¹. Les fioles sont incubées à 25°C à l'obscurité et mises sous agitation à 120 rpm dans un incubateur CH-4103 (Infors HT). Comme pour les cultures en milieu solide, l'inoculum est issu des précultures en fiole de Roux. La biomasse est

récoltée après 2 à 10 jours de culture suivant la souche (avant la sporulation) et centrifugée 10 minutes à 1250 g en effectuant successivement trois cycles de rinçage avec de l'eau osmosée stérile. Les échantillons sont ensuite étalés en couche mince et séchés à l'étuve pendant 12h à 105°C dans des boîtes de Pétri en verre avant d'être broyés en fine poudre (< 0.5 mm) au mortier. L'absence de contaminant et la désactivation des souches sont systématiquement vérifiées dans chacun des échantillons secs avec des étalements sur milieux gélosés comme pour les cultures en milieu solide.

2.2. Détermination du contenu en β -glucanes

La quantification des β -glucanes a été effectuée en utilisant un kit de dosage des β -glucanes spécifique aux levures et champignons (Megazyme). La méthode est basée sur la libération du glucose par une hydrolyse enzymatique après une première étape de solubilisation dans de l'acide chlorhydrique concentré. Les valeurs des contrôles, des échantillons de culture FMS et de mycélium sont exprimées en pourcentage moyen de β -glucanes (g/100 g sec) par rapport à la masse sèche de chaque produit \pm écart-type.

2.3. Activités immunomodulatrices

2.3.1. Test de réduction du nitrobleu de tétrazolium (NBT)

L'activité immunomodulatrice est évaluée à l'aide d'un kit au NBT (Nitro Blue Tetrazolium Reduction kit, Sigma). La méthode a été détournée de son utilisation première, c'est-à-dire le diagnostic rapide *in vitro* pour l'identification d'un dysfonctionnement des neutrophiles ou d'une infection chez l'homme. En présence d'un agent stimulant (bactéries, toxines, particules de latex et verre, parois de levure etc.), tel que l'extrait bactérien non viable fourni par le kit, les globules blancs s'activent et génèrent des dérivés réactifs de l'oxygène, notamment l'anion superoxyde, entraînant la réduction du NBT qui précipite dans la cellule sous forme de formazan. Un examen microscopique permet ensuite de déterminer le pourcentage de globule blanc activé, c'est à dire les cellules présentant les dépôts intra cytoplasmiques insolubles de formazan. Les échantillons de sang de l'EFS (Etablissement Français du Sang) ont été prélevés chez des donneurs sains dont la numération des leucocytes a été validée. Le sang hépariné est incubé avec une solution tamponnée de NBT en présence des extraits à tester, un frottis sanguin est réalisé puis coloré avec le colorant de Wright. Ce frottis est ensuite observé au microscope à l'aide d'un objectif à immersion, un total de 100 neutrophiles est compté trois fois par lame pour davantage de précision. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de neutrophiles activés \pm écart-type.

Afin d'obtenir une stimulation des neutrophiles, les extraits à tester doivent être suffisamment concentrés comme c'est le cas du stimulant bactérien fourni par le kit. Les extraits de culture FMS, de

mycélium ainsi que le tourteau de colza seul sont préparés à une concentration de 250 mg.mL^{-1} avant l'incorporation dans le sang dans les conditions stimulées du test NBT. Le tourteau de colza est stérilisé pour garantir l'absence de contaminants. Chaque extrait est obtenu après un broyage 30 secondes à 9500 rpm des échantillons secs en présence d'une solution physiologique stérile (NaCl à 9 g.L^{-1}) à l'aide de l'Ultra-turrax. La concentration finale dans le sang s'élève à 8 mg.mL^{-1} , ainsi les particules des échantillons sont nettement visibles sur les frottis sanguins. Des préparations à base de β -glucanes de levure de la souche *S. cerevisiae* sont également testées à différentes concentrations dans le sang (0 à $100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), il s'agit du zymosane A (Sigma) et du β -Glucane de levure (Megazyme).

2.3.2 Isolation, culture et traitement des cellules immunitaires : PBMC et BMDM

L'ensemble des essais impliquant les cultures cellulaires a été réalisé au sein de la société Cohiro. Ces essais comportent l'étude de cytotoxicité et la modulation de la production d'interleukine IL-1 β par les deux types de leucocytes étudiés (PBMC et BMDM).

○ Cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC)

A partir d'une poche de couche leucocytaire humaine provenant de l'EFS, la séparation des cellules mononucléées sanguines (lymphocytes et monocytes) de donneurs sains est obtenue par centrifugation sur Ficoll de densité égale à 1.077 g.mL^{-1} . L'anneau opalescent contenant les cellules mononucléées est récupéré soigneusement. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS (tampon phosphate salin) par centrifugation à $+4^\circ\text{C}$. Après numération des cellules viables, 1.10^5 cellules sont ensemencées dans chaque puits de plaques 96 puits à fond rond dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) + 10% SVF (Sérum de Veau Fœtal) + 1% Glutamine + 1% PSA (Pénicilline, Streptomycine et Amphotéricine B).

Le traitement des cellules par les produits issus des cultures de microorganisme ou par les références internes anti-inflammatoires a été réalisé à l'ensemencement des cellules ainsi que la stimulation par une endotoxine, le LPS (Lipopolysaccharides extrait de *Escherichia coli*, souche 0128:B12). La série d'essai comprenant des témoins, c'est-à-dire trois produits commerciaux riches en β -glucanes de levure (β -Glucane Megazyme, MacroGard et ImmunoWall) ainsi que le tourteau de colza seul ont été testés à des concentrations allant de 0.007 à 0.25 mg.mL^{-1} dans le milieu de culture cellulaire. Les extraits de mycélium et des cultures FMS d'*A.sojae* et de *T. versicolor* ont quant à eux été testés à des concentrations allant de 0.125 à 1 mg.mL^{-1} . Uniquement la fraction soluble avec des fines particules est mise en contact avec les PBMC en raison de la sensibilité des cellules en présence de particules. Les échantillons sous forme de poudres solides sont d'abord homogénéisés pendant 20 minutes dans du milieu de culture sous agitation magnétique, puis agités à l'aide d'un vortex avant

d'être laissés à décanter pendant 2 minutes pour la récupération du surnageant exempt des plus grosses particules. Deux références internes anti-inflammatoires ont systématiquement été testées pour valider les essais : ZVAD (inhibiteur pan-caspase, ciblant plusieurs caspases simultanément) à la concentration de 5 μM et PRED (prednisolone, corticostéroïde) à la concentration de 100 μM . Le LPS a été utilisé à la concentration de 10 ng.mL^{-1} . Les surnageants cellulaires ont été récupérés le lendemain (17h30 post-LPS) puis congelés à -20°C afin de réaliser ultérieurement le dosage des IL-1 β . Un test de viabilité cellulaire utilisant le XTT a été réalisé sur le tapis cellulaire.

- Macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM)

Les cellules de moelle osseuse sont prélevées au niveau des fémurs et tibias des pattes arrières de souris saines Balb/c. Après numération, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) + 10% SVF (Sérum de Veau Fœtal) + 1% Glutamine + 1% PSA (Pénicilline, Streptomycine et Amphotéricine B) + 50 ng.mL^{-1} MCSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor). Après 5 jours d'incubation, les cellules différenciées en macrophage sontensemencées en plaque de 96 puits.

Une nuit après l'ensemencement, les BMDM sont traités avec les différents produits complets (témoins et extraits de culture FMS) ou les références internes anti-inflammatoires. La stimulation par une endotoxine (Lipopolysaccharides extrait de *Escherichia coli*, souche 0128:B12) a été réalisée 24h après le traitement. Les échantillons testés dans la série comprenant les témoins sont les trois produits commerciaux riches en β -glucanes de levure (β -Glucane Megazyme, MacroGard et ImmunoWall) ainsi que le tourteau de colza seul. Deux extraits de culture FMS ont également été testés avec la souche *A. sojae*. Un des échantillons a été prélevé le 3^e jour de culture tandis que le second a été prélevé le 7^e jour de culture. Tous les produits sont testés à quatre concentrations (0.001 – 0.01 – 0.1 et 1 mg.mL^{-1}) dans le milieu de culture cellulaire. Chaque échantillon sous forme d'une poudre solide est préalablement homogénéisé dans du milieu de culture cellulaire pendant 20 min sous agitation magnétique puis agité à l'aide d'un vortex avant l'incorporation aux BMDM. Trois références internes anti-inflammatoires ont systématiquement été testées pour valider les essais : ZVAD (inhibiteur pan-caspase, ciblant plusieurs caspases simultanément) à la concentration de 5 μM , PRED (prednisolone, corticostéroïde) à la concentration de 70 μM et DEXA (dexaméthasone, corticostéroïde) à la concentration de 1 μM . Le LPS a été utilisé à la concentration de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Une journée après le traitement au LPS, les surnageants cellulaires ont été récupérés puis congelés à -20°C afin de réaliser ultérieurement le dosage des IL-1 β . Un test de viabilité cellulaire utilisant le XTT a été réalisé sur le tapis cellulaire.

2.3.3. Cytotoxicité

Le XTT, dérivé du tétrazolium, permet de mesurer l'activité métabolique de cellules vivantes en culture. Le XTT est réduit par les déshydrogénases mitochondriales ou extra-mitochondriales des cellules vivantes actives en un composé orange hautement soluble dans l'eau. La quantité de composé réduit formé est proportionnelle à la quantité de cellules actives métaboliquement et quantifiée en mesurant l'absorbance à 490 nm avec une contre lecture à 660 nm pour éliminer le bruit de fond. L'appareillage utilisé pour cette mesure est un lecteur de multiplaque (Infinite 200M Pro, Tecan). Le pourcentage de viabilité cellulaire est déterminé par rapport au contrôle (milieu de culture) représentant 100% de viabilité cellulaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de viabilité cellulaire \pm erreur standard par rapport à la moyenne.

2.3.4. Dosage des IL-1 β

L'IL-1 β est dosée par méthode immunoenzymatique en sandwich (kit ELISA, eBioscience). Les puits d'une plaque 96 puits sont recouverts d'un anticorps de capture. Après ajout du surnageant de culture cellulaire, l'antigène (IL-1 β) va se lier à l'anticorps de capture. Un anticorps de détection est ajouté et se lie à l'antigène. Un anticorps secondaire lié à une enzyme streptavidine-HRP est ajouté et se lie à l'anticorps de détection. Une fois le substrat enzymatique ajouté, celui-ci est converti par l'enzyme en une forme colorée quantifiable en mesurant l'absorbance à 450 nm (Infinite 200M Pro, Tecan). Le LPS, additionné à une concentration non cytotoxique induit la production d'IL-1 β chez les PBMC et les BMDM. La quantité d'interleukine est exprimée en picogramme (pg) par millilitre de surnageant cellulaire et en valeur moyenne \pm erreur standard par rapport à la moyenne.

2.4. Traitement des données

Les différentes analyses statistiques des résultats ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT Base version 2017 (Addinsoft). Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) est utilisée pour comparer les moyennes entre plusieurs échantillons. Un test de comparaisons multiples, le test de Dunnett, est appliqué dans le cas d'une comparaison d'un groupe d'échantillon par rapport à un groupe contrôle. Les différences ont été considérées comme significatives pour un risque $\alpha \leq 5\%$.

3. Résultats et discussion

3.1. Activation des neutrophiles du sang humain

Actuellement dans la littérature il n'existe aucun test simple et rapide permettant la détermination d'une activité immunomodulatrice à partir d'extraits de cultures de microorganismes. En effet, les méthodes existantes sont difficiles à mettre en place dans le cadre d'un screening car elles sont basées sur le dosage de molécules immunitaires complexes comme par exemple les interleukines et immunoglobulines mais également sur la détermination d'une prolifération, activation et/ou d'une différenciation de cellules immunitaires spécifiques telles que les macrophages. Ces essais sont surtout réalisés *in vitro*, à partir de cultures de cellules immunitaires différenciées mais également *in vivo* en réalisant directement des expérimentations chez l'animal. Il est important de rappeler que d'une part, les produits fongiques communément testés comme les extraits de champignon sont préalablement purifiés (β -glucane) et/ou concentrés (extrait méthanolique à partir de carpophores). Ce type de méthodologie ne peut évidemment pas être appliqué dans le cas d'un grand nombre d'échantillons. D'autre part, la concentration ainsi que la purification du produit fermenté ne font pas partie des objectifs fixés dans cette étude.

3.1.1. Réponse des neutrophiles en présence d'extraits bactériens et fongiques concentrés

L'exploration de la phagocytose est une technique couramment employée pour détecter une réponse immunitaire. La fonction majeure des phagocytes, dont les neutrophiles sont les plus nombreux des leucocytes circulants, est la protection de l'organisme contre les agents infectieux. Le processus de phagocytose suit différentes étapes qui sont l'activation des cellules *via* la reconnaissance des motifs pathogéniques, la motilité, l'adhésion aux particules, la dégranulation et la destruction par inclusion à l'intérieur d'une vacuole (phagosome)²⁴⁰. L'activation des neutrophiles est déterminée par le test au nitrobleu de tétrazolium (NBT). Ce test n'a jamais été appliqué à partir d'extraits provenant de cultures FMS mais d'après la littérature, différentes préparations à base de β -glucanes provenant de levures et de champignons permettent d'obtenir un effet stimulant sur les cellules après une administration *in vitro* ou *in vivo*²⁴¹⁻²⁴³.

Le kit NBT utilisé est un test normalisé destiné à un diagnostic rapide *in vitro* chez l'homme. Il est fourni avec un extrait bactérien non viable qui est utilisé en tant qu'agent stimulant. Le pourcentage de globule blanc activé est plus élevé en cas d'infection bactérienne par rapport à la valeur moyenne de 10% maximum chez un sujet sain, bien que certains échantillons de sang puissent en compter jusqu'à 17%. Les essais réalisés sur sang humain permettent d'obtenir les résultats attendus en utilisant le stimulant bactérien. Les cellules contenant du formazan devenant très fragiles,

un maximum de précautions ont dû être prises lors de l'homogénéisation du sang et de la préparation des frottis. En effet, pour être considéré comme positif, le neutrophile doit présenter une membrane cellulaire visible. Un exemple d'observation microscopique en appliquant les conditions du kit est présenté dans la **figure 28**. En condition non stimulée, peu de globules blancs présentent des dépôts de formazan avec un total de $8 \pm 0.5\%$, tandis qu'en condition stimulée le score s'élève à $44 \pm 2\%$. La coloration de Wright colore les cellules nucléées et les bactéries en bleu (stimulant du kit), les neutrophiles sont facilement identifiables car elles contiennent des granules dans le cytoplasme et un noyau constitué de plusieurs lobes (2 à 5) contrairement aux lymphocytes et aux monocytes dont les noyaux mononucléés apparaissent respectivement de forme arrondie et de fer à cheval occupant la quasi-totalité de la cellule. Les dépôts de formazan apparaissent sous forme d'inclusions intracytoplasmiques irrégulières de couleur noire.

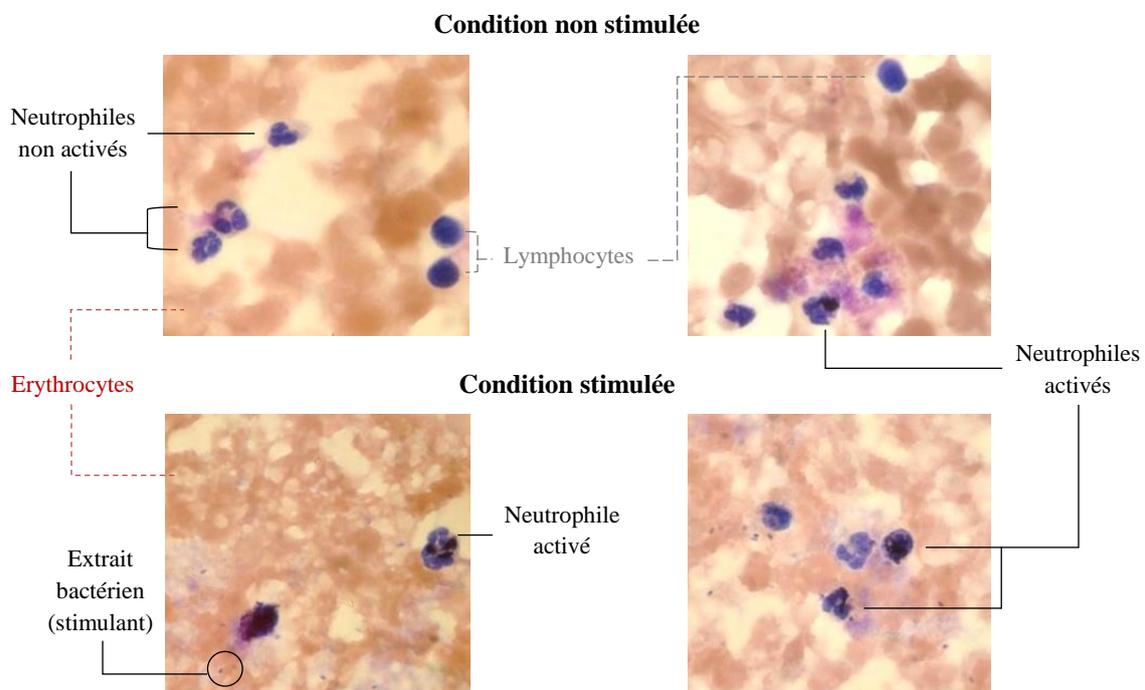


Figure 28. Observation microscopique des frottis sanguins (Test NBT). Seuls les neutrophiles clairement identifiés sont comptabilisés dans chacune des deux conditions du test. Conditions non stimulée : sang + NBT ; condition stimulée : sang + NBT + stimulant bactérien.

Sachant que l'animal ciblé est la volaille, plusieurs essais ont été réalisés sur sang aviaire (pigeon et poulet) mais le test n'est malheureusement pas adaptable en raison de la présence d'érythrocytes nucléés imposants masquant les globules blancs qui sont plus petits. Les hétérophiles, l'équivalent des neutrophiles de mammifère, sont difficilement reconnaissables malgré les modifications de colorations réalisées. Aussi, les cellules présentant des dépôts de formazan n'apparaissent pas de façon assez marquante pour valider les comptages. Compte tenu de ces problématiques uniquement le sang humain est utilisé pour appliquer le test NBT. Les mécanismes de défense entre le modèle aviaire et le modèle mammifère restent toutefois comparables. Il a été

démonstré que les β -glucanes administrés à des poulets augmentent significativement l'activité des hétérophiles avec une augmentation de la phagocytose et une libération accrue de radicaux libres dérivés de l'oxygène mesurés par le NBT par rapport aux hétérophiles isolés des animaux ayant obtenus une ration contrôle sans β -glucanes^{177,244}. La présence d'un récepteur équivalent à Dectin-1 à la surface des hétérophiles aviaires a été mis en évidence en utilisant différents glucanes, notamment le curdlane (β -glucane bactérien) et de l'extrait de levure^{245,159}. Bien que le processus de reconnaissance des polysaccharides soit similaire à celui des neutrophiles de mammifère, des expérimentations chez l'animal resteront nécessaires afin de valider l'ensemble des résultats *in vitro* obtenus sur sang humain.

Le β -glucane est le polysaccharide le plus abondant de la paroi des champignons, cette molécule est notamment capable de se lier directement à de nombreux récepteurs cellulaires, dont ceux des neutrophiles, déclenchant ainsi la cascade de signalisation permettant d'obtenir la réponse immunitaire. Deux standards internes plus représentatifs des extraits de culture de champignon ont ainsi été testés en présence des cellules. Le premier produit est le zymosane, un β -glucane de levure associé à des protéines qui est couramment utilisé expérimentalement pour induire des réactions inflammatoires. Cette molécule est d'ailleurs citée dans le kit NBT comme étant un stimulant du système immunitaire et particulièrement des globules blancs de type phagocyte comme les neutrophiles. La seconde préparation est un concentré de β -glucanes de levure fourni avec le kit de dosage des β -glucanes fongiques Megazyme. Différentes doses de ces produits sont préparées dans de l'eau physiologique stérile avant leur incorporation dans le sang. Les résultats présentés dans la **figure 29** montrent que les deux types de préparations sont capables d'activer les neutrophiles de manière dose dépendante comme indiqué dans la littérature²⁴⁶.

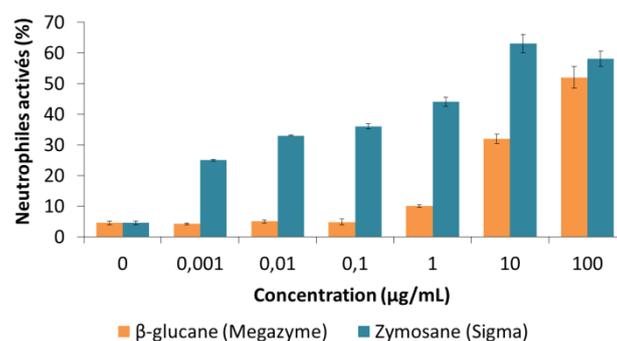


Figure 29. Effet de la concentration croissante en β -glucanes sur la réduction du NBT par les neutrophiles du sang. Les deux produits commerciaux testés (Megazyme et Sigma) sont des préparations à base de β -glucanes de *S. cerevisiae* incorporés dans le sang à des concentrations allant de 0 à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La réponse au zymosane atteint un seuil vers la concentration maximale de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ car le nombre de cellules activées n'augmente plus malgré une quantité dix fois plus importante de stimulant par rapport à la dose inférieure. Ce phénomène suggère que les effets immunomodulateurs des β -glucanes ne sont pas directement liés à la dose administrée et les forts dosages ne permettent pas d'améliorer les

scores et sont en outre susceptibles d'inhiber la réponse immunitaire. La présence de fortes concentrations a certainement tendance à baisser l'activation des cellules car les polysaccharides entrent notamment en compétition pour l'interaction avec les récepteurs membranaires²⁴¹. Par rapport au zymosane, la stimulation obtenue avec le produit de Megazyme est plus faible quelle que soit la dose incorporée avec une réponse maximale des neutrophiles pour la concentration la plus importante de 100 µg.mL⁻¹. La réactivité des leucocytes vis-à-vis de différentes préparations à base de β-glucanes a été mise en évidence dans plusieurs études chez les neutrophiles et les macrophages^{243,247}. L'affinité des β-glucanes pour leurs récepteurs présents à la surface des phagocytes est spécifique et les doses administrées ainsi que les différences de structures peuvent affecter les propriétés stimulatrices. Bien que le contenu en polysaccharide soit en faveur du produit Megazyme, avec 51.76 ± 3.77% de β-glucanes contre 40.87 ± 1.75% pour le zymosane de chez Sigma (dosage Megazyme), la composition globale avec notamment la présence de molécules annexes (protéines, chitines et mannanes) peuvent influencer la réponse immunitaire. Selon plusieurs auteurs, celle-ci ne serait donc pas dépendante de la quantité de β-glucanes mais plutôt de la qualité et des caractéristiques physicochimiques des produits (pureté, solubilité, poids moléculaire, conformation et degré de ramification)²⁴⁸. Il a été démontré que le procédé de production et donc les méthodes d'isolation employées ont un impact sur la structure des β-glucanes. Par conséquent, l'activité biologique de divers produits à base de β-glucanes provenant d'une même source peut être significativement différente²⁴⁹.

3.1.2. Réponse des neutrophiles en présence des extraits de cultures FMS de l'ensemble des souches du crible

Les microorganismes restants à l'issue du chapitre II sont utilisés dans la suite de cette étude. Les quatorze souches de champignons inférieurs présélectionnés étant, *Aspergillus niger* (n° 1), *Aspergillus* sp. (n° 2 à 7), *Aspergillus oryzae* (n° 8), *Aspergillus sojae* (n° 9), *Rhizopus oryzae* (n° 10), *Rhizopus oligosporus* (n° 11), *Penicillium brasilianum* (n° 12), *Trichoderma harzianum* (n° 28) et *Rhizopus* sp. (n° 42). Il reste également quatre souches de champignons supérieurs à savoir, *Morchella hortensis* (n° 19), *Agaricus bisporus* (n° 27) et *Trametes versicolor* (n° 21 et 41). Afin de disposer d'un maximum de biomasse et donc potentiellement de molécules immunomodulatrices, le choix des moments de prélèvement des échantillons pour l'analyse est établi en prenant en compte l'évolution du pourcentage de CO₂ et l'aspect des cultures FMS. Le β-glucane étant un des composants majeurs des parois fongiques, sa production est donc étroitement liée à la croissance des microorganismes. Les jours de prélèvement ont été choisis selon plusieurs critères importants. Le substrat doit être entièrement colonisé par le mycélium et la sporulation doit être très faible ou encore absente. Au moment du prélèvement la quantité de biomasse est quasi maximale puisque les pics de CO₂ sont passés pour la plupart des microorganismes (**Figure 30**). Concernant les inférieurs, uniquement les cultures avec les souches n° 1 à 7 ont été prélevées dès le second jour de culture car la sporulation est

trop importante le jour suivant. Toutes les autres sont sacrifiées au bout du troisième jour sauf *R. oligosporus* (n° 11) qui est la seule souche de cette catégorie à avoir été prélevée le quatrième jour de culture car son développement est le plus lent avec une sporulation très limitée. Pour les quatre champignons supérieurs les prélèvements sont effectués le cinquième jour de culture puisque la croissance est décalée dans le temps.

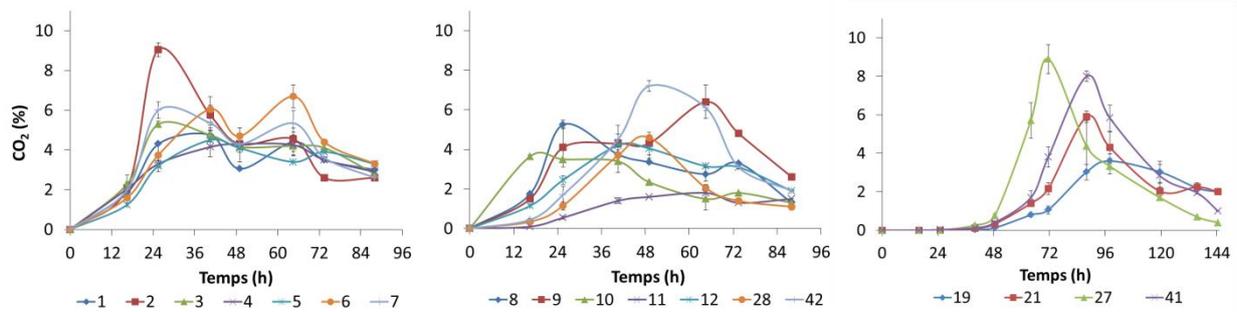


Figure 30. Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps des cultures FMS sur tourteau lot 2.

Les extraits des cultures sur tourteau de colza de l'ensemble des souches sont utilisés dans le test NBT pour la détermination d'une activité immunomodulatrice chez le neutrophile du sang. D'après la **figure 31** présentant les résultats du test NBT pour les champignons inférieurs, le tourteau seul permet d'obtenir une réponse similaire par rapport à la condition non stimulée (sang seul). Le substrat solide n'a donc aucun effet sur les neutrophiles. Parmi les extraits provenant des cultures FMS, uniquement ceux des souches *Aspergillus oryzae* (n° 8) et *Aspergillus sojae* (n° 9) provoquent une réponse significative des neutrophiles sanguins par rapport aux autres échantillons de culture avec un doublement du nombre de cellules activées. Les pourcentages restent toutefois inférieurs à la réponse obtenue par le témoin positif du test, c'est-à-dire le stimulant bactérien non viable.

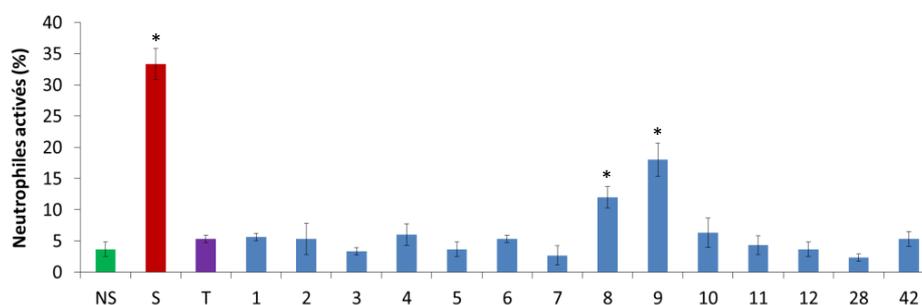


Figure 31. Pourcentage de neutrophiles activés (présentant des dépôts de formazan) dans le sang en présence d'extraits de culture FMS avec les champignons inférieurs. NS : condition non stimulée (sang seul) ; S : condition stimulée (extrait bactérien du kit) ; T : extrait de tourteau de colza seul ; Numéro de souches (barres bleues) : extraits de culture FMS correspondant aux 14 champignons inférieurs. * $P < 0.0001$ (ANOVA à un facteur).

Il est important de noter que le traitement thermique des échantillons (séchage à 105°C) ne dénaturerait par les β -glucanes fongiques. La molécule est cependant affectée généralement à plus

haute température (>130°C) et dans certaines conditions en présence de solvant (DMSO) et en utilisant des méthodes d'hydrolyses acides et enzymatiques^{250,251}.

En ce qui concerne les champignons supérieurs (**Figure 32**), le pourcentage de neutrophiles activés est équivalent au tourteau seul dont la réponse est d'ailleurs supérieure au sang seul. La souche *T. versicolor* ATCC (n° 41) est la seule qui est statistiquement différente des autres souches. La prudence s'impose toutefois pour l'interprétation des données car ces deux séries d'essais ont été réalisées avec des échantillons de sang distincts. Bien que le niveau basal soit dans la plage normale chez les deux sujets (< 10%), les réponses ne sont pas les mêmes pour le témoin positif ainsi que pour le tourteau seul avec une sensibilité des neutrophiles manifestement accrue pour ces deux extraits utilisés avec le second échantillon de sang. Ces différences reflètent donc une certaine variabilité de la réponse immunitaire propre à chaque individu qu'il est nécessaire de prendre en compte.

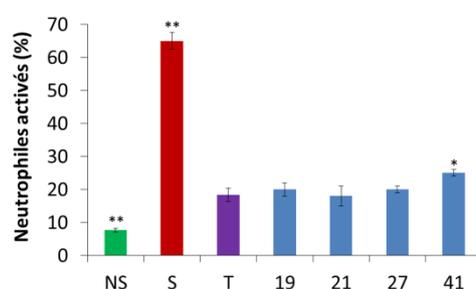


Figure 32. Pourcentage de neutrophiles activés (présentant des dépôts de formazan) dans le sang en présence d'extraits de culture FMS avec les champignons supérieurs. NS : condition non stimulée (sang seul) ; S : condition stimulée (extrait bactérien du kit) ; T : extrait de tourteau de colza seul ; Numéro de souches (barres bleues) : extraits de culture FMS correspondant aux quatre champignons supérieurs. ** $P < 0.0001$, * $P < 0.007$ (ANOVA à un facteur).

D'après la littérature, les préparations provenant de ces souches de champignons supérieurs présentent des effets immunomodulateurs bien connus mais ceux-ci n'ont jamais été déterminés à partir d'extraits bruts de culture FMS. La concentration en molécules bioactives ne serait peut-être pas assez importante pour stimuler les globules blancs sanguins contrairement aux préparations commerciales concentrées tel que le zymosane testé précédemment. Le contenu en β -glucane n'est effectivement pas détectable dans les cultures FMS avec la méthode utilisée quelle que soit la souche considérée. Les pourcentages sont très proches de celui du tourteau de colza seul ($3.98 \pm 0.16\%$) représentant l'interférence liée à la méthode de dosage utilisée provoquant une hydrolyse partielle de la cellulose. Ainsi, le dosage des β -glucanes n'est pas pertinent pour suivre l'évolution de la biomasse sur tourteau de colza. D'après les travaux publiés à ce jour, les substances bioactives, essentiellement des β -glucanes, sont majoritairement isolées et subissent une série d'étapes d'extraction et de concentration avant leur utilisation dans des essais *in vitro* et *in vivo* pour la détermination de leurs propriétés sur le système immunitaire. Par conséquent, les champignons supérieurs ne peuvent pas être éliminés à ce stade de l'étude. Quant aux champignons inférieurs, les souches retenues sont

Aspergillus oryzae (n° 8) et *Aspergillus sojae* (n° 9) en raison des résultats encourageants obtenus suite au test NBT. Malgré une réponse négative, *Rhizopus oryzae* (n° 10) et *Rhizopus oligosporus* (n° 11) sont également conservées car contrairement aux autres souches alimentaires restantes, l'intégralité de leur biomasse, présente sous forme de mycélium dans des produits fermentés, est couramment consommée par l'homme. Il a ainsi été décidé d'éliminer les autres microorganismes à savoir *Trichoderma harzianum* et *Penicillium brasilianum* qui sont connus surtout pour la production d'enzymes tandis que ceux isolés du sol (*A. niger*, *Aspergillus* sp. et *Rhizopus* sp.) peuvent présenter un risque pour la santé humaine ou animale car elles sont susceptibles de produire des mycotoxines.

3.1.3. Comparaison des niveaux d'activation des neutrophiles avec les extraits de mycélium et de culture en milieu solide

Afin d'obtenir des échantillons davantage concentrés en β -glucane, le test NBT est d'abord appliqué en utilisant la biomasse brute des microorganismes sous forme de mycélium obtenu à partir de cultures en milieu liquide (**Figure 32**). Un dosage des β -glucanes permet en parallèle d'évaluer la quantité de ce composé bioactif dans du mycélium seul puisque celui-ci est indétectable en utilisant les échantillons de culture FMS (**Figure 33**). Comme constaté dans le paragraphe précédent, les pourcentages de neutrophiles activés concernant les standards internes ne sont pas les mêmes pour les deux échantillons de sang utilisés. La tendance est cependant similaire, avec une réponse plus forte pour le stimulant bactérien par rapport au concentré de β -glucane de levure et des niveaux relativement bas pour le sang seul et le tourteau de colza.

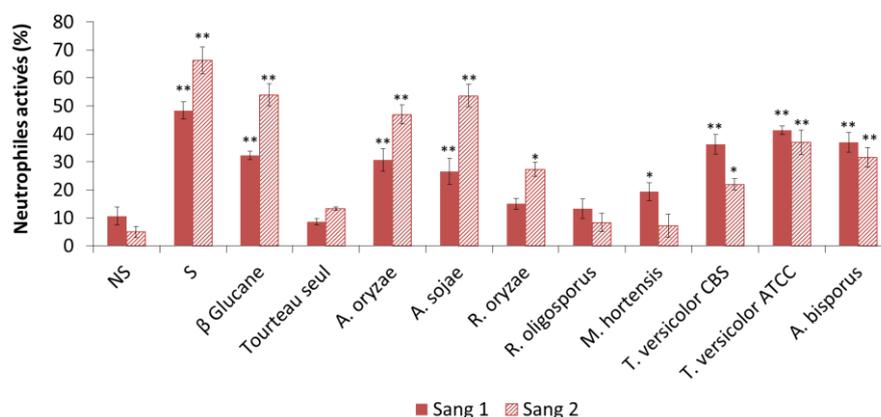


Figure 32. Pourcentage de neutrophiles activés (présentant des dépôts de formazan) dans deux échantillons de sang provenant de donneurs distincts en présence d'extraits de mycélium. NS : condition non stimulée (sang seul) ; S : condition stimulée (extrait bactérien du kit) ; β -Glucane : β glucane de levure Megazyme à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. ** $P < 0.0001$, * $P < 0.05$ par rapport au groupe contrôle représenté par le tourteau de colza seul (ANOVA, test de Dunnett).

En prenant en compte les différences significatives obtenues sur les deux panels de sang, les souches permettant d'obtenir les stimulations les plus importantes sont les deux *Aspergillus* ainsi que *T. versicolor* ATCC et *A. bisporus*. Ces nouveaux résultats, à partir de la biomasse brute concentrée, confirment le potentiel immunostimulant de certaines souches et notamment les champignons supérieurs. Le contenu en β -glucane du mycélium est extrêmement variable avec des niveaux allant de 2.5 à 25.1% selon les souches. Ces valeurs sont cohérentes par rapport à celles obtenues dans d'autres études utilisant le même kit de dosage avec différents champignons supérieurs (4.7 – 46.2%)²⁵² et moisissures (0.9 – 23.8%)¹⁷⁰. Le tourteau seul est testé en assemblage avec le témoin du kit pour évaluer l'importance des interférences liées à la présence de cellulose. L'échantillon testé représente en quelque sorte la dégradation d'une partie de la cellulose par le microorganisme et la production de β -glucanes avec le développement de la biomasse fongique. Le résultat obtenu par le dosage (28%) est similaire au calcul théorique en prenant en compte les valeurs respectives des échantillons non assemblés. La quantité de β -glucanes additionnée au tourteau est détectable avec une interférence liée à la présence de cellulose restée stable, la méthode est donc tout à fait applicable aux cultures, à condition toutefois que la quantité de glucanes (et donc de biomasse fongique) soit suffisamment élevée. Une partie de la cellulose peut être métabolisée par le microorganisme au cours du temps donc la valeur de l'interférence peut sensiblement diminuer.

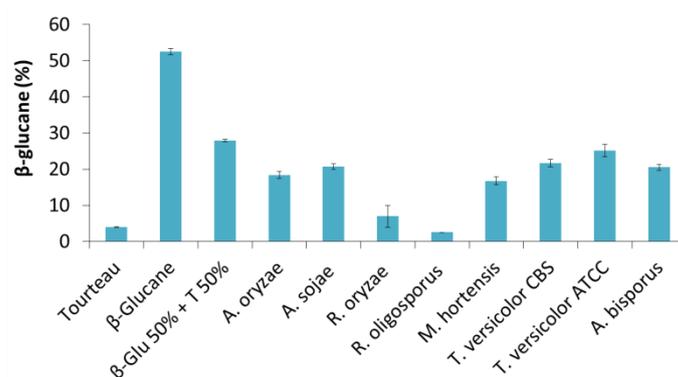


Figure 33. Pourcentage de β -glucanes dans les échantillons de mycélium. β -Glucane : témoin du dosage Megazyme ; β -Glu 50% + T 50% : assemblage du tourteau avec le témoin du kit en réduisant leurs quantités respectives à 50%. Les pourcentages sont exprimés par rapport à la masse sèche.

Les pourcentages de β -glucanes les plus élevés ont été obtenus avec les quatre champignons supérieurs et les *Aspergillus*. La réponse immunitaire, mesurée par le test NBT, peut donc être corrélée à la quantité de β -glucanes présente dans la biomasse mycélienne des microorganismes étudiés. Comme évoqué précédemment le type de β -glucane et/ou de molécules bioactives associés ont également leur importance. Des différences d'affinité et d'accessibilité des molécules peuvent également expliquer ces résultats. En effet, la stimulation des neutrophiles est relativement plus faible pour *M. hortensis* par rapport aux autres souches de sa catégorie. Malgré un contenu en β -glucane six fois plus important que *R. oligosporus*, le pourcentage d'activation est relativement faible voire nul pour ces deux souches.

Parmi les autres composés de paroi dont les activités biologiques ont été démontrés figurent notamment les mannanes ainsi que les associations protéines-mannanes²⁵³. Ces composés sont présents dans leur intégralité puisqu'aucune extraction n'a été réalisée. Finalement, la souche *R. oligosporus* est éliminée à ce stade de l'étude en raison des réponses négatives obtenues au test NBT et d'un contenu en β -glucane très faible (2.5%) par rapport à toutes les autres souches. Sa croissance est également la plus lente quel que soit le milieu de culture utilisé (liquide ou solide sur tourteau de colza).

Concernant, les cultures en milieu solide, les essais ont été répétés sur un même échantillon de sang (Figure 34). Des réponses significatives ont été obtenues pour quatre souches par rapport au tourteau de colza seul. Les scores sont néanmoins plus bas par rapport au mycélium brut dont les réponses ont été déterminées sur le même sang (Figure 32, sang 1).

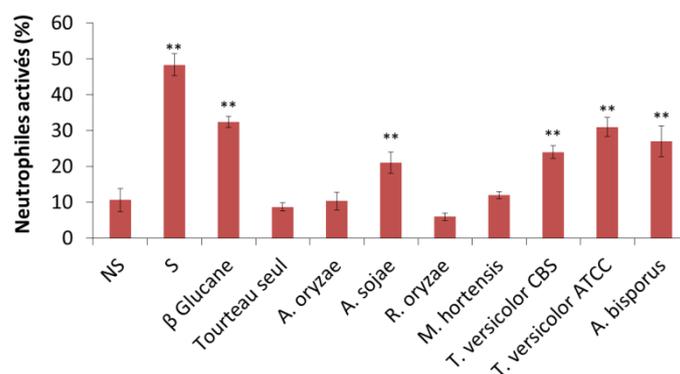


Figure 34. Pourcentage de neutrophiles activés (présentant des dépôts de formazan) en présence d'extraits de culture FMS des souches sélectionnées. NS : condition non stimulés (sang seul) ; S : condition stimulés (extrait bactérien du kit) ; β -Glucane : β glucane de levure Megazyme à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. ** $P < 0.0001$ par rapport au groupe contrôle représenté par le tourteau de colza seul (ANOVA, test de Dunnett).

Les quantités de β -glucanes sont toujours indétectables, ce qui confirme l'hypothèse d'une concentration trop faible en molécules bioactives pour les cultures sur tourteau dans les conditions de l'essai effectué. A ce sujet, Castro *et al.* ont relié la différence d'activité du métabolisme oxydatif des phagocytes à la concentration en β -glucanes²⁴¹. Les données suggèrent aussi que les effets sur le système immunitaire à différentes doses sont variables en raison de leurs caractéristiques physico-chimiques propres et de leur affinité vis-à-vis des récepteurs membranaires des cellules immunitaires. Le mécanisme d'action des β -glucanes concernant l'induction des activités immunomodulatrices n'a pas encore été totalement élucidé à ce jour¹⁶². Par ailleurs, les extraits utilisés dans cette étude peuvent contenir d'autres substances bioactives comme des polysaccharides, protéines, triterpènes, lipides et phénols. Ces composés ayant des propriétés pharmacologiques établies ont été identifiés dans le mycélium et le carpophore des champignons médicinaux¹⁶. Contrairement au mycélium seul, la biomasse est considérablement diluée dans la culture FMS et celle-ci ne peut pas en être séparée puisque les hyphes fongiques sont fermement liés aux particules solides. En plus d'une quantité plus

limitée, l'accessibilité des molécules bioactive n'est sans doute pas la même pour les cellules immunitaires en raison de cette adhésion entre le mycélium et les particules du tourteau de colza. Suivant la variabilité de l'échantillon de sang et donc la sensibilité des neutrophiles, les réponses sont plus ou moins marquées vis-à-vis d'un même produit ce qui pose problème pour le choix d'un microorganisme, particulièrement dans le cas des extraits de culture FMS. Néanmoins, en prenant en compte l'ensemble des résultats effectués jusqu'à présent avec le test NBT deux souches sont particulièrement bien classées, il s'agit de *T. versicolor* ATCC et *A. sojae*. Avec respectivement 25 et 21% de β -glucanes dans leur biomasse, elles font partie des meilleures souches d'après la réponse immunitaire sur le neutrophile du sang humain. Pour le choix définitif de la souche, le potentiel immunostimulant des deux microorganismes sélectionnés doit être préalablement confirmé avec un test plus fiable par rapport au test NBT dont les résultats restent plus ou moins dépendants de l'échantillon de sang considéré.

3.2. Effet des produits fermentés sur la production d'IL-1 β par les cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC) et les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris (BMDM) stimulés par une endotoxine

Les essais *in vitro* impliquant la culture de cellules immunitaires sont les plus utilisés pour évaluer le potentiel immunomodulateur d'un composé donné. Cette approche est notamment utilisée dans le but d'examiner la capacité des substances bioactives à influencer des fonctions immunitaires spécifiques comme l'activation d'éléments particuliers du système immunitaire (type cellulaire, voie de signalisation, etc.) entraînant la production de cytokines. Les modèles cellulaires PBMC (représentatif des cellules circulantes du sang) et BMDM (représentatif des tissus) peuvent être utilisés dans le cas d'une stimulation par des composés fongiques puisque à l'instar du neutrophile, les monocytes et les macrophages sont capables de s'activer directement en présence des β -glucanes¹⁶⁰.

L'inflammation est une des premières réponses du système immunitaire contre un agent pathogène qui peut être d'ordre physique (traumatisme et substances étrangères inertes), chimique (substances toxiques) et biologique (infection par un organisme vivant). L'exposition des cellules immunitaires à un agent stimulant, comme le LPS, entraîne la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dont l'interleukine IL-1 β ²⁵⁴. Cette dernière a été sélectionnée en raison de ses effets multiples exercés sur une grande variété de types cellulaires. Elle joue également un rôle clé dans les processus inflammatoires en activant les leucocytes et en régulant la synthèse d'autres médiateurs de la réponse immunitaire²⁵⁵. La stimulation des globules blancs par le LPS, mimant la réponse inflammatoire *in vitro*, est une technique généralement utilisée pour évaluer les propriétés immunomodulatrices de divers composés, dont les extraits de champignons²⁵⁴. La détermination des niveaux d'IL-1 β permet ainsi d'étudier la modulation de l'activité inflammatoire en présence des

différents composés testés à condition que ceux-ci soient utilisés à des concentrations non cytotoxiques.

Les IL-1 β aviaires ont le même rôle que ceux des mammifères concernant la médiation de la réponse inflammatoire. L'impact des β -glucanes sur la production d'IL-1 β a été étudié essentiellement chez les mammifères mais quelques essais ont également été effectués chez la volaille. Des expérimentations menées *in vivo* sur poulet et *in vitro* sur les macrophages aviaires ont notamment mis en évidence une élévation des niveaux d'IL-1 β après l'exposition aux polysaccharides fongiques. Des résultats similaires ont d'ailleurs été obtenus après l'injection de lentinane chez la souris^{180,235}.

3.2.1. Activités immunomodulatrices obtenues avec le modèle PBMC

La première approche a été de vérifier la présence d'une activité pharmacologique dans la fraction essentiellement soluble des produits testés sans cytotoxicité en utilisant un des modèles les plus approprié, à savoir les cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC). Afin de d'analyser les profils de sécrétion de l'interleukine pro-inflammatoire IL-1 β , les cellules ont été incubées avec différentes concentrations des produits à tester. Les profils de cytotoxicité ont également été mis en évidence en parallèle en utilisant le test XTT.

Les résultats concernant la viabilité cellulaire présentés dans la **figure 35A** montrent qu'après 17h30 d'incubation, le LPS seul, utilisé à la concentration de 10 ng.mL⁻¹ n'induit aucune cytotoxicité en comparaison au contrôle (milieu de culture). De même, l'ajout des deux anti-inflammatoires ZVAD et PRED ne modifie pas statistiquement la viabilité des PBMC. Les différents produits testés à des concentrations allant de 0 à 1 mg.mL⁻¹, ne présentent aucune cytotoxicité majeure (**Figure 35B et C**). L'extrait de culture FMS d'*A. sojae* induit une cytotoxicité d'environ 40% dès la plus faible concentration testée (0.125 mg.mL⁻¹). Il est toutefois noté que cette cytotoxicité n'augmente pas avec la concentration, par conséquent une interaction avec le test XTT peut être envisagée. Certains échantillons induisent une légère prolifération cellulaire mais celle-ci n'est pas significative et n'augmente pas avec la dose incorporée. Une stimulation de la prolifération cellulaire a été mise en évidence avec le test XTT par Chan *et al.* avec des extraits de *G. lucidum*, mais la durée de contact avec les PBMC est prolongée à 48 et 72h pour obtenir des résultats significatifs. Une cytotoxicité a toutefois été rapportée dans cette même étude pour un des échantillons incorporé à la concentration maximale de 1 mg.mL⁻¹²⁵⁶.

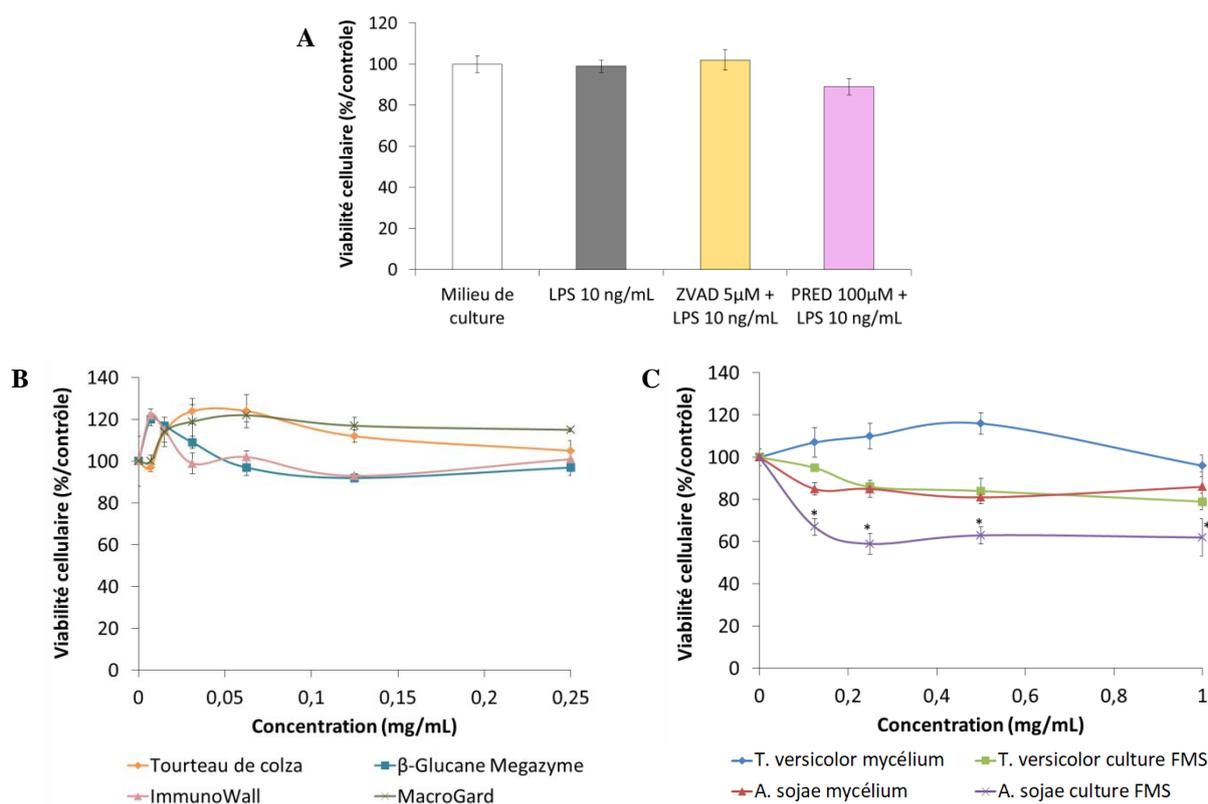


Figure 35. Pourcentage de viabilité cellulaire des PBMC en présence des différents composés testés par rapport au contrôle milieu de culture. **A** : Viabilité dans le milieu de culture seul, en présence de LPS à 10 ng.mL^{-1} et en présence de LPS 10 ng.mL^{-1} additionné des deux références internes anti-inflammatoires (ZVAD à $5 \mu\text{M}$ et PRED à $100 \mu\text{M}$). **B** : Viabilité en présence de LPS à 10 ng.mL^{-1} additionné des différents témoins (tourteau seul, β -Glucane Megazyme, ImmunoWall et MacroGard) incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,007, 0,015, 0,0312, 0,0625, 0,125 et $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$). **C** : Viabilité en présence de LPS à 10 ng.mL^{-1} additionné des différents extraits de mycélium et de cultures FMS d'*A. sojæe* et *T. versicolor* incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,125, 0,25, 0,5 et 1 mg.mL^{-1}). * $P < 0,0001$ par rapport au groupe contrôle représenté par le milieu de culture seul (ANOVA, test de Dunnett).

D'après les résultats présentés dans la **figure 36A**, au bout de 17h30 d'incubation, la stimulation par le LPS, utilisé à la concentration de 10 ng.mL^{-1} , a induit une production d'IL-1 β par les PBMC ($928 \pm 70 \text{ pg.mL}^{-1}$) en comparaison au niveau basal en présence du contrôle représenté par le milieu de culture ($13 \pm 3 \text{ pg.mL}^{-1}$). Toujours en présence de LPS, ZVAD et PRED induisent une diminution significative de 42% et 32%, respectivement, de la production d'IL-1 β par les PBMC stimulées validant le test. Ces deux anti-inflammatoires sont particulièrement efficaces pour inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires. Le ZVAD est un composé méthylkétone de synthèse qui bloque le site catalytique d'une protéase à cystéine (caspase) participant à la maturation des IL-1 β inhibant de ce fait l'activité de l'inflammasome NLRP3, un complexe multi protéique qui participe à la réponse immunitaire innée et qui contrôle l'activité des caspases²⁵⁷. Le prédnisolone (PRED) est un corticostéroïde de synthèse qui empêche la transcription du gène responsable de la synthèse des IL-1 β en interagissant avec les récepteurs nucléaires aux stéroïdes²⁵⁸. Parmi les quatre témoins testés, uniquement le produit immunoWall a un effet sur les PBMC stimulées en augmentant significativement la production d'IL-1 β , jusqu'à cinq fois plus par rapport au LPS, et de manière dose

dépendante (**Figure 36B**). Les autres produits testés, dont le tourteau de colza, ne modifient pas de manière notable la production d'IL-1 β par les PBMC stimulées. Les produits commerciaux à base de β -glucane de *S. cerevisiae* n'ont pas la même composition, ImmunoWall est d'ailleurs celui dont le contenu en β -glucane est le plus faible (**Tableau 16**).

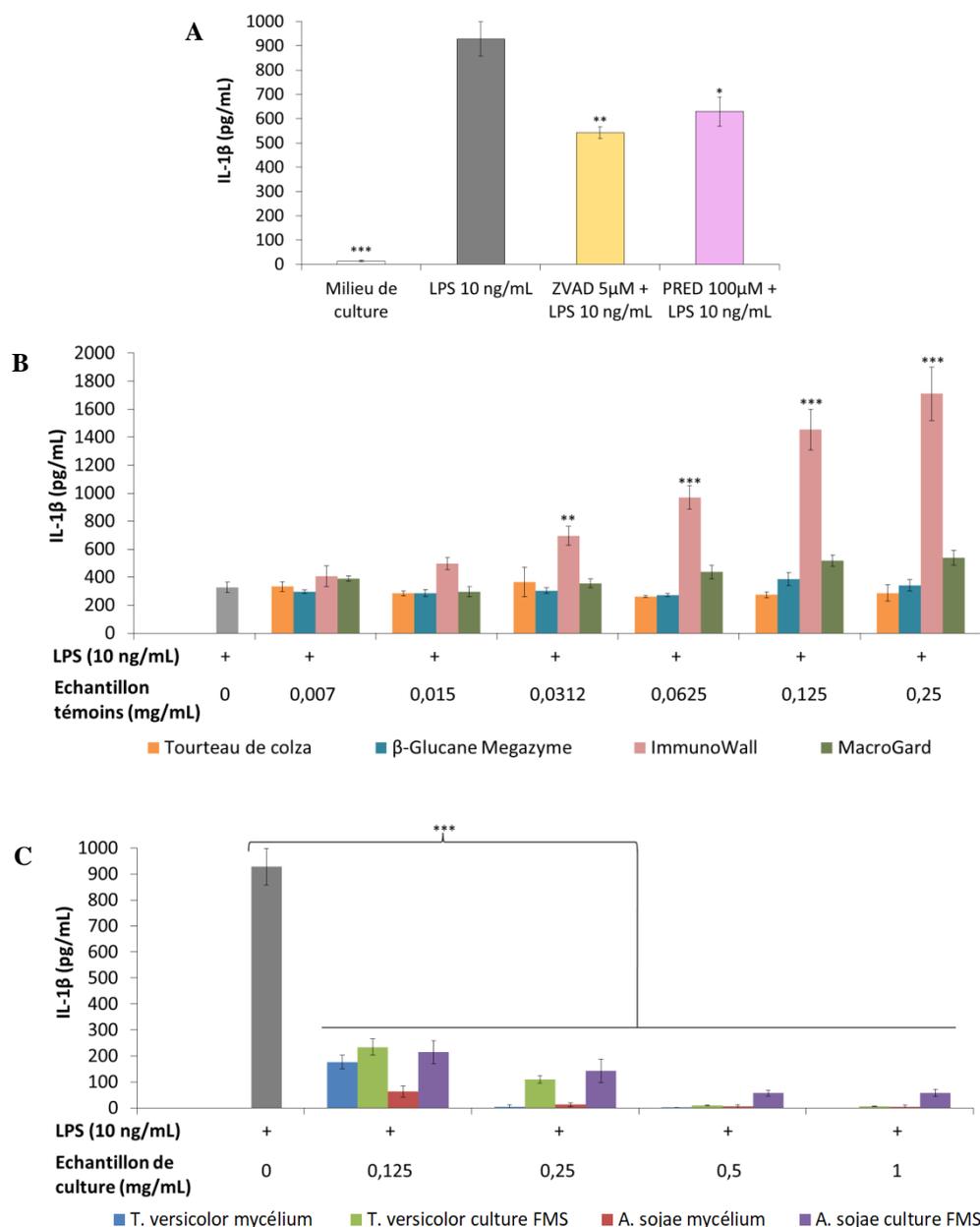


Figure 36. Concentration d'IL-1 β secrétée par les PBMC en présence des différents composés testés. **A** : Quantité d'IL-1 β dans le milieu de culture seul, en présence de LPS à 10 ng.mL $^{-1}$ et en présence de LPS à 10 ng.mL $^{-1}$ additionné des deux références internes anti-inflammatoires (ZVAD à 5 μ M et PRED à 100 μ M). **B** : Quantité d'IL-1 β en présence de LPS à 10 ng.mL $^{-1}$ additionné des différents témoins (tourteau seul, β -Glucane Megazyme, ImmunoWall et MacroGard) incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,007, 0,015, 0,0312, 0,0625, 0,125 et 0,25 mg.mL $^{-1}$). **C** : Quantité d'IL-1 β en présence de LPS à 10 ng.mL $^{-1}$ additionné des différents extraits de mycélium et de cultures FMS d'*A. sojae* et *T. versicolor* incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,125, 0,25, 0,5 et 1 mg.mL $^{-1}$). *** $P < 0,0001$, ** $P < 0,001$, * $P < 0,005$ par rapport au groupe contrôle représenté par le LPS (ANOVA, test de Dunnett).

Ces différentes préparations n'ont manifestement pas la même aptitude à moduler la production d'IL-1 β par les PBMC et l'absence d'information concernant leur composition détaillée ne permet pas de conclure sur les effets observés sachant que ceux-ci ne seraient pas uniquement liés à la concentration en β -glucane. D'après la notice du fournisseur, ImmunoWall est un prébiotique riche en β -glucane, mannane-oligosaccharides et en protéines qui stimule l'activité des macrophages et prévient la colonisation de l'intestin par des pathogènes en renforçant l'action de bactéries bénéfiques comme les lactobacilles. Il permet d'augmenter l'efficacité nutritionnelle ainsi que la vitesse de croissance et réduit la mortalité chez la volaille. MacroGard s'affiche quant à lui plutôt comme un additif dont la pureté ainsi que la préservation des molécules de β -glucane est particulièrement importante et dont l'action principale est l'activation des phagocytes. La documentation scientifique est conséquente pour ce dernier concernant la démonstration de la capacité à promouvoir la résistance, la santé et les performances des animaux d'élevage avec notamment quelques études réalisées *in vitro* sur monocytes et macrophages démontrant une augmentation des cytokines pro-inflammatoires et notamment l'IL-1 β après 24h de contact²⁵⁹. Ces résultats ont cependant été obtenus en absence d'un stimulant inflammatoire comme le LPS. Des réponses extrêmement variables ont été rapportées *in vitro* en utilisant les β -glucanes seuls ou en combinaison avec le LPS. Selon la cytokine considérée, il n'y pas d'impact ou une amplification plus ou moins importante de la production d'interleukine occasionnée par le LPS. Ces résultats dépendent de la dose incorporée seule ou en combinaison avec un stimulant. Les interactions ne sont donc pas les mêmes suivant les conditions des essais et les mécanismes impliqués ne sont pas clairement élucidés à l'heure actuelle. La plupart des essais menés *in vivo* suggèrent en revanche qu'un traitement avec les β -glucanes fongiques réduit la production de cytokines pro-inflammatoires dans des conditions inflammatoires comme suivant une stimulation par le LPS²⁶⁰. Aussi, les β -glucanes de levure bien que présentant la même structure basique, sont présentés sous différentes formes, plus ou moins purifiés et solubles avec des poids moléculaires variables ce qui peut également expliquer les résultats obtenus. La contamination potentielle par une endotoxine (effet costimulant) n'est pas négligeable même si l'absence de contaminant a été systématiquement vérifiée, l'utilisation d'un autre modèle cellulaire pourra confirmer ou non cette hypothèse.

Lorsque l'on considère les extraits de mycélium brut et de culture FMS des deux souches étudiées, ceux-ci sont capables de diminuer de façon importante la production d'IL-1 β par les PBMC stimulées et de manière dose-dépendante (**Figure 36C**). Une réduction de plus de 90% est observée avec les plus fortes concentrations testées ce qui est supérieur aux deux références anti-inflammatoires. Le mycélium semble plus efficace par rapport aux extraits de culture FMS respectifs des microorganismes certainement en raison d'une concentration plus élevée en biomasse et donc en molécules bioactives comme les β -glucanes qui ne sont pas détectables avec la méthode employée dans les cultures sur tourteau (**Tableau 16**).

Tableau 16. Pourcentage de β -glucane dans les témoins, le mycélium (culture en milieu liquide) et les cultures sur tourteau de colza (culture en milieu solide)

Echantillons		Contenu en β -glucane (%)
Témoins	Tourteau de colza	ND
	β -Glucane Megazyme	53.2 \pm 0.9
	ImmunoWall	21.2 \pm 0.7
	MacroGard	39.5 \pm 1.1
Microorganismes cultivés	Mycélium d' <i>Aspergillus sojae</i>	20.7 \pm 0.8
	Culture FMS d' <i>Aspergillus sojae</i>	ND
	Mycélium de <i>Trametes versicolor</i>	25.1 \pm 1.7
	Culture FMS de <i>Trametes versicolor</i>	ND

ND : non détectable

L'implication des β -glucanes dans cette réponse immunitaire reste incertaine puisque les échantillons de culture révèlent une aptitude semblable à inhiber la sécrétion de l'IL-1 β . Les résultats obtenus pour ces échantillons coïncident toutefois avec plusieurs études par rapport à une réponse de type anti-inflammatoire. Le phénomène d'inhibition de la quantité de cytokines a été mis en évidence par plusieurs auteurs en utilisant des composés à base de β -glucanes fongiques sur le même modèle cellulaire, à savoir les PBMC. Selon Poutsika *et al.*, les β -glucanes peuvent induire une production importante d'IL-1Ra, un antagoniste naturel au récepteur de l'IL-1 β , sans déclencher la sécrétion de l'IL-1 β . La production de l'inhibiteur a uniquement été observée en présence de LPS évoquant une interaction combinée à la surface des récepteurs cellulaires avec différents ligands pour déclencher la transduction de ce signal ²⁶¹. Les β -glucanes semblent capables de modifier la réponse à une stimulation pro-inflammatoire même en cas de sepsis. Des études cliniques ainsi que de nombreux essais chez les animaux démontrent le rôle protecteur des polysaccharides fongiques dans certaines conditions comme dans le cas d'une lésion ou d'une infection polymicrobienne chez le modèle murin. Le processus responsable de ces effets positifs n'est que partiellement résolu mais les essais *in vitro* tendent à confirmer le potentiel anti-inflammatoire des polysaccharides fongiques avec une diminution du ratio IL-1 β /IL-1Ra *via* l'analyse des facteurs de transcription NF- κ B et de leur liaison sur les différents promoteurs des cytokines. Il a été démontré que cette induction est différente suivant l'addition de LPS ou d'une autre toxine bactérienne (TSST-1) ²⁶². Les profils en cytokines sécrétées seraient ainsi différents suivant le type de stimulation. Par rapport à la production d'IL-1 β , les résultats issus de la littérature sur les cellules non stimulées sont contradictoires. Un extrait soluble provenant du mycélium de *L. lepidus* augmente considérablement les niveaux d'IL-1 β chez les PBMC tandis que les autres cytokines ne sont pas affectées. Des résultats similaires ont également été obtenus sur PBMC et monocyte humain avec un extrait de polysaccharides isolé du carpophore de *G. sinense* et une préparation à base de β -glucane purifié de *S. cerevisiae* ^{263,264}. Par opposition, d'autres auteurs montrent que la stimulation des cellules seules n'induit pas forcément de réponse pro-inflammatoire avec des niveaux inchangés en IL-1 β ^{261,265}. Ces données supplémentaires signifient que la réponse

obtenue, en plus d'être dépendante de la présence de facteurs stimulants, est également tributaire des composants impliqués avec une possible combinaison de différents ligands agissant spécifiquement sur le profil des cytokines. Par conséquent, la reconnaissance des préparations à base de β -glucanes peut donner lieu à des effets pro- ou anti-inflammatoires suivant les conditions testées et le type de molécules impliquées^{233,265}. Il faut être très prudent dans l'interprétation de ces effets surtout en considérant les modèles *in vitro*. En effet, des analyses complémentaires sont nécessaires avec entre autres l'utilisation de modèles *in vivo* pour caractériser le type d'activité immunomodulatrice provoqué par un produit donné et établir une corrélation avec les essais *in vitro*. L'utilisation de plusieurs genres cellulaires permet notamment d'être plus proche d'une réalité clinique. Dans tous les cas, la validation de l'efficacité sur le système immunitaire doit être effectuée à l'échelle de l'organisme vivant¹⁶.

Les tests réalisés sur les leucocytes circulants du sang confirment les potentiels immunomodulateurs de certains produits, notamment le mycélium et les cultures FMS des souches *A. sojae* et *T. versicolor*, par la modification de la production de l'interleukine pro-inflammatoire IL-1 β . Malgré des résultats prometteurs, *T. versicolor* est éliminé à ce stade de l'étude en raison de brevets déjà existants concernant ses propriétés immunomodulatrices (choix stratégique du groupe industriel). Le modèle PBMC, communément utilisé en recherche pour la démonstration des effets immunomodulateurs de nombreux composés (hydrophiles et hydrophobes), n'est cependant pas adapté à la présence de particules insolubles concentrées du fait d'une induction importante de cytotoxicité en utilisant les produits complets. Uniquement la fraction soluble contenant également de fines particules a pu être mise en contact avec les PBMC en raison du risque d'endommager les cellules. Par conséquent, la concentration en molécules bioactives de l'extrait incorporé avec les cellules est sans doute réduite. Il est également important de rappeler qu'il n'existe pas de test préétabli en immunologie et que chaque modèle cellulaire a sa propre spécificité et limite vis-à-vis des conditions testées.

Comme les additifs à base de β -glucane sont utilisés dans leur intégralité en alimentation animale, le choix d'un autre modèle de type macrophage semble plus adapté pour tester les préparations contenant des particules. Ainsi, le macrophage dérivé de la moelle osseuse de souris (BMDM) a été proposé à ce stade de l'étude afin de tester la totalité des produits. Ce modèle est particulièrement intéressant car il représente également la première cible cellulaire du système immunitaire lors d'une ingestion de β -glucanes puisqu'il est localisé le long du tractus digestif. Le macrophage est également capable de phagocyter les particules mais contrairement aux neutrophiles et aux monocytes sanguins il réside uniquement dans les tissus.

3.2.2. Activités immunomodulatrices obtenues avec le modèle BMDM

Les macrophages constituent la première ligne de défense de l'organisme et jouent un rôle important (cellules « sentinelles ») dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. D'après des études *in vivo*, les β -glucanes ingérés sont rapidement capturés par les macrophages au niveau de l'intestin qui sécrètent ensuite des médiateurs de l'inflammation comme les cytokines tout en relarguant des petits fragments qui activent les leucocytes circulants. Cette cascade de signalisation est donc à l'origine de la réponse immunitaire¹⁶⁰. L'effet de plusieurs produits testés à différentes concentrations est évalué sur la toxicité et la modulation de la production d'IL-1 β par les macrophages dérivés de moelle osseuse de souris stimulés par une endotoxine (LPS). Ces essais permettent de comparer et de confirmer les activités immunomodulatrices observées sur les PBMC. Contrairement à ces dernières, la présence d'une activité pharmacologique est cette fois-ci examinée à partir du produit complet, en présence de particules.

D'après la **figure 37A**, le LPS est utilisé à une concentration non cytotoxique pendant 24h. Les références internes anti-inflammatoires (ZVAD, PRED et DEXA) ne présentent aucune cytotoxicité et ne modifient pas l'augmentation de la prolifération cellulaire induite par le LPS. Utilisée à la concentration de 1 mg.mL⁻¹, le témoin β -Glucane Megazyme est le seul qui ne modifie pas l'augmentation de la prolifération cellulaire provoquée par le LPS contrairement aux autres produits qui l'inhibe sans être cytotoxique, hormis MacroGard dont la cytotoxicité s'élève à 60% vis-à-vis du contrôle milieu de culture. Utilisés à des concentrations inférieures ou égales à 0.1 mg.mL⁻¹, l'ensemble des témoins ainsi que les extraits de culture ne modifient pas la prolifération cellulaire induite par le LPS (**Figure 37B et C**). Les niveaux restent d'ailleurs identiques quel que soit l'échantillon considéré. Des quantités similaires de préparations à base de β -glucane de *C. versicolor* et *S. cerevisiae* ont été mises en contact avec des macrophages sans induire de cytotoxicité démontrant que ces cellules sont bien adaptées à la présence de particules^{266,267}. Soumis à un stimulus inflammatoire comme le LPS et les polysaccharides fongiques, les macrophages activent plusieurs enzymes de type oxydase notamment l'oxyde nitrique synthase (iNOS), qui libèrent des dérivés réactifs de l'oxygène et de l'oxyde nitrique (NO) qui ont une action cytotoxique envers les pathogènes¹⁶. Des fortes concentrations en NO peuvent cependant affecter la viabilité des macrophages²⁶⁸. L'activation des cellules et la production excessive de NO ou d'autres facteurs cytotoxiques peuvent être à l'origine de la perte de viabilité observée avec la concentration la plus élevée (1 mg.mL⁻¹) du produit MacroGard. L'activation des cellules dans ce cas est confirmée par la stimulation significative de la production d'IL-1 β à la concentration non cytotoxique de 0.1 mg.mL⁻¹ (**Figure 38B**). L'analyse et l'interprétation de la concentration en IL-1 β est acceptable à partir du moment où les échantillons d'une part, n'affectent pas la viabilité cellulaire par rapport au contrôle milieu de culture et d'autre part, n'inhibent pas l'effet prolifératif du LPS.

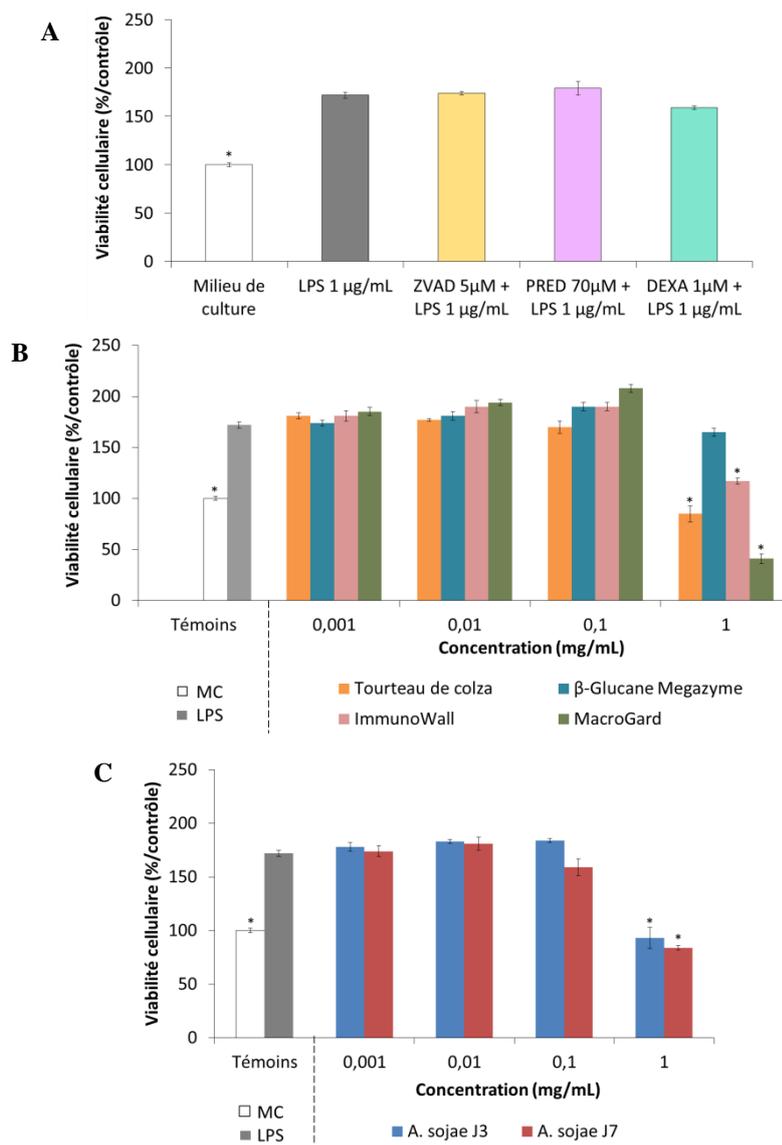


Figure 37. Pourcentage de viabilité cellulaire des BMDM en présence des différents composés testés par rapport au contrôle milieu de culture. **A** : Viabilité dans le milieu de culture seul (MC), en présence de LPS à $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et en présence de LPS $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ additionné des trois références internes anti-inflammatoires (ZVAD à $5 \mu\text{M}$, PRED à $70 \mu\text{M}$ et DEXA à $1 \mu\text{M}$). **B** : Viabilité en présence de LPS à $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ additionné des différents témoins (tourteau seul, β -Glucane Megazyme, ImmunoWall et MacroGard) incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,001, 0,01, 0,1 et $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). **C** : Viabilité en présence de LPS à $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ additionné des extraits de cultures FMS d'*A. sojae* prélevés respectivement le 3^e jour (J3) et le 7^e jour (J7) de culture et incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,001, 0,01, 0,1 et $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). * $P < 0.0001$ par rapport au groupe contrôle représenté par le LPS (ANOVA, test de Dunnett).

En présence de LPS, les références internes anti-inflammatoires (ZVAD, PRED et DEXA) diminuent de 35 à 85% la production d'IL-1 β induite par les BMDM par rapport au LPS seul, validant ainsi l'essai (**Figure 38A**). Parmi les témoins, le β -Glucane Megazyme provoque également une réponse de type anti-inflammatoire à $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ avec une diminution de 70% de la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages stimulés. A cette concentration maximale, il s'agit du seul produit qui n'altère pas la viabilité et la prolifération cellulaire. A $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, MacroGard induit une réponse de type pro-

inflammatoire avec un doublement de la sécrétion de cytokine tandis que le tourteau de colza et ImmunoWall n'ont aucune incidence aux concentrations testées (**Figure 38B**).

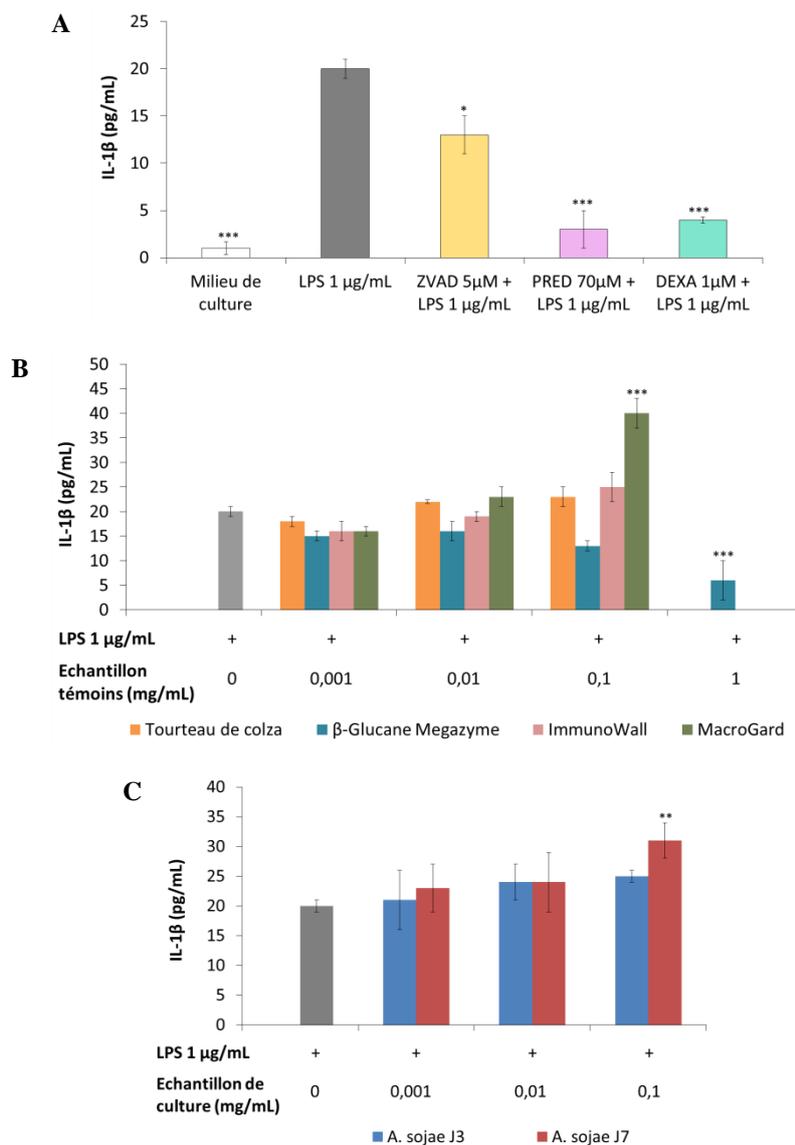


Figure 38. Concentration d'IL-1 β sécrétée par les BMDM en présence des différents composés testés. **A** : Quantité d'IL-1 β dans le milieu de culture seul, en présence de LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et en présence de LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ additionné des trois références internes anti-inflammatoires (ZVAD à 5 μM , PRED à 70 μM et DEXA à 1 μM). **B** : Quantité d'IL-1 β en présence de LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ additionné des différents témoins (tourteau seul, β -Glucane Megazyme, ImmunoWall et MacroGard) incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,001, 0,01, 0,1 et 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). **C** : Quantité d'IL-1 β en présence de LPS à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ additionné des extraits de cultures FMS d'*A. sojae* prélevés respectivement le 3e jour (J3) et le 7e jour (J7) de culture et incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,001, 0,01, 0,1 et 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). *** $P < 0.0001$, ** $P < 0.006$, * $P < 0.03$ par rapport au groupe contrôle représenté par le LPS (ANOVA, test de Dunnett).

ImmunoWall a pourtant eu un effet dose significatif en présence des PBMC mais celui-ci ne s'applique pas aux macrophages, bien que ceux-ci présentent des récepteurs de reconnaissance semblables aux monocytes, la modulation de la sécrétion d'IL-1 β n'est pas impactée dans les conditions testées. De même la suspicion d'une contamination du produit par une endotoxine n'est pas

valide compte tenu des résultats obtenus sur macrophages. Concernant les deux échantillons de cultures d'*A. sojae* sur tourteau de colza, uniquement celui prélevé à 7 jours de culture augmente de façon significative la sécrétion d'IL-1 β à la concentration de 0.1 mg.mL⁻¹ (**Figure 38C**). Les différences entre ces deux échantillons sont la quantité de biomasse mais aussi la présence massive de spores dans la culture la plus âgée. Les spores sont certainement plus accessibles aux macrophages par rapport aux fragments de mycélium car elles sont plus petites et très nombreuses ce qui pourrait amplifier le stimulus. Les macrophages sont d'ailleurs capables de phagocyter aisément les levures ainsi que les spores fongiques en raison de leur taille réduite. L'équipe de Luther *et al.* a démontré que la reconnaissance des molécules de β -glucanes présentes à la surface des conidies d'*A. fumigatus* par les macrophages de souris est cruciale pour le déclenchement de la phagocytose *via* le récepteur Dectin-1. La disponibilité des polysaccharides pour l'interaction avec les récepteurs membranaires est déterminante pour induire une réponse immunitaire chez l'hôte ²⁶⁹. Le contenu en β -glucane est indétectable avec la méthode de dosage employée mais la présence d'une forte concentration de spores implique une augmentation potentielle de la quantité de carbohydrates fongiques ou de molécules bioactives détectables par rapport à la culture à J3 où le microorganisme est essentiellement présent sous forme de mycélium.

Les résultats obtenus sur le modèle BMDM coïncident avec plusieurs études portant sur l'analyse de la sécrétion d'IL-1 β suite à la stimulation des macrophages par des β -glucanes mais dans des conditions non inflammatoires. Les composés d'origine fongique testés sur ce modèle cellulaire proviennent essentiellement de levures et de champignons médicinaux comme la souche-type *G. lucidum*. L'exposition d'une préparation de ce dernier à base de polysaccharides associés à des protéines active les macrophages de manière dose dépendante tout en élevant l'expression du gène codant pour l'IL-1 β ²⁷⁰. D'autres réponses du même type sur les niveaux d'IL-1 β , NO et de TNF- α ont été obtenues *in vitro* avec des macrophages péritonéaux de souris en utilisant différents extraits de *G. lucidum* ²⁷¹. En plus de l'interaction avec le récepteur Dectin-1, des auteurs ont pu mettre en évidence l'implication du récepteur de type toll 4 (TLR4), principalement exprimé à la surface des macrophages, dans la reconnaissance des polysaccharides de *G. lucidum* et la médiation associée à l'expression des gènes de l'interleukine 1 ²⁷². L'ensemble des données trouvées dans la littérature à partir d'essais menés *in vitro* et *in vivo* suggèrent que les β -glucanes fongiques induisent plutôt des réponses de type pro-inflammatoire ²⁷³. En revanche lors d'une préexposition aux composés fongiques la réponse suite à une stimulation par le LPS serait plutôt du type anti-inflammatoire avec une baisse notamment des niveaux d'IL-1 β par inhibition du facteur de transcription NF- κ B. Comme évoqué dans la partie précédente, la suppression de la réponse induite par un agent stimulant explique l'effet protecteur observé dans des études *in vivo* suite à l'administration orale de β -glucane contre les infections bactérienne et les chocs septiques chez la souris. Cette protection est effective grâce à la présence de β -glucane dans le plasma jusqu'à 24h après ingestion ^{16,274,275}. Des éléments supplémentaires montrent toutefois que la réponse des macrophages est considérablement influencée

par la présence de facteurs dérivés de microorganismes ainsi que des cytokines qui font également partie intégrante de l'environnement inflammatoire²⁷⁶. Les extraits de culture testés dans cette étude ainsi que le produit MacroGard, pourtant concentré en β -glucane de levure, n'ont pas eu d'effet inhibiteur par rapport à un stimulus provoqué par le LPS, mais au contraire amplifie le signal pro-inflammatoire de ce dernier. La réponse est d'ailleurs opposée à celle obtenue avec les cultures FMS ou de mycélium en utilisant le modèle PBMC. Ces résultats sont difficiles à interpréter étant donné que l'unique dosage de l'interleukine-1 β ne permet pas de conclure en ce qui concerne la réponse biologique effective occasionnée par les composés testés.

Quel que soit le modèle cellulaire utilisé, les extraits de culture FMS permettent d'obtenir des effets immunomodulateurs significatifs par rapport au tourteau de colza seul. La souche *A. sojae* semble prometteuse d'après les essais menés. Dans les conditions testées, les différents témoins riches en β -glucane de levure n'induisent pas systématiquement une réponse par rapport à la modulation de la production d'IL-1 β sur PBMC et BMDM. D'après les données issues de la littérature, ce phénomène est sans doute lié aux caractéristiques de ces derniers (composition, qualité, solubilité, etc). Les polysaccharides représentent un des composés les plus abondants dans les champignons. Les multiples effets pharmacologiques associés peuvent être attribués, en dehors des β -glucanes, à de nombreux autres composés d'origine microbienne. L'influence de ces derniers sur le système immunitaire a déjà été démontrée mais des recherches supplémentaires restent nécessaires pour les caractériser ainsi que pour valider leurs applications médicinales^{236,277}.

4. Conclusion

Ce chapitre a permis de mettre en évidence une activité biologique d'intérêt à partir d'échantillons provenant de champignons supérieurs et inférieurs cultivés sur tourteau de colza. Cette approche est inédite dans le cas d'échantillons provenant de fermentation en milieu solide contenant à la fois la biomasse fongique et le substrat solide. L'exploration des propriétés pharmacologiques est jusqu'à présent limitée aux levures et aux champignons supérieurs médicinaux. Ces travaux visent également à évaluer le potentiel des champignons inférieurs qui reste inexploré jusqu'à présent. Sachant que d'après la littérature la molécule bioactive principalement responsable des réponses immunitaires est le β -glucane, les différents modèles cellulaires choisis sont des cellules immunitaires de type phagocyte présentant les récepteurs adaptés à la reconnaissance des polysaccharides fongiques. Les échantillons provenant de culture en milieu solide n'avaient jamais été testés dans les modèles *in vitro* qui ont été appliqués dans le cadre de ce travail.

Dans un premier temps, afin de pouvoir détecter une activité immunomodulatrice dans le cadre d'un screening, un test simple et rapide à mettre en place a été appliqué, à savoir le test NBT. L'utilisation de préparations commerciales contenant des β -glucanes de levure confirme l'implication

des polysaccharides fongiques avec l'obtention d'un effet dose significatif sur les neutrophiles de sang humain. Les résultats suggèrent toutefois que l'activation des cellules n'est pas uniquement liée à la quantité administrée mais au degré de pureté et aux techniques de purification employées qui impactent la composition, la structure et les caractéristiques physicochimiques des molécules. La qualité des produits commerciaux est donc primordiale pour exercer un effet sur le système immunitaire. Une série de plusieurs essais, effectués à partir d'extraits de culture FMS et de mycélium, a ensuite démontré que parmi les souches étudiées, *T. versicolor* ATCC et *A. sojae* sont les plus prometteuses concernant la stimulation des neutrophiles. Il est bien connu que la structure des β -glucanes varie selon la source ce qui a des conséquences directes sur leurs propriétés biologiques. De plus, comme aucune méthode d'extraction n'a été réalisée, d'autres composés peuvent également influencer la réponse cellulaire. Le problème majeur concernant ces essais est la variation de la réponse immunitaire suivant les différents échantillons de sang utilisés. C'est pourquoi les résultats obtenus sur les souches sélectionnées ont été confirmés avec d'autres modèles plus conventionnels de culture cellulaire dans le but d'obtenir des résultats plus fiables et de s'affranchir de cette hétérogénéité.

Le profil pharmacologique des différents produits a été établi sur la réponse inflammatoire des PBMC et BMDM stimulés par une endotoxine (LPS). En plus des échantillons de culture (FMS et mycélium) différentes préparations à base de β -glucane de *S. cerevisiae* (β -Glucane Megazyme, ImmunoWall et MacroGard) ont été incluses comme témoin avec le tourteau de colza pour en déterminer les effets sur les modèles cellulaires.

L'approche initiale avait pour but de vérifier la présence d'une activité pharmacologique dans la partie majoritairement soluble des produits testés sans toxicité pour le modèle le plus adapté des cellules immunitaires circulantes, les PBMC. Dans cette étude, les échantillons provenant des deux souches ont la capacité de moduler la fonction immunitaire innée en inhibant la sécrétion d'IL-1 β par les PBMC stimulées de manière dose dépendante, ce qui est en accord avec d'autres travaux réalisés à partir d'extraits fongiques dans le cadre d'un stimulus inflammatoire. Le mycélium, pourtant beaucoup plus concentré en biomasse, induit un effet similaire par rapport aux cultures FMS. L'unique réponse du témoin ImmunoWall laisse également supposer que la quantité de β -glucane n'est pas la principale cause de l'effet observé puisque les autres produits commerciaux sont également concentrés en polysaccharides. Ces résultats rejoignent les hypothèses évoquées précédemment concernant la corrélation entre la réponse immunitaire, la quantité de β -glucane et les caractéristiques des molécules impliquées. Par rapport au type de réponse induite, à savoir pro- ou anti-inflammatoire, les études *in vitro* restent insuffisantes pour aller plus loin dans les interprétations d'autant plus qu'une certaine variabilité a été rapportée concernant la production de cytokines suivant les conditions inflammatoires testées.

L'utilisation du modèle BMDM, représentant la première cellule cible du système digestif, permet de tester l'intégralité des échantillons en incluant toutes les particules. Contrairement aux PBMC, la quantité d'IL-1 β est augmentée avec la culture FMS d'*A. sojae* renforçant la réponse de type pro-inflammatoire provoquée par le LPS. Ce résultat est en contradiction avec la documentation scientifique rapportant majoritairement des effets de type anti-inflammatoire qui renvoient au rôle protecteur des β -glucanes dans les modèles *in vivo*. La réponse obtenue dans cette étude est significative uniquement avec l'échantillon de culture le plus âgé ce qui laisse sous-entendre qu'une biomasse importante est nécessaire mais aussi qu'une participation des spores présentes en plus grande quantité est également possible. Cette source additionnelle de polysaccharides fongiques est sans doute plus accessible par rapport au mycélium qui est lié aux particules du tourteau de colza. La modulation de la sécrétion de cytokine est également distincte pour les témoins par rapport aux résultats obtenus sur PBMC insinuant une spécificité de la réponse immunitaire propre au type cellulaire considéré. D'après la littérature les leucocytes sont considérablement influencés par la composition des préparations à base de polysaccharides fongiques et l'environnement inflammatoire (doses, toxines, autres cytokines etc.). L'absence d'information à propos de la composition des échantillons et la sensibilité des cellules vis-à-vis des molécules présentes ne permet pas de conclure sur ces points. Quel que soit le modèle cellulaire considéré, la concentration maximale testée a dû être limitée en raison d'une cytotoxicité ou d'une inhibition de l'effet prolifératif du LPS pour les macrophages. Il est important de rappeler que chaque test *in vitro* a ses propres limitations en comparaison de l'efficacité et du pouvoir des expérimentations *in vivo*. Mais le criblage rapide concernant les effets biologiques d'intérêt d'un grand nombre de produits n'est pas toujours faisable dans des conditions *in vivo* en considérant l'aspect financier et éthique. Ces analyses sont toutefois nécessaires pour développer des applications spécifiques en particulier celles touchant à l'immunologie et à l'élaboration de traitements thérapeutiques.

Malgré le manque de connaissance actuel sur les mécanismes responsables de la médiation de la réponse immunitaire, les résultats présentés dans ce chapitre sont intéressants et ouvrent la voie à des études complémentaires particulièrement concernant la caractérisation des molécules impliquées et la confirmation de la présence d'une activité pharmacologique *in vivo* chez le poulet. La fermentation en milieu solide est un procédé particulièrement bien adapté pour l'élaboration d'un aliment fermenté fonctionnel capable d'améliorer la santé et les performances en zootechnie puisque l'entièreté de la culture peut être utilisée. Cet additif pourrait constituer une nouvelle stratégie pour améliorer la résistance des animaux d'élevage tout en valorisant la matière première, le tourteau de colza. Enfin, cette étude ouvre également des perspectives concernant la recherche de molécules bioactives chez les champignons inférieurs tels qu'*Aspergillus sojae* qui est déjà populaire pour ses applications en alimentation humaine.

CHAPITRE IV

OPTIMISATION DU PROCÉDÉ DE CULTURE EN MILIEU SOLIDE ET CHANGEMENT D'ÉCHELLE

1. Introduction

Un certain nombre de facteurs sont à considérer pour développer et mener à bien un procédé de fermentation en milieu solide. Bien que le substrat solide, le tourteau de colza, soit imposé dans ce projet, la sélection du microorganisme le plus adapté par rapport aux objectifs fixés est une première étape clé. Ainsi, parmi tous les microorganismes testés, *A. sojae* a été retenue comme étant la souche la plus performante concernant l'enrichissement en protéine du tourteau de colza et l'activité immunomodulatrice déterminée *in vitro* sur cellules immunitaires. L'utilisation de matières premières naturelles pour une application en alimentation animale permet de valoriser l'entièreté du produit fermenté et simplifie le traitement en aval qui consiste à sécher la culture sans étape intermédiaire directement dans le réacteur. Cet aspect est avantageux par rapport à une mise en œuvre d'opérations plus longues et coûteuses d'extraction de composants d'intérêt qui sont susceptibles de poser plus de difficultés notamment concernant la purification du produit final.

De nombreuses avancées ont été effectuées pour comprendre les aspects techniques de la fermentation en milieu solide et caractériser les paramètres les plus importants afin de les optimiser. Ces paramètres sont d'ordres physicochimiques et biochimiques, ils incluent par exemple la taille des particules, les prétraitements du substrat, l'humidité relative, le pH, la température, l'agitation et l'aération, l'addition de nutriments et d'inducteurs, l'âge et la quantité d'inoculum, etc. La température est un paramètre incontournable en FMS car elle influence particulièrement la croissance des microorganismes, la sporulation et la formation des produits. La chaleur métabolique générée *via* la respiration des microorganismes est difficile à évacuer en raison de la faible conductibilité thermique des substrats solides. La régulation de la température est par conséquent étroitement liée à l'aération du système et au taux d'humidité. La teneur en eau doit être suffisante pour limiter l'évaporation mais ne doit pas être trop élevée sous peine de diminuer la porosité et les transferts de nutriments et d'oxygène au sein de la matrice solide^{10,278}. Une granulométrie bien étudiée, résistante au phénomène de compaction, facilite le passage de l'air qui entre plus facilement en contact avec les microorganismes¹⁰³. En tant qu'organisme hétérotrophe, les champignons filamenteux utilisent des sources de carbone organiques pour se développer comme les polysaccharides constitutifs des parois végétales. Les sucres simples comme le glucose, fructose et le saccharose sont les plus couramment utilisés en laboratoire dans les études d'optimisation car ils sont plus facilement assimilables par les microorganismes²⁷⁹. Ces derniers doivent cependant être bien équilibrés par rapport au contenu en azote également nécessaire au développement de la biomasse microbienne²⁸⁰. Le type et la concentration des sources d'azote et de carbone ainsi que le ratio C/N jouent un rôle important dans la croissance des microorganismes. La modification des nutriments est une des stratégies la plus efficace pour améliorer les performances de croissance et orienter la production de métabolites cibles²⁸¹.

Les principales difficultés d'un procédé FMS sont mises en évidence au stade laboratoire lors des premières études qui sont généralement réalisées sans aération en utilisant des modèles très simples comme la fiole ou plus complexes sous forme de miniréacteur faisant intervenir un système d'aération active. Ces derniers sont des outils intéressants en phase d'optimisation car ils font circuler de l'air saturé en eau à travers les couches du substrat ce qui permet d'avoir un premier aperçu des conditions à mettre en place pour améliorer et développer le procédé^{105,107}. L'augmentation d'échelle en bioréacteur représente un défi majeur pour surmonter les effets liés aux phénomènes de transport de masse et de chaleur. Plusieurs approches sont disponibles en utilisant notamment des systèmes de refroidissement par aération forcée. L'agitation a également son importance pour garantir une uniformité du développement microbien et des réactions biochimiques. Différents designs de réacteur ont été développés mais uniquement quelques-uns comme le réacteur à couche profonde et à aération forcée ont fait leur preuve à plus grande échelle^{9,105}. L'objectif de ces installations est le maintien des conditions de culture optimales, par conséquent, une régulation efficace des paramètres est indispensable pour développer les procédés à l'échelle industrielle.

Ce dernier chapitre est divisé en plusieurs parties, chacune consacrée à une étape de mise au point du procédé FMS qui est progressivement orienté vers le changement d'échelle. L'objectif est de produire un maximum de biomasse afin d'atteindre des niveaux élevés en composés immunomodulateurs notamment en β -glucanes, en optimisant les conditions et le milieu de culture. Après la détermination des paramètres optimaux de croissance propres à la souche *A. sojae* sur milieu gélosé, une série de culture est d'abord réalisée en fiole Erlenmeyer sur tourteau de colza. Ces premiers essais visent à évaluer les besoins de la souche en matière de nutriments *via* la supplémentation en source d'azote et de carbone. L'influence de l'aération est également mise en évidence. L'optimisation se poursuit par le passage en condition aérée en utilisant les miniréacteurs qui constituent la première étape pour définir les paramètres de contrôle de la fermentation avec une attention particulière portée à l'évolution de la respiration, la température et la teneur en humidité. Une étude complémentaire est effectuée en intégrant séparément des sources d'azote et de carbone ainsi que des graines de tournesol choisies en tant qu'agent aérant avant d'aboutir aux cultures en réacteur pré-pilote de 50 L (CNS). L'ensemble du système utilisé permet d'étudier la conduite du procédé FMS en couche profonde en appliquant une stratégie visant à maintenir les conditions de croissance optimales de la souche. Le changement d'échelle implique également la mise au point d'un inoculum adapté et de nouvelles conditions de prétraitement du substrat solide.

2. Matériels et méthodes

2.1. Plages de températures et de pH

La méthode consiste à mesurer l'évolution du diamètre de croissance d'une colonie d'*A. sojae* au cours du temps en boîte de Pétri. Le milieu gélosé PDA est utilisé pour l'ensemble des essais. Les boîtes sont incubées à 20, 25, 30, 35 et 37°C pour réaliser les plages de températures (pH : 5.6 ± 0.2). En ce qui concerne les plages de pH, le milieu est ajusté à pH 3, 4, 5, 6, 7 et 8 ± 0.2 avec une solution acide (H_2SO_4 1M) ou basique (NaOH à 1M) incorporée à la gélose en surfusion maintenue à 65°C sous agitation magnétique. Ces boîtes sont ensuite incubées à 25°C une fois inoculées. L'ensemencement au centre de chaque boîte est réalisé avec une goutte de 5 μ L d'une suspension de spores issue de la banque de travail d'*A. sojae* CBS 100934 en tube de gélose inclinée. Trois boîtes sont utilisées respectivement pour chaque condition testée. Deux mesures quotidiennes du diamètre de la colonie sont effectuées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre pendant 5 à 7 jours suivant l'évolution du diamètre de croissance. Les dimensions du diamètre de la colonie sont exprimées en centimètre moyen \pm écart-type.

2.2. Prétraitement thermique du substrat solide

Le tourteau de colza et les graines de tournesol sont préparés à des quantités correspondantes aux besoins des essais pour le changement d'échelle (45 g à 4 kg brut). Après une préhumidification, les substrats solides subissent un passage à l'autoclave réglé à une température de 121°C avec une durée de cycle qui varie de vingt minutes à une heure. A la sortie de chaque traitement thermique, un échantillon est prélevé en triplicata et incorporé en fiole Erlenmeyer dans des conditions stériles. Une fois le pourcentage de matière sèche ajusté à 40% avec de l'eau stérile, les fioles sont mises à incuber à l'étuve à 30°C. Après trois jours d'incubation, des étalements concentrés (cf. partie 2.6.3.) sont effectués sur PCA en boîte de Pétri pour évaluer l'efficacité des traitements thermiques par rapport à la destruction des contaminants endogènes aux substrats solides utilisés.

2.3. Cultures en fiole Erlenmeyer

Les fioles Erlenmeyer contiennent chacune 45 g brut de tourteau de colza lot 3 qui est d'abord préhumidifié puis stérilisé 20 minutes à 121°C, excepté pour les essais réalisés sur substrat non stérile. L'ensemencement à 1.10^7 spores.g⁻¹ est réalisé à partir d'une préculture d'*A. sojae* effectuée en fiole de Roux sur milieu gélosé PDA préalablement incubée à 30°C pendant 5 jours. La suspension de spores est obtenue par grattage de la surface de la gélose en présence de Tween 80 à 0.1%. Après l'ajustement à 40% de matière sèche, la hauteur de couche humide atteint 3 cm. Deux mesures du

pourcentage de CO₂ sont effectuées par jour à l'aide d'un analyseur de gaz (canal 120, Vigaz). Les cultures sont incubées à 30°C. Plusieurs fioles par série sont préparées afin d'effectuer les prélèvements en triplicata et en cinétique au cours de la fermentation.

- Supplémentation en carbone et azote

Au moment de l'ensemencement, différentes séries de fioles sont réalisées en intégrant des sources de carbone et d'azote exprimées en pourcentage par rapport au poids sec du tourteau. Le carbone est incorporé sous forme de glucose à hauteur de 1% tandis que l'azote est additionné à 0.1 et 0.5 % en utilisant le sulfate d'ammonium. Deux couples sont formés pour obtenir des apports de C/N de 10 et 2. Ces suppléments ne modifient pas le pH ni le pourcentage initial de matière sèche.

- Agitation et aération des cultures

L'ouverture des fioles est réalisée quotidiennement dans des conditions stériles, sous hotte à flux laminaire, après les mesures de CO₂. Les cultures sont homogénéisées à l'aide d'une pipette stérile.

- Culture sur tourteau non stérile et modification du pH initial

Le tourteau de colza est directement utilisé sans traitement thermique préalable. Plusieurs séries de fioles sont préparées en ajustant le pourcentage initial de matière sèche à 40% avec de l'eau stérile en présence ou en absence d'inoculum. Le pH initial du milieu est ajusté à 4 avec une solution d'H₂SO₄ à 5M.

2.4. Cultures en miniréacteur aéré

2.4.1. Présentation du matériel et suivi des paramètres de culture

Les miniréacteurs d'une capacité d'un litre, fabriqués entièrement en verre pyrex, sont munis d'une grille en acier inoxydable sur laquelle repose le substrat solide (**Figure 39**). Ils sont placés dans une étuve ventilée et sont alimentés par de l'air stérile dont le débit, la température et l'humidité relative peuvent être régulés. Les miniréacteurs sont connectés en série sur une rampe en verre qui est elle-même directement branchée à la sortie d'air des réacteurs pré-pilotes CNS. Les paramètres de l'air entrant dans les réacteurs sont contrôlés à partir du panneau de commande des CNS (cf. partie 2.5.1.). L'acquisition des données est réalisée en continue par le programme FLOEE (Biosystèmes). L'ensemble du dispositif est préalablement pasteurisé à la vapeur pendant trois heures avant le branchement des réacteurs.

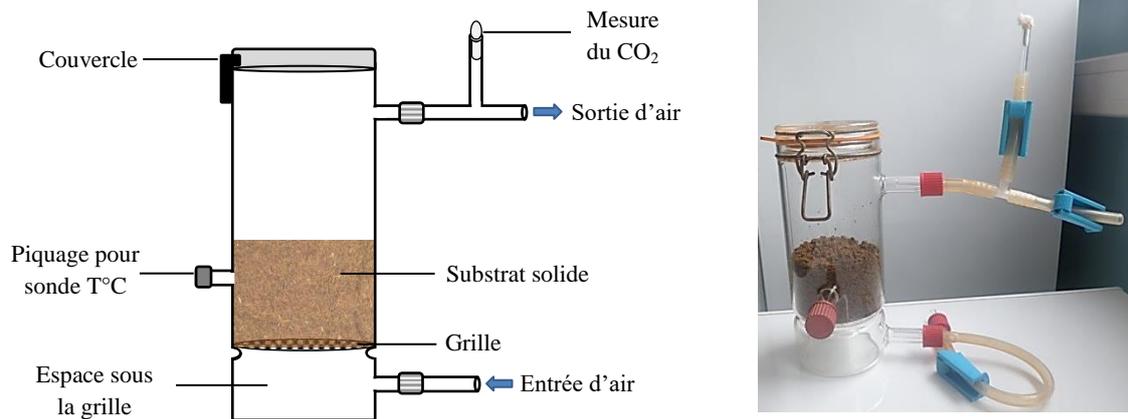


Figure 39. Schéma et photo d'un miniréacteur avec branchements

Des mesures de températures peuvent être relevées dans la couche en insérant une sonde de température au niveau de l'ouverture centrale placée au-dessus de la grille, mais cette opération peut compromettre la stérilité du procédé. C'est pourquoi les relevés réguliers de la température de sortie sont préférables à l'aide d'un thermomètre portable (HI 93510, HANNA). Le débit d'air en sortie est régulièrement mesuré à l'aide d'un anémomètre (Testoterm 4400). Un dispositif a été mis en place afin de mesurer indirectement la production de biomasse *via* la génération de CO_2 lors du développement de la moisissure (mesures estimatives). Comme pour les fioles Erlenmeyer, cette mesure n'a jamais été réalisée sur ce type de matériel dépourvu d'un enregistrement en ligne. Elle est effectuée avec un analyseur de gaz après dix minutes de coupure de l'aération à l'aide de clamps disposés au niveau de l'arrivée et de la sortie d'air. Ce laps de temps est suffisant pour accumuler le CO_2 dans l'espace de tête et le rendre détectable par l'appareil. Le gaz à l'intérieur de chaque réacteur est prélevé à l'aide d'une aiguille traversant le bouchon en coton. La vitesse spécifique maximale de croissance (μ_{max}) ainsi que la biomasse maximale associée (X_m) sont obtenues suivant la méthodologie décrite dans le chapitre II, partie 2.5. Il est possible d'agiter manuellement la culture à l'aide d'une pipette stérile sous hotte à flux laminaire après le décrochage des réacteurs et la fermeture des clamps. La perte de masse sèche ne peut pas être déterminée avec ce matériel en raison de la présence de condensats dans l'espace sous la grille et d'humidité au niveau de l'espace de tête et dans les conduits d'entrée et de sortie d'air.

2.4.2. Ensemencement et conditions de culture

Chaque miniréacteur est stérilisé vide à l'autoclave 30 min à 121°C en même temps que les fioles Erlenmeyer contenant 90 g brut de tourteau de colza préhumidifié. Les graines de tournesol provenant de la société Saipol (Bassens), utilisées en tant que cosubstrat sont autoclavées à part pendant 40 min à 121°C . Les réacteurs sont ensuite chargés avec le substrat solide sous hotte à flux laminaire. Concernant les essais en présence de tournesol, celui-ci est mélangé à hauteur de 30% (38.5

g brut) avec le tourteau de colza. L'ajustement du pourcentage de matière sèche à 40% est effectué avec de l'eau stérile contenant les spores d'*A. sojae* afin d'obtenir un taux de 1.10^7 spores.g⁻¹ de matière sèche. La procédure de préparation des précultures et l'obtention de l'inoculum est identique à celle décrite pour les essais en fioles Erlenmeyer (cf. partie 2.3.). Une fois inoculé, la hauteur de couche atteint 6 cm pour le tourteau de colza seul et 7.5 cm pour le mélange avec le tournesol. La température de l'étuve et de l'air entrant dans les miniréacteurs est réglée à 25°C ou 28°C selon les essais avec une humidité relative proche de 90%. Le débit d'air en sortie des fermenteurs est ajusté régulièrement entre 2 et 3 L.min⁻¹. Ce débit est suffisant pour faire passer l'air à travers la couche tout en maintenant la teneur en humidité de la culture. Une agitation est réalisée par jour en condition stérile dès l'apparition de mycélium au moment du pic de CO₂ afin d'homogénéiser les cultures et éviter la formation de chemins préférentiels.

Plusieurs séries, chacune composée de trois miniréacteurs, sont réalisées avec une supplémentation en source de carbone seule ou d'azote seule. Ces apports de nutriments sont testés sur deux substrats solides, à savoir le tourteau seul et le tourteau mélangé à 30% de graines de tournesol. Les témoins respectifs sont représentés par le substrat solide sans apports. Le carbone est additionné à 1% par rapport au poids sec du tourteau en utilisant du glucose ou du saccharose tandis que l'azote est apporté à hauteur de 0.1% avec du sulfate d'ammonium. A l'issue de ces essais une étude complémentaire a été effectuée en utilisant le meilleur substrat avec différentes concentrations de carbone (1, 5 et 10%) sous forme de saccharose. L'addition de nutriments ne modifie pas les conditions initiales hormis pour les fortes concentrations en carbone de 5 et 10%, nécessitant un ajustement initial du pourcentage de matière sèche à 45% au lieu de 40%.

2.5. Culture en cuves non stériles (CNS)

2.5.1. Présentation du matériel et suivi des paramètres de culture

Les cultures sont menées dans deux cuves en acier inoxydable, de capacité maximale 50 L, comportant chacune un couvercle ainsi qu'un panier à fond perforé dans lequel repose le substrat solide (**Figure 40**). Elles sont alimentées en parallèle avec de l'air humidifié qui traverse de bas en haut la couche de culture. Le débit d'air est réglé en amont du système et peut être réajusté régulièrement en cours de fermentation grâce à la présence de vannes de réglage disposées à l'entrée de chaque cuve. Celles-ci permettent de limiter les variations de débits entre les deux cuves liées à la formation de chemins préférentiels. L'humidité relative est régulée par un bain-marie qui génère plus ou moins de vapeur selon les consignes demandées sous l'action d'une résistance électrique et d'un circuit d'eau froide. La vapeur est entraînée dans les conduits par l'air qui est injecté en continu au fond du bain-marie. La température de l'air en entrée des cuves est ajustée lors de son passage dans un échangeur de chaleur. Ces paramètres sont contrôlés à partir d'un régulateur PID Eurotherm qui

corrige automatiquement les perturbations afin de garder une valeur de consigne constante. L'acquisition des données est réalisée en continue par le programme FLOEE (Biosystèmes). Les paniers perforés sont stérilisés à vide par un passage à l'autoclave 30 min à 121°C, tandis que le système est entièrement pasteurisé à la vapeur pendant trois heures.

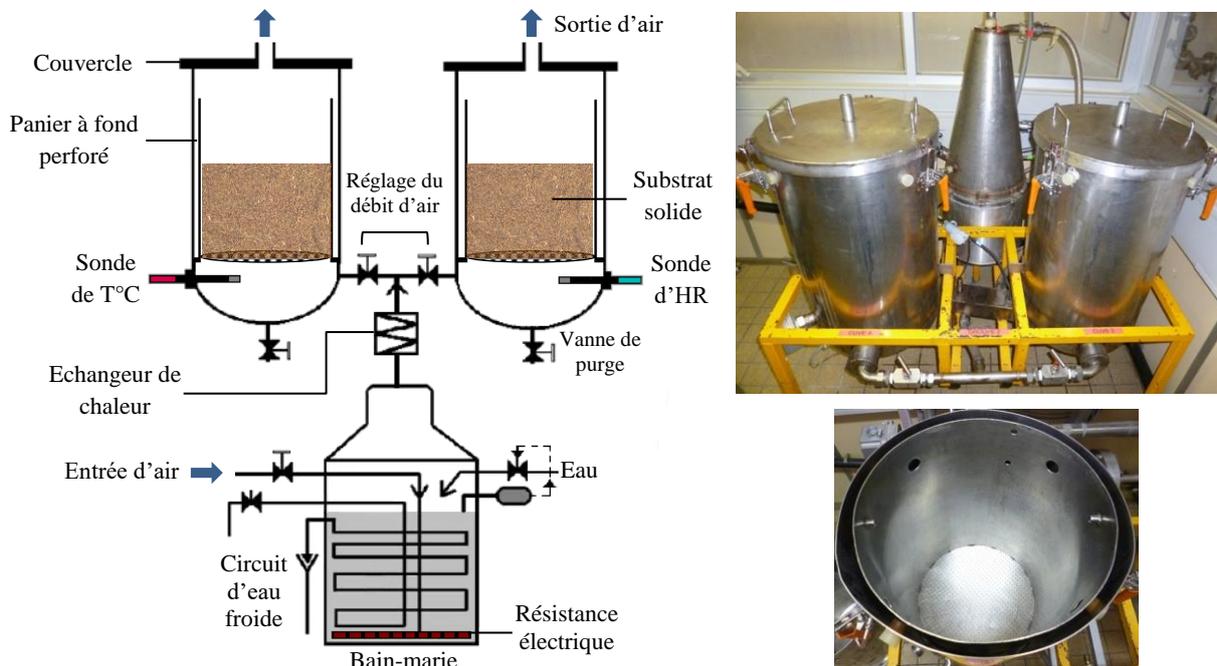


Figure 40. Schéma et photos d'un groupe CNS, adapté de Durand 2003¹⁰⁵. T°C : température ; HR : humidité relative.

A des intervalles de temps réguliers, des mesures de débit d'air et de température peuvent être effectuées dans l'air en sortie et en différents points dans la culture en enfonçant la sonde du thermomètre portatif. Il est possible d'agiter manuellement la culture à l'aide d'une griffe de jardin en acier à long manche préalablement stérilisé. Comme pour les miniréacteurs, le pourcentage de CO₂ peut être mesuré au niveau de l'espace de tête avec un analyseur de gaz après dix minutes de coupure de l'aération en introduisant un bouchon en coton au niveau de la sortie d'air (mesures estimatives).

2.5.2. Précultures en milieu solide

La production de spores d'*A. sojae* est réalisée en fiole Erlenmeyer sur pulpe de betterave ou son de blé (Dijon céréales). Les fioles contenant chacune 30 g de substrat brut, sont stérilisées 20 minutes à 121°C à l'autoclave. Le milieu est ajusté à 40% de matière sèche avec de l'eau stérile contenant les spores à 1.10^7 spores.g⁻¹ obtenues à partir d'une préculture d'*A. sojae* effectuée en fiole de Roux. Les cultures sont incubées à 30°C et trois fioles sont prélevées après 3, 5 et 7 jours de culture pour le dénombrement des spores au cours du temps. L'extraction des spores est réalisée par broyage du milieu solide pendant 30 secondes à l'aide d'un blender de laboratoire (Waring) réglé sur vitesse

rapide en présence d'eau suivie d'une filtration sur gaze hydrophile pour éliminer les grosses particules. Le comptage des spores est ensuite effectué en triplicata à la cellule de Malassez. Les résultats sont exprimés en nombre de spores totaux par fiole \pm écart-type.

2.5.3. *Ensemencement et conditions de culture*

Le tourteau de colza seul ou avec 30% de tournesol est préhumidifié avant son passage à l'autoclave puis transféré humide dans chaque panier des CNS pour un passage à l'autoclave 1 heure à 121°C en cycle solide pour éviter l'accumulation d'humidité sur les parois. Les paniers sont ensuite directement positionnés dans les cuves préalablement pasteurisées. Le milieu de culture est d'abord ajusté à pH 4 avec une solution d' H_2SO_4 5M. L'inoculum est préparé en incorporant les précultures solides (cf. partie 2.5.2.) directement dans des bombonnes Nalgène contenant la quantité d'eau stérile nécessaire pour atteindre un pourcentage initial de matière sèche de 40% ou 45% en présence de 5% de carbone. Ce dernier est incorporé sous forme de saccharose dilué au préalable dans l'eau servant à la préparation de l'inoculum. Une fois homogénéisé, le mélange contenant les spores est versé lentement sous agitation manuelle. Le taux d'ensemencement reste fixé à 1.10^7 spores.g⁻¹ de matière sèche. La hauteur de couche est variable selon les essais réalisés (11 à 16 cm) avec une quantité totale de substrat de l'ordre de 3 kg brut pour le tourteau seul et 4.5 kg avec le mélange avec 30% de tournesol. La température de l'air en entrée est réglée à 25°C ou 28°C selon les essais avec une humidité relative fixée à 85%. Le débit initial est ajusté à 200 L.min⁻¹. En fonction de l'évolution de la température du milieu mesurée dans chaque cuve à quatre endroits différents dans la masse, les consignes de régulation de l'air à l'entrée sont modifiées de façon à éviter un échauffement de la culture. Une agitation est réalisée par jour au moment du pic de CO_2 afin d'homogénéiser les cultures et éviter la formation de chemins préférentiels. Cette agitation nécessite une ouverture des cuves entraînant inévitablement un risque de contamination malgré le maintien du débit d'air.

2.6. Analyse des échantillons

2.6.1. *Dosage des β -glucanes*

Le dosage des β -glucanes est effectué sur les échantillons secs selon la méthode Mégazyme décrite dans le chapitre III, partie 2.2.

2.6.2. *Dosage des sucres*

La quantité de saccharose et de glucose présente dans les échantillons de culture est déterminée par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Les échantillons secs sont

d'abord broyés à l'Ultra-turrax pendant 30 secondes à 9500 rpm en présence d'eau osmosée puis centrifugés 10 minutes à 3500 rpm. Le surnageant est filtré sur membrane nylon 0.45 μm (Miller HN, Millipore) avant analyse. La chaîne HPLC Waters est composée d'une pompe 1525, d'un injecteur 717 plus autosampler, d'un four à colonne et d'un réfractomètre 410. La séparation des carbohydrates est réalisée à partir d'une colonne Aminex HPX-87H (Bio-Rad) chauffée à 30°C et parcourue par une solution d'acide sulfurique à 5 mM à un débit de 0.6 mL.min⁻¹. La concentration en sucre est calculée à partir du logiciel Empower 3 (Waters) en prenant en compte la courbe de calibration correspondante à chaque sucre. La quantité de ces derniers est exprimée en pourcentage par rapport au poids sec du milieu de culture.

2.6.3. Qualité microbiologique

- Etalement concentré

Environ 5 g d'échantillon sont incorporés dans un pot stérile et agités à l'aide d'un vortex en présence de 6 à 10 mL d'une solution stérile de NaCl à 9 g.L⁻¹ afin d'obtenir une solution homogène et concentrée au maximum. Les étalements sont effectués à l'ose par stries régulières sur la surface de la gélose PCA en boîte de Pétri. Trois boîtes sont réalisées par échantillon. L'absence ou la présence de colonies est constatée après 72h d'incubation à 30°C.

- Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale

10 g d'échantillon de culture sont broyés à l'Ultra-turrax pendant 30 secondes en présence de 90 mL d'une solution stérile de NaCl à 9 g.L⁻¹. Après avoir effectué des dilutions en cascade, des étalements en spirale sont effectués dans des boîtes de Pétri contenant du milieu PCA avec un enseigneur automatique Eddy Jet 2 (IUL Instruments). Trois répétitions sont réalisées par dilution. Les unités formants colonies (UFC) sont ensuite dénombrées après 24 à 72h d'incubation à 30°C. Les résultats sont exprimés en nombre d'UFC moyen par gramme de matière sèche \pm écart-type.

2.6.4. Activité immunomodulatrice

Les échantillons issus des fermentations en CNS prélevés à 0, 24 et 48h de culture sont préalablement séchés 24h à 105°C et broyés en fine poudre (< 0.5 mm). Ils sont ensuite testés à quatre concentrations (0.001 – 0.01 – 0.1 et 1 mg.mL⁻¹) dans le milieu de culture cellulaire des macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (BMDM) selon le protocole décrit dans le chapitre III, partie 2.3.2. Le test de viabilité cellulaire utilisant le XTT ainsi que le dosage ELISA des IL-1 β sont appliqués suivant la méthodologie décrite dans la chapitre III, partie 2.3.3. et 2.3.4.

2.6. Traitement des données et modélisation

Les différentes analyses statistiques des résultats ainsi que la modélisation des données ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT Base version 2017 (Addinsoft). Une analyse de la variance à un facteur (ANOVA) est utilisée pour comparer les moyennes entre plusieurs échantillons. Un test de comparaisons multiples, le test de Dunnett, est appliqué dans le cas d'une comparaison d'un groupe d'échantillon par rapport à un groupe contrôle. Les différences ont été considérées comme significatives pour un risque $\alpha \leq 5\%$.

3. Résultats et discussion

3.1. Détermination des conditions optimales de croissance d'*Aspergillus sojae*

D'après les résultats présentés dans la **figure 42A**, les températures allant de 30 à 37°C sont les plus favorables pour le développement de la moisissure. Il est important de noter que lors de son développement, le microorganisme génère de la chaleur métabolique. Celle-ci peut être difficile à évacuer en raison d'une mauvaise aération due à la compaction du tourteau de colza au cours du temps. Il serait donc préférable de mener les essais aux alentours de 30°C en raison du risque d'échauffement de la culture. La température d'incubation et/ou d'air injecté pour les essais en réacteur ne doit pas être trop élevée au départ pour permettre une meilleure gestion de la fermentation. Le milieu gélosé, ajusté aux différents pH est incubé à 25°C pour suivre l'évolution des diamètres de croissance des colonies d'*A. sojae* de manière plus précise. D'après la **figure 42B**, le microorganisme tolère une large gamme de pH allant de 4 à 8, seul un pH de 3 semble perturber sa croissance. Le pH de base du tourteau de colza se situant en moyenne autour de 5.5, il ne s'agit pas d'un facteur limitant pour sa croissance.

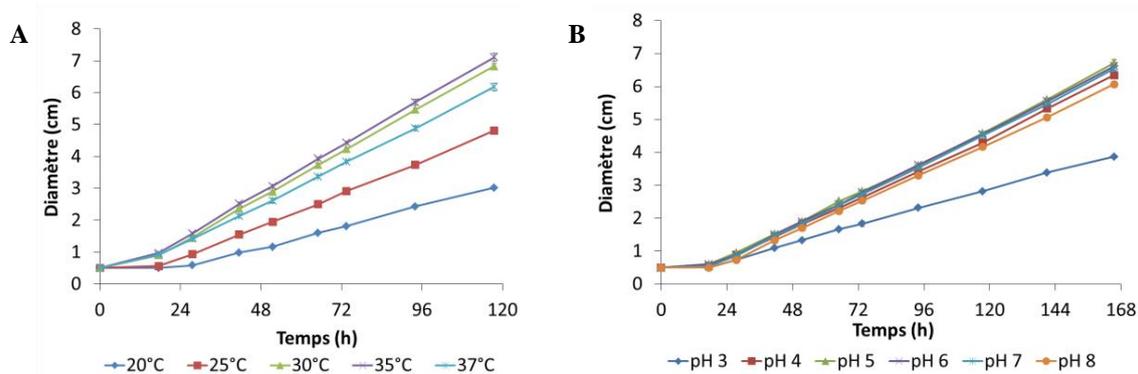


Figure 42. Evolution du diamètre de croissance de la colonie d'*A. sojae* en fonction de la température d'incubation et du pH sur milieu gélosé PDA. **A** : Plages de température. **B** : Plages de pH.

La tolérance d'une souche à pH acide est un avantage dans la mesure où celui-ci peut inhiber le développement de contaminants, notamment les bactéries. Comme le pH est difficile à contrôler en milieu solide, il est préférable d'utiliser un microorganisme capable de croître de façon optimale sur une large gamme de pH.

3.2. Culture d'*Aspergillus sojae* en fiole Erlenmeyer

3.2.1. Effet d'une supplémentation en azote et carbone

Le tourteau de colza contient généralement 5 à 6% d'azote avec un C/N d'environ 8, similaire au tourteau de soja¹⁴⁵. Ces macronutriments constitutifs du substrat végétal, ne sont que partiellement disponibles pour les microorganismes fongiques. En effet, malgré la présence d'enzymes permettant de dégrader la matrice végétale, seule une fraction est assimilable pour la croissance des champignons et la production de biomasse. Sans un apport de sources d'azote et de carbone assimilable, la croissance des microorganismes reste limitée¹²⁵. Contrairement à un procédé de culture en milieu liquide utilisant des milieux synthétiques chargés en nutriments facilement accessibles, le rapport C/N caractéristique du tourteau de colza ne reflète pas un C/N entièrement métabolisable surtout lorsque l'azote digestible est comparé étant donné les variations observées suivant les lots de tourteau (cf. chapitre II, **Tableau 13**). Les travaux effectués en FMS étant quasi inexistant pour *A. sojae*, les données servant de base à cette étude concernent uniquement la souche *A. oryzae* qui fait partie de la même section des *Flavi*. Ces deux espèces, relativement proches au niveau de leur séquence ADN, sont très populaires en Orient car elles ont été depuis longtemps domestiquées par l'homme pour l'élaboration de produits fermentés²⁸². L'enrichissement des milieux de culture avec différentes sources d'azote et de carbone a été largement étudié pour la production d'enzymes, mais peu d'auteurs se sont focalisés sur la biomasse que ce soit par le procédé FMS ou FML. Les sources de carbone les plus couramment testées sont les sucres simples comme le glucose et le saccharose. En ce qui concerne la source d'azote, la plus classiquement utilisée est le sulfate d'ammonium tandis que l'extrait de levure est souvent expérimenté comme source d'azote organique²⁸³⁻²⁸⁵. D'après la littérature, ces dernières sont préférables pour obtenir davantage de biomasse. Cependant, les sources d'azote inorganiques restent peu onéreuses et seraient donc à privilégier dans le cas d'un procédé de production à plus grande échelle.

D'après les résultats présentés dans la **figure 43A** et **B**, par rapport à la série témoin non supplémentée, l'apport d'un C/N de 10 ne modifie pas la croissance du champignon, l'allure de la courbe de CO₂ ainsi que les paramètres de cinétiques sont similaires. Le C/N global du milieu (tourteau avec apports) reste quant à lui inchangé compte tenu des faibles quantités incorporées. L'influence de l'addition d'une source d'azote facilement métabolisable comme le sulfate d'ammonium est mise en évidence avec un apport de C/N de 2. Dans ce cas, la croissance est

accélérée avec un pic de CO₂ relevé dès 24h de culture et des valeurs plus élevées concernant les paramètres de cinétique. L'extrait de levure a également été testé lors d'un autre essai (données non présentées) mais la différence entre les deux sources d'azote est minime, la souche ne semble donc pas avoir de préférence vis-à-vis de celles-ci. Malgré les différences observées, les contenus en β -glucanes restent indétectables quelles que soient les conditions testées. La méthode de dosage employée (Megazyme) n'est probablement pas assez sensible pour mettre en évidence une différence entre les séries. Ces résultats montrent toutefois que l'enrichissement du tourteau de colza avec des nutriments facilement assimilables est susceptible de stimuler la croissance du microorganisme. L'accessibilité en source d'azote agit sur la vitesse de développement de la souche et donc la synthèse de biomasse. Il a d'ailleurs été démontré que l'addition d'azote stimule davantage la conversion des sucres en biomasse cellulaire faisant baisser par conséquent les niveaux en sucres résiduels du tourteau de colza ¹⁴⁶. Une forte hétérogénéité a été constatée dans toutes les séries, même avec une faible hauteur de couche, le microorganisme colonise difficilement le tourteau en profondeur mais essentiellement en surface ce qui suggère une limitation en oxygène.

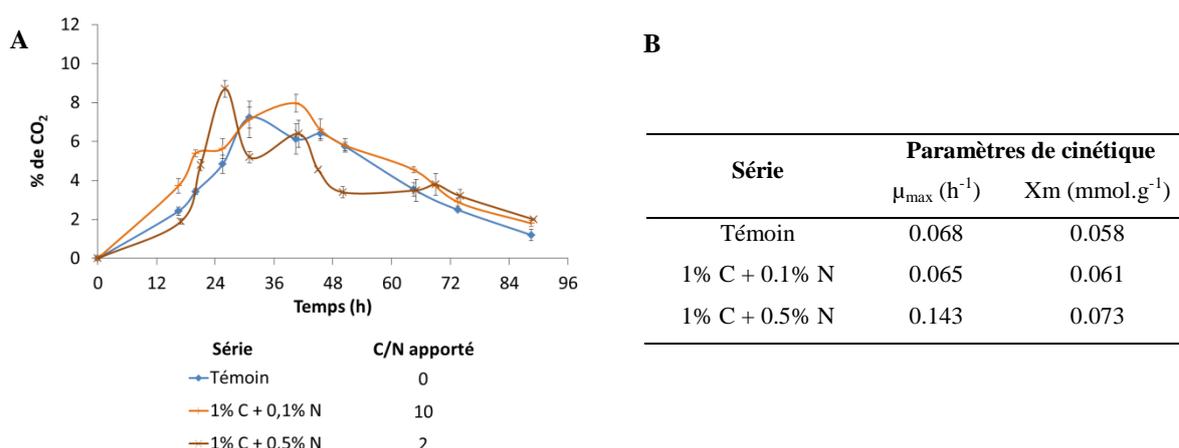


Figure 43. Dynamique de croissance d'*A. sojae* cultivé en fiole Erlenmeyer avec apport de sources d'azote et de carbone. **A** : Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B** : Paramètres de cinétique déterminés avec le modèle logistique. μ_{\max} : vitesse spécifique de croissance ; Xm : quantité maximale de CO₂ produit ; C : carbone (glucose) ; N : azote (sulfate d'ammonium).

3.2.2. Impact de l'aération

La croissance d'*Aspergillus sojae* peut être inhibée en fiole Erlenmeyer puisqu'il s'agit d'un système passif laissant pénétrer peu d'air à travers le bouchon en coton, de plus, le tourteau de colza a tendance à se compacter une fois humidifié limitant d'autant plus la diffusion de l'oxygène au sein de la matrice solide. L'agitation et l'aération des cultures sont donc des paramètres importants à prendre en compte pour optimiser la croissance du champignon sur tourteau de colza. Afin d'évaluer l'influence de l'aération, une série de culture a été quotidiennement aérée et agitée sous hotte à flux laminaire avant chaque mesure de CO₂. Celle-ci est comparée à une série témoin qui n'a subi aucun

traitement. La production de CO_2 s'avère effectivement plus importante en condition agitée avec un écart de 2.5% au niveau du pic vers le second jour de culture (**Figure 44A**). Bien que la différence soit marquée au niveau de la quantité de CO_2 accumulée avec $0.050 \text{ mmol.g}^{-1}$ pour le témoin et $0.077 \text{ mmol.g}^{-1}$ pour la condition agitée, la vitesse spécifique maximale de croissance respective à chaque série est similaire (0.061 h^{-1} et 0.058 h^{-1}). La fréquence d'agitation appliquée n'a donc pas eu d'impact négatif sur la croissance d'*A. sojae*, facteur souvent décrit comme inhibiteur de la croissance fongique. En comparaison à la culture témoin, il est important de noter que le tourteau est davantage colonisé par le mycélium lorsque la culture a été régulièrement agitée (**Figure 44B**). La quantité de biomasse produite est visuellement plus abondante lorsque la circulation de l'air est facilitée manuellement. Par conséquent ce changement se traduit par une respiration plus importante. Malgré une quantité de β -glucane toujours indétectable, la perte de masse sèche finale, reflétant le métabolisme respiratoire de la souche, confirme cette hypothèse avec une perte de 11.9% pour la série témoin et 13.7% pour la série agitée. La diffusion de l'oxygène entre les particules peut éventuellement être améliorée en baissant le taux d'humidité¹²³. Un pourcentage initial de matière sèche augmenté à 50 au lieu de 40% provoque cependant un arrêt rapide de la croissance et une sporulation précoce d'*A. sojae* (données non présentées). Le passage en condition aérée est nécessaire à ce stade de l'étude car la granulométrie du tourteau de colza limite les transferts d'oxygène et le développement du microorganisme au sein de la matrice.

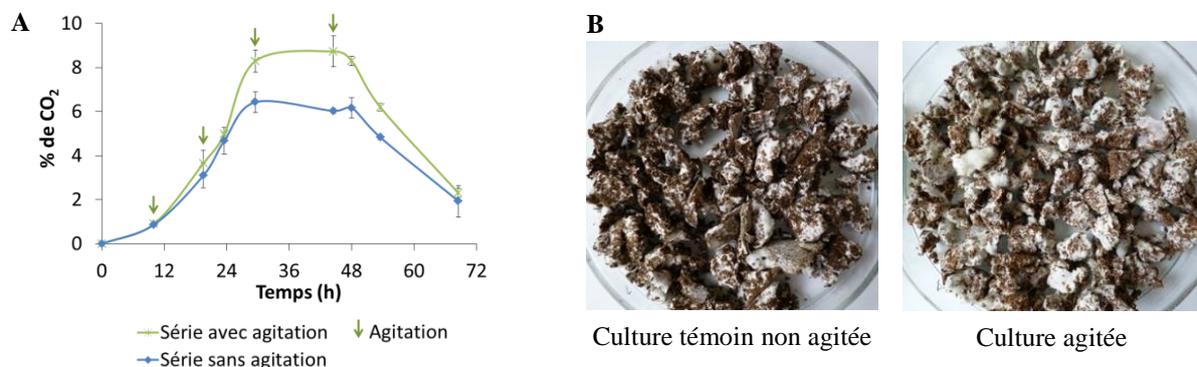


Figure 44. Croissance d'*A. sojae* en fiole Erlenmeyer en condition agitée et non agitée. **A** : Evolution du pourcentage de CO_2 au cours du temps. **B** : Aspect des cultures à 72h après homogénéisation.

3.3. Cultures en condition aérée

3.3.1. Détermination des conditions de prétraitement du substrat solide

Le changement d'échelle et l'utilisation d'une quantité plus importante de substrat solide nécessite une validation au préalable des conditions de prétraitement thermique pour garantir sa stérilité. Celle-ci est indispensable pour comparer les essais avec ceux effectués en fiole Erlenmeyer et éviter une éventuelle inhibition de la croissance d'*Aspergillus sojae* par le développement de contaminants notamment en présence de nutriments exogènes facilement assimilables. La durée du passage à l'autoclave des substrats préalablement préhumidifiés a dû être prolongée en fonction de la masse de substrat à traiter (**Tableau 15**). L'effet de masse limite la diffusion de la chaleur au cœur du substrat puisque la vapeur ne passe pas à travers mais autour du produit qui est placé dans une fiole ou un sac autoclavable. Bien que les 4 kg soient disposés en couche mince (~5 cm) dans un panier en inox, un cycle d'une heure est nécessaire pour garantir la destruction des contaminants. Les étalements sur PCA révèlent la présence de bactéries qui sont certainement présentes à l'origine sous forme de spores et qui se développent dès que le milieu devient favorable. Les traitements thermiques de longue durée peuvent cependant avoir des effets négatifs et dégrader ou réduire la teneur en nutriment. Les protéines solubles du tourteau de colza sont d'ailleurs affectées par un cycle standard de 20 minutes à 121°C d'après les résultats présentés dans le chapitre II, partie 3.3.1.

Tableau 15. Décontamination des substrats solide par traitement thermique à l'autoclave.

Substrat solide	Durée à 121°C	Quantité	Contaminants*
Tourteau de colza	20 minutes	45 g	Absence
	20 minutes	100 g	Présence
	30 minutes	100 g	Absence
	30 minutes	4 kg	Présence
	40 minutes	4 kg	Présence
	1 heure	4 kg	Absence
Graines de tournesol	20 minutes	45 g	Présence
	30 minutes	45 g	Présence
	40 minutes	45 g	Absence
	1 heure	2 kg	Absence

*Détection sur PCA après ajustement à 40% de matière sèche et 3 jours d'incubation à 30°C

3.3.2. Culture d'*Aspergillus sojae* en miniréacteur aéré

En FMS le rôle de l'aération est de maintenir les conditions aérobies, d'éliminer le CO₂ produit et réguler la température et le niveau d'humidité du substrat au cours du temps. Les miniréacteurs utilisés au stade laboratoire offrent la possibilité d'étudier la croissance du microorganisme dans ces conditions. Ces équipements sont simples et peu coûteux et conviennent parfaitement aux études d'optimisation du milieu de culture et de changement d'échelle.

3.3.2.1. Amélioration de la croissance par une supplémentation en azote ou en carbone

L'objectif de ce premier essai mené en miniréacteur vise à confirmer l'importance de l'aération et déterminer l'effet de l'addition d'une source d'azote ou de carbone en condition aérée sur le développement de la souche et sa production de biomasse. L'azote est incorporée à 0.1% avec du sulfate d'ammonium et le carbone est additionné à 1% sous forme de glucose ou saccharose. Les conditions de culture sont proches des optimums pour *A. sojae* avec une température de consigne de 28°C et une humidité relative de l'air injecté dans les réacteurs proche de 90% afin d'éviter l'assèchement de la culture qui pourrait considérablement affecter la croissance du microorganisme¹²³. Ces paramètres sont régulés efficacement par le système CNS qui communique avec la rampe alimentant les miniréacteurs (**Figure 45**).

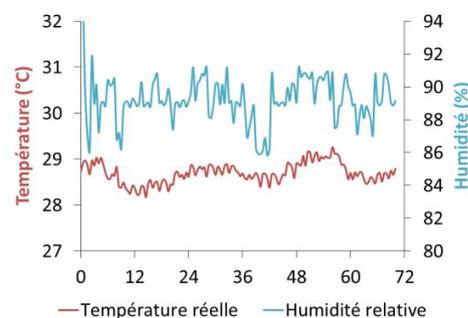


Figure 45. Régulation de la température et de l'humidité relative de l'air. La température de consigne est fixée à 28°C tandis que celle d'humidité est réglée à 90%.

D'après les résultats présentés dans la **figure 46A et B**, la croissance est plus importante en condition aérée par rapport aux Erlenmeyer et particulièrement dans les réacteurs avec addition de carbone. La différence est marquée au moment du pic de CO₂ et les paramètres de cinétique sont supérieurs par rapport aux autres séries de réacteurs. Contrairement au carbone, l'addition d'azote ralentit le développement de la souche avec un μ_{\max} plus faible par rapport au témoin. L'aération modifie la capacité de la souche à utiliser les nutriments disponibles notamment la source de carbone car en condition statique aucune amélioration n'a été constatée sauf en présence d'azote à 0.5%. Les courbes de températures mesurées en sortie de réacteur (**Figure 46C**) varient sensiblement en fonction de l'évolution du pourcentage de CO₂ traduisant bien l'activité métabolique du microorganisme^{123,197}. Les températures enregistrées sont proches entre les différentes séries, sauf pour celle contenant la source d'azote où les degrés relevés sont légèrement inférieurs. Cette différence peut également être à l'origine d'un développement plus lent d'*A. sojae*. Ces réacteurs ont probablement été davantage influencés par les changements d'aération (**Figure 46D**). En effet, lors de la croissance du microorganisme, le débit d'entrée dans la rampe reste constant mais le milieu de culture devient plus compact ce qui a pour effet de le diminuer au cours du temps. La vitesse a d'ailleurs été constamment réajustée vers 2 L.min⁻¹ en modifiant la fermeture des clamps en entrée pour maintenir un débit d'air identique entre les réacteurs. La différence majeure qu'il peut y avoir entre les réacteurs d'une même

série est le débit d'air traversant la couche, car la grille n'est jamais colmatée de la même façon au même moment. La modification du débit d'air a un impact direct sur la croissance du microorganisme ce qui explique donc les écarts-types parfois plus élevés pour une même condition testée. Le pourcentage final de matière sèche a toutefois été maintenu entre 40 et 45% en appliquant ces paramètres de régulation.

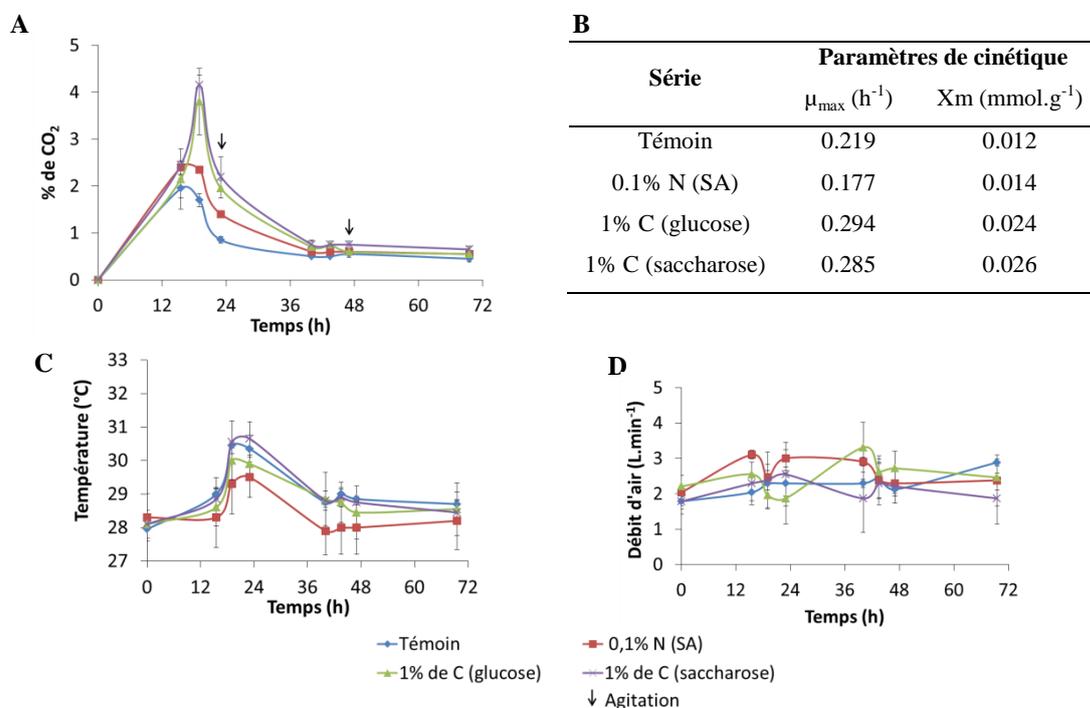


Figure 46. Suivi d'*A. sojae* cultivé en miniréacteur aéré sur tourteau de colza avec addition d'une source d'azote ou de carbone. **A.** Evolution du pourcentage de CO_2 au cours du temps. **B.** Paramètres de cinétique déterminés avec le modèle logistique. μ_{\max} : vitesse spécifique de croissance ; X_m : quantité maximale de CO_2 produit. **C.** Evolution de la température de sortie des réacteurs au cours du temps. **D.** Evolution du débit d'air en sortie des réacteurs au cours du temps. SA : sulfate d'ammonium ; C : carbone ; N : azote.

Le phénomène de compaction est nettement visible lors de l'agitation des cultures. La colonisation du tourteau de colza est hétérogène avec un mycélium beaucoup plus dense du côté de l'aération vers la grille, celle-ci est d'ailleurs partiellement colmatée par la biomasse du champignon (**Figure 47**).



Figure 47. Aspect de la culture en miniréacteur après 48h d'incubation

Malgré une première agitation réalisée à 24h, la partie de la culture située contre la grille est davantage colonisée par le mycélium par rapport au reste de la culture qui se trouve sur la partie supérieure du réacteur. Ce phénomène limite l'apport d'oxygène pour le microorganisme qui ne peut pas utiliser les nutriments disponibles de manière optimale. Le gradient observé ainsi que l'accélération de la croissance par rapport aux fioles Erlenmeyer mettent en évidence l'avantage de l'utilisation d'un procédé à aération forcée. Les β -glucanes ne sont pas détectés dans les séries de culture après trois jours d'incubation en dépit des différences observées au niveau de la croissance, notamment entre le témoin et les apports de carbone. La production de biomasse est donc toujours insuffisante même dans le cas d'un échantillon prélevé contre la grille.

3.3.2.2. Effet de l'addition d'un cosubstrat utilisé en tant qu'agent aérant

A. sojae est cultivé sur tourteau de colza avec 30% de graines de tournesol. Il s'agit d'évaluer si l'addition de ce substrat, qui fait également partie de la filière des oléagineux du groupe Avril, peut être bénéfique pour le développement de la souche, notamment en matière d'aération puisque sa granulométrie est plus importante que le tourteau de colza. Les nutriments de la graine de tournesol sont difficilement accessibles en raison de la présence d'une coque résistante qui est essentiellement constituée de cellulose, hémicellulose et de lignine. La forte proportion de lignine (28%) limite notamment sa biodégradation par les microorganismes. Les champignons supérieurs de type basidiomycètes sont les mieux adaptés pour la dégrader car ils ont la capacité de produire des enzymes lignolytiques²⁸⁶. Les additions de carbone et d'azote sont similaires à l'essai précédent mais en raison d'une augmentation de la hauteur de couche la température de l'air injecté est maintenue à 25°C avec une humidité relative correspondante qui a dû être baissée à 88% à partir de la troisième heure d'incubation (**Figure 48**).

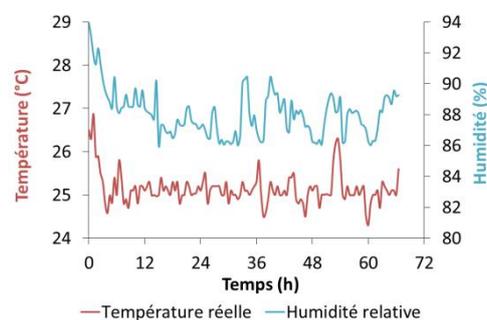


Figure 48. Régulation de la température et de l'humidité relative de l'air. La température de consigne est de 25°C tandis que celle d'humidité est réglée à 88%.

L'évolution du pourcentage de CO₂ ainsi que les paramètres de cinétique indiqués dans les **figures 49A et B** sont comparables à l'essai précédent mené sur tourteau seul. L'écart de température entre l'air injecté et la sortie des miniréacteurs est également identique (en moyenne +3°C) au moment

des pics de CO₂ (**Figure 49C**) malgré la présence de tournesol et un débit d'air plus important qui est régulièrement réajusté à 3 L.min⁻¹ (**Figure 49D**). Les températures sont homogènes entre les séries. L'inhibition de la croissance en présence d'une source d'azote est confirmée. Bien que la température de régulation et les températures maximales atteintes soient plus basses par rapport à l'expérience précédente, la croissance n'est pas affectée d'après les données obtenues concernant la respiration de la souche. Ces résultats supposent que la quantité de biomasse produite ne serait pas plus importante sur le mélange avec 30% de tournesol par rapport au tourteau seul, les β-glucanes étant toujours indétectables avec la méthode Megazyme.

Concernant l'aspect visuel des cultures, la compaction et la colonisation hétérogène de la matrice solide constatée précédemment ont également lieu dans ces séries, mais les agitations manuelles sont plus faciles à réaliser en présence de tournesol avec une texture moins collante. La quantité de graines de tournesol n'est sans doute pas suffisante pour obtenir un effet bénéfique au niveau de l'aération, la granulométrie très fine du tourteau englobe les graines à l'image d'un caillou enfoncé dans du sable humide. Cette proportion de tournesol ne peut malheureusement pas être augmentée car l'objectif du projet est de valoriser au maximum le tourteau de colza. De plus, les graines semblent intactes et ne sont donc pas détériorées par *A. sojae* au bout de 72h de culture ce qui signifie que la souche n'a certainement pas la capacité de les utiliser en tant que nutriment mais uniquement en tant que support.

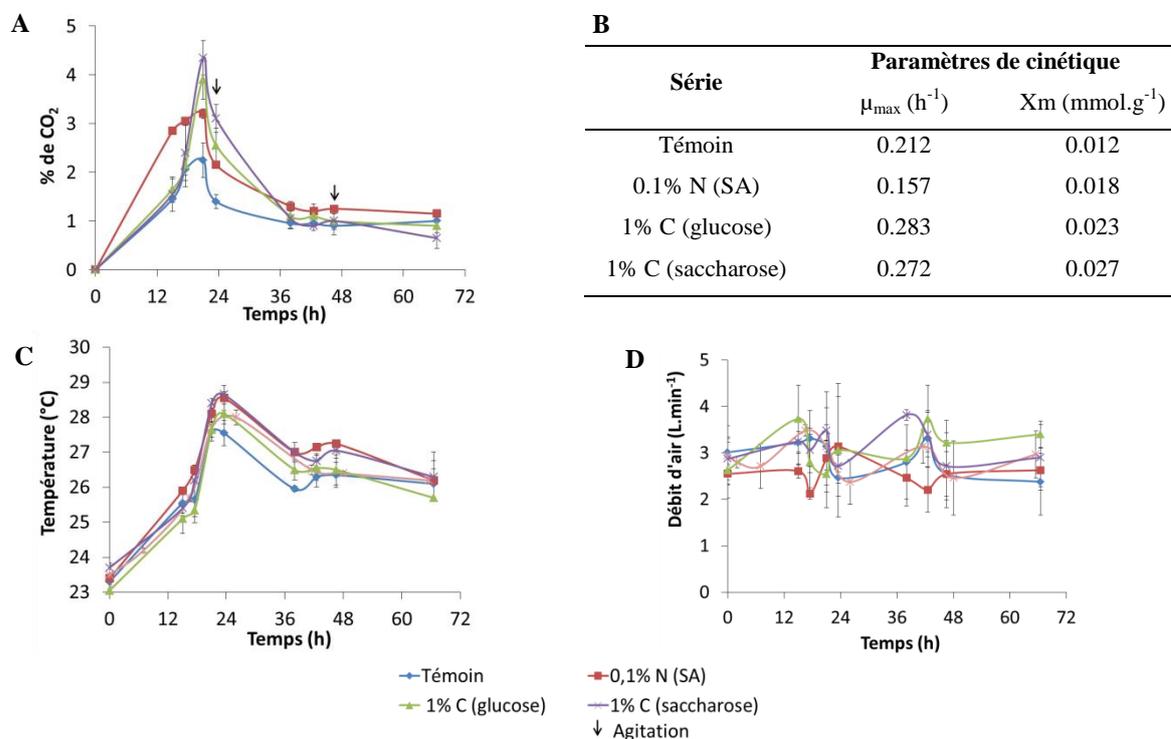


Figure 49. Suivi d'*A. sojae* cultivé en miniréacteur aéré sur tourteau de colza enrichi en tournesol avec addition d'une source d'azote ou de carbone. **A.** Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B.** Paramètres de cinétique déterminés avec le modèle logistique. μ_{\max} : vitesse spécifique de croissance ; Xm : quantité maximale de CO₂ produit. **C.** Evolution de la température de sortie des réacteurs au cours du temps. **D.** Evolution du débit d'air en sortie des réacteurs au cours du temps. SA : sulfate d'ammonium ; C : carbone ; N : azote.

3.3.2.3. Effet de différentes concentrations en carbone

Les carbohydrates constitutifs du tourteau de colza (cellulose, hémicellulose et lignine) sont plus difficiles à métaboliser pour *A. sojae* puisque la source exogène permettant d'obtenir les meilleurs résultats jusqu'à présent est le carbone sous forme de monosaccharide (glucose) et disaccharide (saccharose). L'augmentation de leur concentration peut cependant avoir des répercussions sur la croissance du microorganisme car les fortes teneurs modifient le rapport C/N global du milieu de culture ainsi que sa texture. En effet, il n'a pas été possible d'aller au-delà d'un apport de 10% de carbone sous forme de glucose en raison d'une aggravation du phénomène de compaction nécessitant d'augmenter la matière sèche initiale à 45%. Quatre séries de miniréacteurs sont préparées avec du tourteau seul sans apport (série témoin) et supplémentées avec 1, 5 et 10% de carbone. En plus du suivi de la croissance *via* la mesure du pourcentage de CO₂, les sucres sont dosés au temps initial et après 48h de culture afin d'évaluer leur consommation par le microorganisme. Les conditions de cultures sont identiques à l'essai présenté dans la partie 3.3.2.1.

D'après les analyses de la respiration (**Figure 50A et B**), l'accumulation de CO₂ est effectivement plus importante en présence de saccharose avec des pics de CO₂ plus élevés par rapport au témoin, mais le μ_{\max} baisse à la concentration maximale testée.

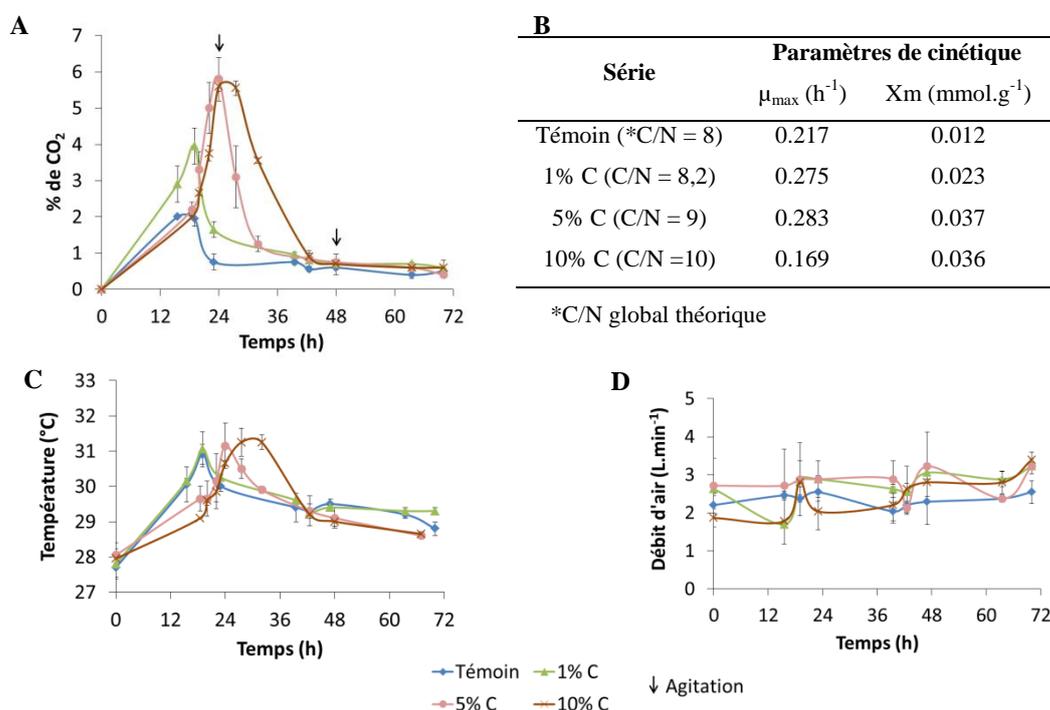


Figure 50. Suivi d'*A. sojae* cultivé en miniréacteur aéré sur tourteau de colza supplémenté avec des concentrations croissantes en saccharose. **A.** Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B.** Paramètres de cinétique déterminés avec le modèle logistique. μ_{\max} : vitesse spécifique de croissance ; X_m : quantité maximale de CO₂ produit. **C.** Evolution de la température de sortie des réacteurs au cours du temps. **D.** Evolution du débit d'air en sortie des réacteurs au cours du temps. SA : sulfate d'ammonium ; C : carbone (saccharose).

Le pourcentage initial de matière sèche, bien que plus élevé par rapport au témoin, est identique pour les deux plus fortes concentrations en carbone, à savoir 5 et 10%. La concentration maximale de 10% inhiberait la croissance du microorganisme en raison d'un rapport C/N défavorable ou d'une pression osmotique trop forte entraînant une disponibilité réduite de l'eau ²⁸⁷.

Quelle que soit la concentration initiale en saccharose, ce dernier est totalement dégradé par la moisissure dès le deuxième jour de culture (**Figure 51**). Etant donné que l'hydrolyse enzymatique (glycolyse) du saccharose par les invertases fongiques libère du glucose et du fructose, le glucose a également été dosé pour confirmer sa consommation ²⁸⁸. La quantité de glucose présente dans les échantillons à 0 et 48h de culture s'avère très faible, dans la limite de détection avec des teneurs inférieurs à 0,05%. Au temps initial, le milieu est donc dépourvu de molécules de glucose libres. En revanche l'absence de glucose à 48h signifie que le glucose apporté par le saccharose a bien été métabolisé puisque le disaccharide a également disparu. Cette hypothèse a pu être confirmée en appliquant la méthode de dosage des β -glucanes qui a pour effet d'hydrolyser le saccharose en glucose puisqu'elle fait intervenir de l'acide chlorhydrique ainsi qu'une étape de digestion enzymatique en présence de glucanases et glucosidases ²⁸⁹. Le glucose apporté par le saccharose est bien détecté au temps initial par rapport au tourteau seul et les quantités affichées en pourcentage coïncident avec les concentrations apportées en saccharose (**Figure 51**). Mais après 48h de culture, la teneur devient similaire au tourteau non supplémenté dont la valeur représente l'interférence liée à l'hydrolyse partielle de la cellulose. Malgré une consommation de sucre conséquente par *A. sojae*, la quantité de β -glucane reste indétectable (< 3 %). Ces résultats suggèrent que le carbone, absorbé sous forme de sucre, n'est pas suffisamment transformé en β -glucane pour être détectable avec la méthode employée. Les sucres seraient donc majoritairement orientés vers le métabolisme respiratoire libérant le CO₂ en bout de chaîne *via* le cycle de Krebs. La biomasse est évidemment synthétisée au même moment mais le dosage des β -glucanes n'est pas assez sensible pour mettre en évidence cette production.

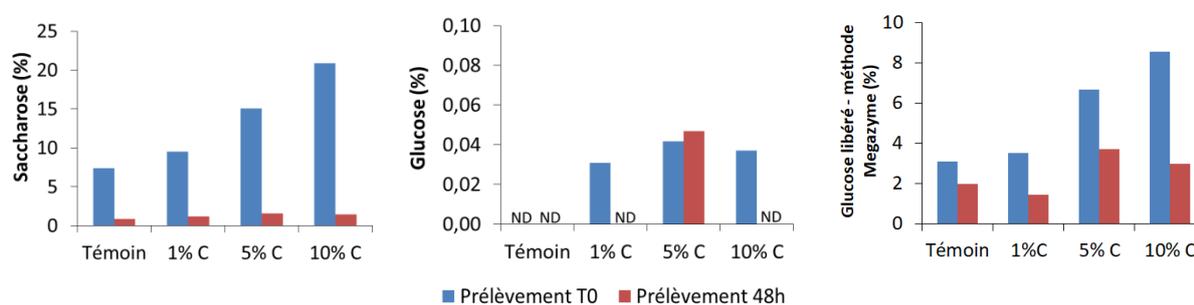


Figure 51. Pourcentage de sucres (saccharose et glucose) et de β -glucanes au temps initial (T0) et après 48h de culture en miniréacteur aéré. ND : non détecté.

3.3.3. Culture d'*Aspergillus sojae* en cuves non stériles (CNS)

L'objectif des cultures en réacteur pré-pilote est la définition du procédé pour ajuster efficacement les paramètres de culture afin d'appréhender au mieux les futures productions destinées aux tests sur animaux. Les cuves non stériles assurent une meilleure aération avec un débit plus fort et la possibilité de racler plus aisément le fond des cuves pour éviter la formation d'une couche compacte entraînant le colmatage des grilles. Ce phénomène, constaté en miniréacteur aéré, perturbe le développement de la souche car le milieu n'est pas homogène avec une aération qui devient finalement vite limitée entraînant la formation de chemins préférentiels. Contrairement aux miniréacteurs, le système des CNS, comme le nom l'indique, n'est pas conçu pour assurer la stérilité du procédé notamment pendant l'étape de chargement, d'ensemencement et par rapport aux agitations et aux prélèvements nécessitant l'ouverture des cuves dans des conditions non stériles. Malgré l'apport d'un inoculum conséquent et le maintien des réacteurs sous air, ces opérations peuvent entraîner un risque de contamination qu'il est nécessaire de prendre en compte. Ce modèle de réacteur est d'ailleurs plus proche du stade industriel où le nombre d'interventions effectuées dans des conditions aseptiques sont plus limitées.

3.3.3.1. Acidification du milieu de culture

Le tourteau de colza est utilisé sans traitement thermique préalable afin de suivre l'évolution des contaminants au cours du temps. La stérilisation du tourteau à l'autoclave n'est évidemment pas envisageable à échelle industrielle en raison de la quantité à traiter et du coût du procédé faisant intervenir de la vapeur d'eau saturée sous pression. L'abaissement du pH initial à 4 est une alternative proposée pour limiter la prolifération de contaminants bactériens lors de la culture avec *A. sojae*. L'adaptation des champignons filamenteux à une large gamme de pH est un avantage en FMS pour prévenir et limiter les risques de contaminations bactériennes particulièrement lorsque des conditions acides sont appliquées²⁸⁰.

Le suivi du développement des contaminants (UFC) est effectué en présence ou non de la souche *A. sojae* cultivée sur tourteau de colza en fiole Erlenmeyer. Le pH ainsi que le pourcentage de CO₂ sont également mesurés en cinétique afin de comparer les différentes séries. La souche se développe bien en présence de contaminants quel que soit le pH initial du tourteau de colza avec des μ_{\max} très proches, à savoir 0.176 h⁻¹ sans acidification et 0.165 h⁻¹ avec le pH initial baissé à 4 (**Figure 52**). Ces valeurs sont beaucoup plus élevées par rapport aux essais effectués sur substrat préalablement stérilisé (cf. partie 3.2.) certainement en raison d'une disponibilité accrue en nutriments. Après 24h d'incubation, le pourcentage de CO₂ augmente progressivement dans les séries témoins non inoculées en raison de l'activation et du développement de contaminants bactériens (métabolisme aérobie) dont les UFC deviennent détectables. Ces derniers sont toutefois ralentis lorsque le pH initial est ajusté à 4

avec une différence significative de plus de 10^4 UFC d'écart à 24h d'incubation. Le pH ne reste cependant pas stable et augmente au cours du temps, ce qui lève progressivement l'inhibition liée à l'acidité du milieu de culture. Le pH augmente plus rapidement en présence d'*A. sojae* malgré l'acidification de départ. La majorité des souches bactériennes s'activent et se développent rapidement à un pH basique et/ou neutre. En effet, lorsque le pH n'est pas modifié, la présence du champignon n'a aucun effet sur leur développement. En revanche l'abaissement du pH initial provoque une inhibition de leur croissance qui est davantage marquée en présence d'*A. sojae* à 48 et 72h d'incubation. Ce résultat est probablement lié à une compétition inter-espèce pour les nutriments disponibles sachant que la population bactérienne est beaucoup plus réduite dans ces conditions acides. Les critères microbiologiques du plan de surveillance propre au pôle animal du groupe Avril des matières premières limitent la flore aérobie mésophile à 10^6 UFC/g de produit. L'acidification initiale du milieu de culture permet d'atteindre cet objectif même si les valeurs obtenues sont tout juste dans la limite.

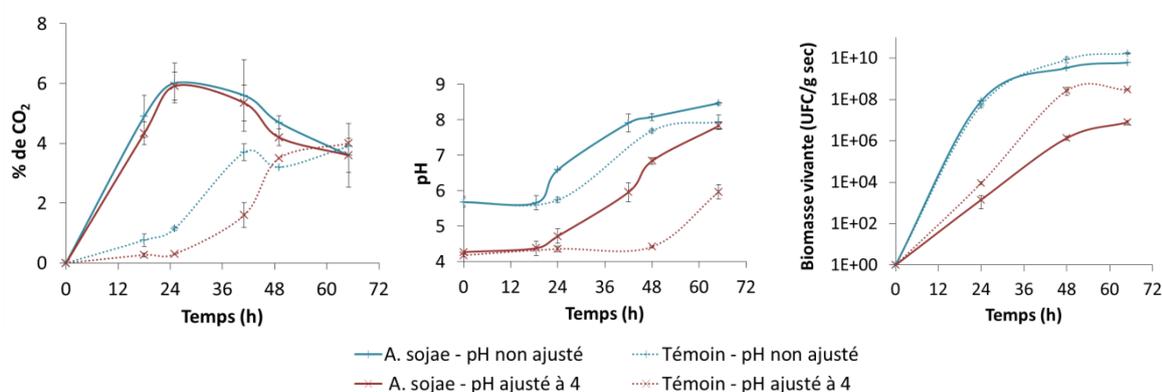


Figure 52. Effet de l'abaissement du pH initial du tourteau de colza sur l'évolution du pourcentage de CO₂, le pH et le nombre de contaminants au cours du temps en présence ou non d'*A. sojae*. UFC : unités formants colonies.

La quantité initiale de contaminants est beaucoup plus faible par rapport au microorganisme inoculé. Si le taux de croissance du contaminant n'est pas significativement plus important il ne sera pas capable d'atteindre des fortes concentrations avant la fin du procédé de fermentation¹¹⁸. Le pH du milieu de culture devra sans doute être maintenu à 4 au cours du temps avec des injections régulières d'acide pour maintenir l'inhibition liée à l'acidité du milieu de culture. Mais ces apports impliquent également des agitations fréquentes qui pourraient considérablement perturber le développement d'*A. sojae*. Concernant le procédé dans sa globalité, il sera nécessaire de limiter à terme la durée de stockage du tourteau de colza car il s'agit de l'étape présentant le risque de contamination le plus élevé surtout en présence d'humidité.

3.3.3.2. Préparation d'un inoculum adapté au changement d'échelle

Jusqu'à présent, l'inoculum a toujours été produit en fiole de Roux sur gélose PDA ce qui est suffisant pour les essais menés à échelle laboratoire. En revanche pour les études en réacteur pré-pilote, ce type de préculture n'est plus adapté car il faudrait par exemple, pour une cuve contenant 3 kg de tourteau, environ dix fioles de Roux à gratter avec un taux d'ensemencement fixé à 1.10^7 spores.g⁻¹. Il est donc nécessaire d'obtenir une quantité de spores plus importante en vue du changement d'échelle. L'idéal pour la récupération des spores est l'incorporation directe de la préculture dans l'eau servant à ensemer le tourteau de colza. Le substrat solide ne doit donc pas être trop compact et se déliter facilement en présence de liquide, c'est pourquoi parmi les substrats solides présents au sein du laboratoire, la pulpe de betterave ainsi que le son de blé ont été choisis pour cette étude. Les résultats présentés dans la **figure 53** montrent que la pulpe de betterave est le substrat le plus performant pour la production de spores avec 1.10^{10} spores totales par fiole dès le cinquième jour de culture. Le nombre de fioles nécessaire est ainsi réduit à trois pour 3 kg de substrat solide avec une récupération des spores facilitée avec une faible prise en masse. L'épuisement rapide des nutriments facilement métabolisable est certainement liée à une production de spores supérieure puisque la pulpe de betterave est moins riche par rapport au son de blé notamment en ce qui concerne la teneur en protéines et en sucres ²⁶. La préculture constituant l'inoculum pour les CNS sera donc produite sur pulpe de betterave et récoltée après 5 jours d'incubation à 30°C.

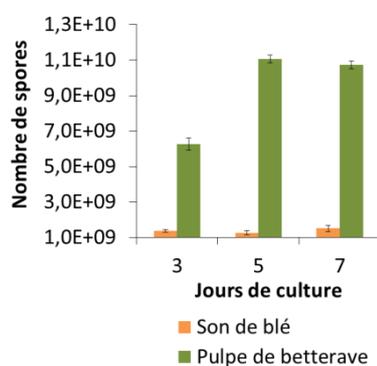


Figure 53. Quantité totale de spores produites par *A. sojæ* cultivé en fiole Erlenmeyer sur son de blé et pulpe de betterave.

3.3.3.3. Etude comparative entre le tourteau de colza seul et le mélange avec tournesol

Les additions de graines de tournesol n'ont pas eu d'effet bénéfique sur la souche en miniréacteur aéré probablement en raison de problèmes d'aération (colmatage de la grille et chemins préférentiels). Les graines entières mélangées au tourteau de colza sont donc testées à nouveau à plus grande échelle en utilisant les CNS. Les cultures sont effectuées en parallèle dans deux cuves, la première contient uniquement 3.1 kg brut de tourteau de colza tandis que la seconde est chargée avec 4.5 kg du mélange constitué d'une quantité identique de tourteau avec 30% de tournesol en plus. Les

hauteurs de couches respectives sont de 11 et 16 cm pour le mélange. L'air à l'entrée des cuves est régulé au temps initial à 25°C avec une humidité relative de 85% et un débit d'air de 200 L.min⁻¹.

Au moment du pic de CO₂ enregistré dès 15h dans les deux cuves, la température de la culture a fortement augmenté avec jusqu'à 20 degrés de différence par rapport à la température de l'air mesurée en sortie (**Figure 54A et C**). Les consignes de régulation de l'air à l'entrée ont été immédiatement modifiées et une première agitation est appliquée dans chaque culture pour éliminer les calories générées par le développement de la moisissure (**Figure 54B et D**).

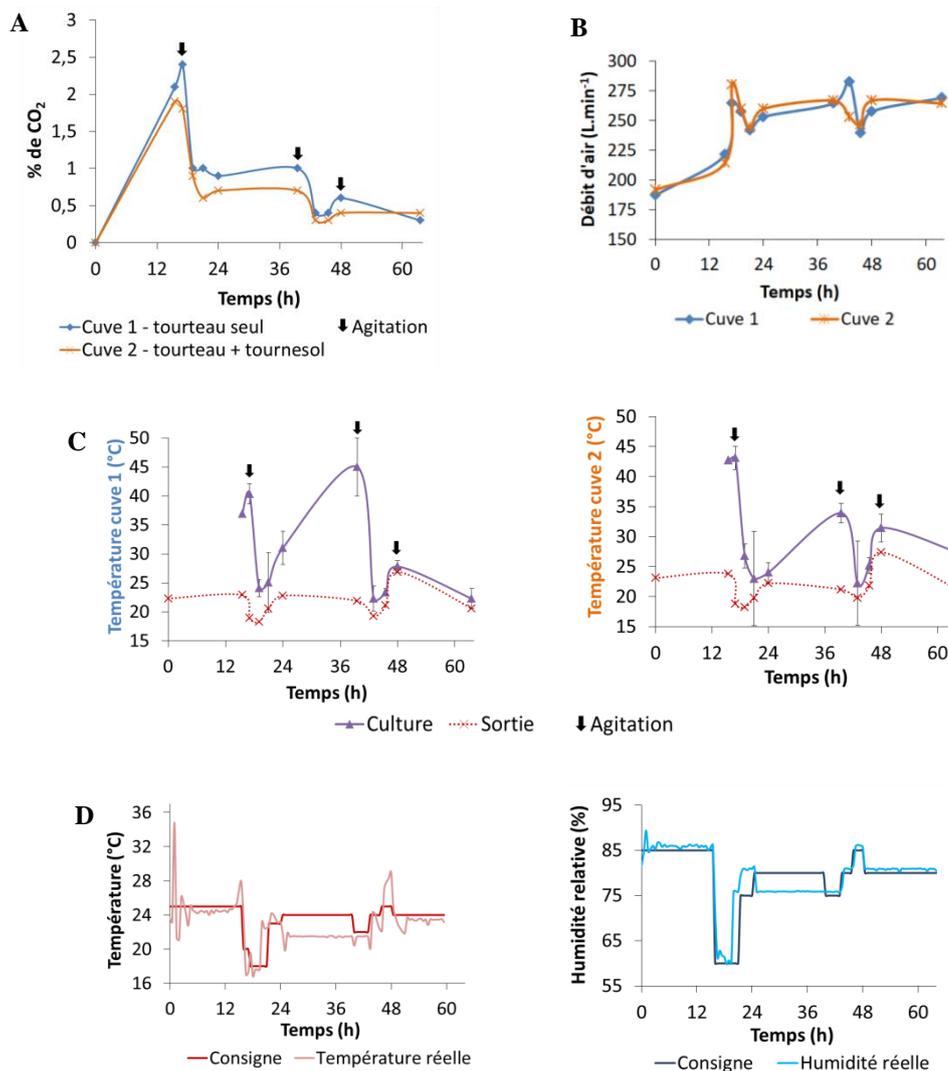


Figure 54. Suivi d'*A. sojae* cultivé en CNS sur tourteau de colza seul et tourteau mélangé à 30% de tournesol. **A.** Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B.** Evolution de la température relevée dans la culture et dans l'air en sortie des réacteurs. **C.** Evolution du débit d'air en sortie des réacteurs. **D.** Régulation de la température et de l'humidité relative de l'air à l'entrée des cuves.

Afin de baisser la température en entrée, la consigne d'humidité relative a également dû être diminuée car la génération de vapeur par le bain-marie continue à réchauffer l'eau et par conséquent l'air en entrée des réacteurs. Le débit d'air a aussi été augmenté vers 300 L.min⁻¹ et maintenu ainsi

pendant toute la durée de l'essai. Ces modifications sont efficaces pour éliminer la chaleur mais ils ne peuvent cependant pas être appliqués trop longtemps en raison du risque d'assèchement de la culture. Après la première agitation, la température de la culture a considérablement chuté, elle augmente ensuite progressivement suggérant une reprise de la croissance mais le pourcentage de CO₂ reste assez bas. La seconde agitation n'a ensuite plus le même effet car le développement de la souche finit par s'arrêter. L'évolution de la croissance est très proche entre les deux cuves avec un taux spécifique maximal de croissance d'environ 0.27 h⁻¹. L'agitation a certainement eu pour effet de ralentir la croissance d'*A. sojae*, mais elle reste nécessaire en raison de la compaction du milieu et de l'élévation de la température dans la couche. La compaction entraîne la formation d'un espace entre la culture et les bords du panier qui est nettement visible (**Figure 55**). Celui-ci forme un chemin préférentiel qui limite l'apport d'oxygène et l'aération dans la couche et favorise l'accumulation de chaleur ainsi que les gradients de températures. L'addition de tournesol en tant qu'agent aérant n'est pas concluante à ce stade de l'étude car l'hétérogénéité a été observée dans les deux cas avec la formations d'agglomérats qui forment des points chaud pouvant atteindre près de 50°C. La cause majeure du rétrécissement de la matrice solide est la finesse des particules combinées à l'agglomération inter-particulaire de celles-ci sous l'action du mycélium ¹¹⁸.

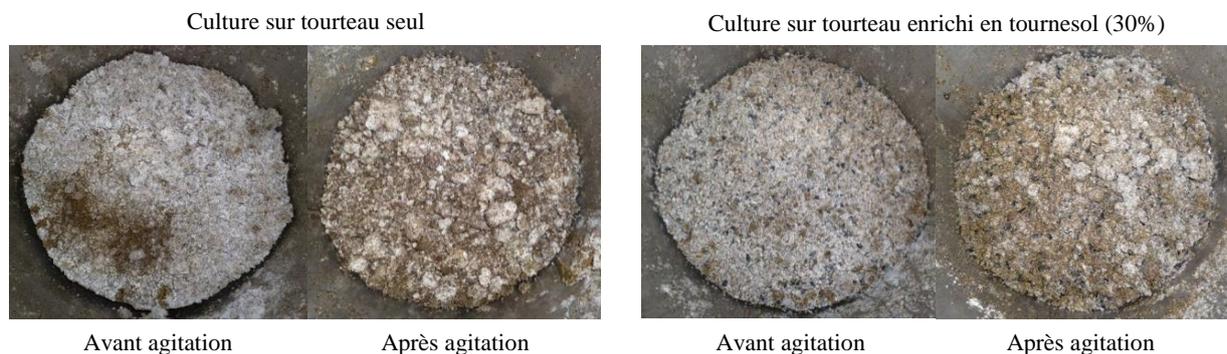


Figure 55. Aspect des cultures en CNS après 48h de fermentation

Aucune addition d'eau n'a été effectuée dans cet essai car le pourcentage de matière sèche est resté assez stable entre 40 et 43% jusqu'à 48h de culture avec un maximum de 50% à 72h de culture. La présence de contaminants bactériens a cependant été confirmée le troisième jour de culture malgré un pourcentage de matière sèche élevé. Ces derniers ont pu interférer avec le développement de la souche car ils peuvent se développer relativement rapidement si le taux de croissance est supérieur à celui d'*Aspergillus sojae*. L'ensemble de la procédure est remis en cause notamment les relevés réguliers de températures dans la couche ainsi que les agitations qui sont sources de contaminations. La présence d'une forte population bactérienne peut perturber le déroulement du procédé sachant que le modèle de réacteur utilisé n'a pas été conçu pour garantir sa stérilité.

3.3.3.4. Effet de l'addition d'une source de carbone

L'essai a été mené dans des conditions identiques au précédent en additionnant 5% de carbone sous forme de saccharose dans chacune des cuves. La culture n'a malheureusement pas pu être poursuivie au-delà de 24h en raison de la présence de contaminants bactériens de type bacilles qui se sont développés plus rapidement que précédemment. Etant donné que la stérilité du substrat a été vérifiée ainsi que la pureté de l'inoculum, les contaminants proviennent certainement de l'air ambiant lors de l'ouverture des cuves pour le chargement, l'introduction de l'inoculum, les agitations et la réalisation des mesures de température à l'intérieur de la couche. Durant les 24h de culture, la génération de chaleur métabolique est comparable dans les deux cuves avec une température maximale mesurée à l'intérieur de la couche atteignant 40°C à 18h de culture. Ce pic de chaleur est enregistré au même moment que celui du CO₂ avec un pourcentage maximal de 2.5% comme pour l'étude précédente. Ces deux phénomènes sont donc bien liés et reflètent la croissance du champignon malgré la présence des bactéries. En effet, *A. sojae* est bien visible à l'œil nu mais l'agitation révèle une modification de la consistance du milieu avec notamment une humidité plus importante et un aspect visqueux aggravant de ce fait le phénomène de compaction. La présence de saccharose intensifie les réactions d'oxydation conduisant à une augmentation de la production d'eau métabolique au cœur de la masse avec un pourcentage de matière sèche se situant en moyenne à 33% au lieu de 40%. Quant à la viscosité du substrat, celle-ci est probablement due à la production d'exopolysaccharides d'origine bactérienne²⁹⁰. L'addition de sucre amplifie et favorise le développement des contaminants qui consomment le saccharose directement disponible au dépend du champignon. La supplémentation du tourteau de colza en sucre est donc inefficace dans ce cas puisque la stérilité ne peut pas être garantie.

3.3.3.5. Activité immunomodulatrice

La culture en CNS est répétée sur tourteau seul pour la détermination *in vitro* de l'activité immunomodulatrice à partir des macrophages de souris (BMDM). Afin de limiter au maximum le risque de contamination, un seul relevé de température a été effectué dans la couche au moment du pic de CO₂. Par rapport à l'essai précédent (cf. partie 3.3.3.3.), l'air à l'entrée des cuves est initialement régulé à 28°C au lieu de 25°C pour tenter d'accélérer le développement du microorganisme.

Les résultats indiquent que la croissance d'*A. sojae* est comparable dans les deux cuves avec un μ_{\max} de 0.27 h⁻¹ qui est semblable à l'essai sur tourteau seul mené à une température initiale inférieure. La température en sortie du réacteur s'élève en revanche à 34°C au moment du pic avec la présence de points chauds pouvant atteindre jusqu'à 40°C en moyenne dans la couche (**Figure 56**). Ces points chauds, sans doute plus nombreux dans ce cas, ne semblent pas avoir eu de conséquence néfaste sur la croissance de la souche d'après la respiration. A 18h de culture, l'agitation, l'augmentation du débit d'air et la baisse des consignes de régulations (température et humidité

relative) restent nécessaires pour éliminer les calories générées par la moisissure. Ces modifications ont été opérées de la même manière que l'essai précédent. La baisse du pourcentage de CO₂ est une nouvelle fois confirmée à 48h suggérant un ralentissement de la croissance de la moisissure et une quantité maximale de biomasse produite dans ces conditions. Le dosage des β-glucanes ne permet pas de visualiser une différence entre les différents temps de cinétique (0, 24 et 48h). Les prélèvements effectués ont été séchés 24h à 105°C en couche mince avant la recherche de microorganismes sur gélose PCA pour détecter la présence de contaminants. Les étalements concentrés confirment la destruction d'*A. sojae* suite au séchage contrairement aux contaminants bactériens qui sont certainement présents sous forme de spores dès 24h de culture. Ces derniers résistent donc davantage au traitement thermique.

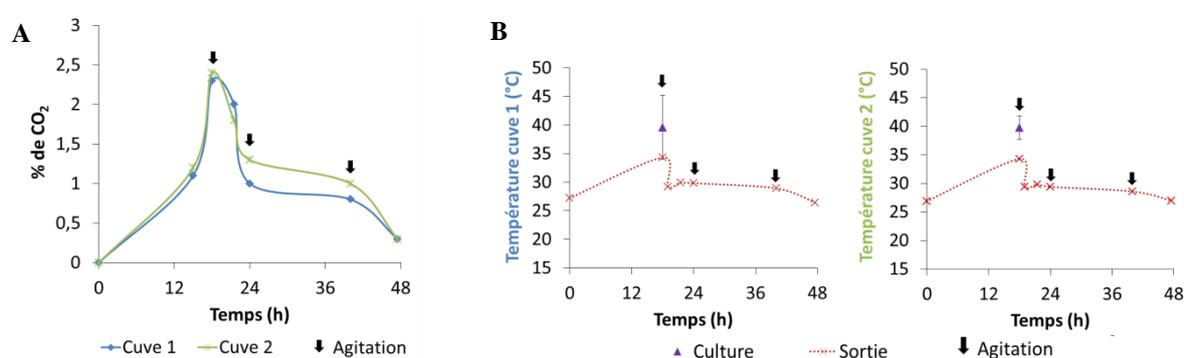


Figure 56. Suivi d'*A. sojae* cultivé en CNS sur tourteau de colza. **A.** Evolution du pourcentage de CO₂ au cours du temps. **B.** Evolution de la température relevée dans la culture et dans l'air en sortie des réacteurs.

L'effet du produit fermenté a été évalué sur la toxicité et la modulation de la production d'une cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine IL-1β par les cellules de moelle osseuse de souris différenciées en macrophages matures (BMDM) et stimulées par une endotoxine inflammatoire (LPS). L'addition de LPS est inductrice de la production d'IL-1β et déclenche une prolifération cellulaire (cf. chapitre III, partie 3.2.2.). Comme constaté dans le chapitre précédent, les produits testés induisent bien la prolifération des macrophages en présence de LPS excepté à la concentration maximale de 1 mg.mL⁻¹ qui l'inhibe sans être cytotoxique (**Figure 57**). Les résultats concernant les IL-1β ne sont donc pas pris en compte à cette concentration.

Parmi les échantillons testés, seule la culture prélevée à 48h donne une réponse significative à la concentration de 0.1 mg.mL⁻¹ avec un doublement de la production d'IL-1β par les BMDM comparé au LPS seul (**Figure 58**). Les autres échantillons n'ont aucun effet modulateur sur la sécrétion des IL-1β malgré la présence de contaminants bactériens détectés dans le produit sec dès 24h de culture. La baisse de pH initial n'est donc pas suffisante pour limiter leurs développements en condition aérée.

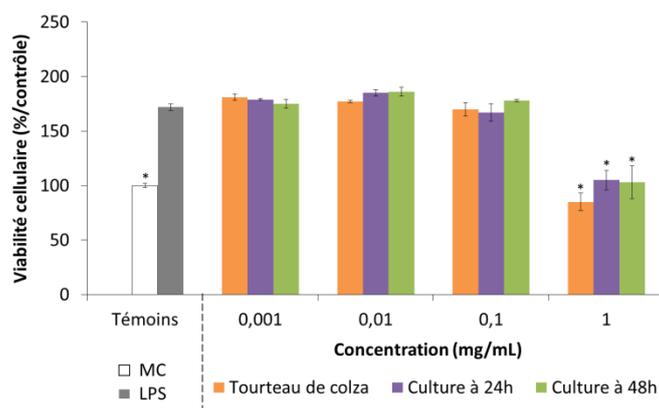


Figure 57. Pourcentage de viabilité cellulaire des BMDM en présence des échantillons issus des CNS par rapport au contrôle milieu de culture. Viabilité dans le milieu de culture seul (MC), en présence de LPS à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et en présence de LPS à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ additionné du tourteau seul et des extraits de cultures FMS d'*A. sojae* prélevés à 24 et 48h de culture et incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,001, 0,01, 0,1 et 1mg.mL^{-1}). * $P < 0,001$ par rapport au groupe contrôle représenté par le LPS (ANOVA, test de Dunnett).

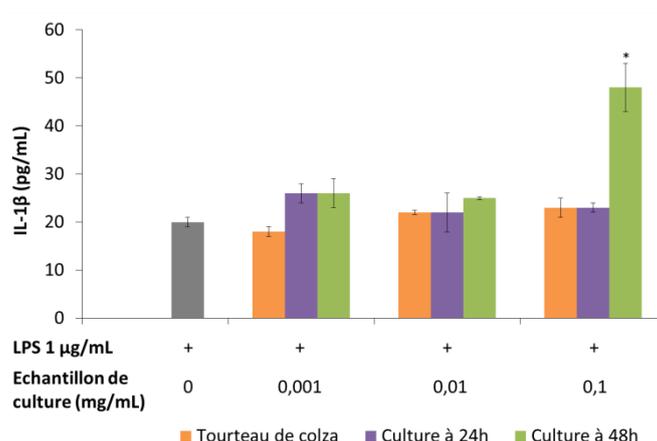


Figure 58. Concentration d'IL-1 β sécrétée par les BMDM en présence des différents échantillons issus de la culture en CNS. Quantité d'IL-1 β dans le milieu de culture seul, en présence de LPS à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et en présence de LPS à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ additionné du tourteau seul et des extraits de cultures FMS d'*A. sojae* prélevés à 24 et 48h de culture et incorporés dans le milieu cellulaire à différentes concentrations (0, 0,001, 0,01, et $0,1 \text{mg.mL}^{-1}$). * $P < 0,0001$, par rapport au groupe contrôle représenté par le LPS (ANOVA, test de Dunnett).

4. Conclusion

L'étude des facteurs physicochimiques qui influencent le procédé FMS est primordiale pour mener à bien la fermentation et appréhender au mieux le changement d'échelle. La technologie choisie est la culture en couche profonde à aération forcée car elle est facilement extrapolable à échelle industrielle et permet une utilisation conséquente de tourteau de colza par batch. La modification des conditions de culture (température, pH, aération) ainsi que les apports de nutriments ont mis en évidence une amélioration de la croissance du microorganisme *via* les mesures de respiration et des difficultés principalement liées à la granulométrie du tourteau de colza et à sa qualité microbiologique.

La souche *A. sojae* est particulièrement intéressante d'un point de vue procédé car elle est capable de croître de façon optimale dans une large gamme de pH (4 à 8) et à des températures élevées (30 à 37°C). Les premiers essais menés en fiole Erlenmeyer ont rapidement souligné une limitation en oxygène. Les effets liés à la supplémentation en source d'azote et de carbone ne peuvent donc pas être validés avec ce modèle d'où le passage obligatoire en condition aérée.

La culture en miniréacteur aérée confirme l'importance de l'aération puisque la croissance est considérablement accélérée d'une dizaine d'heures environ. L'augmentation de la température mesurée en sortie du réacteur au même moment que les pics de CO₂ reflète bien l'activité métabolique du microorganisme. Cependant, un gradient d'oxygène est systématiquement constaté avec une colonisation hétérogène de la souche du bas vers le haut du réacteur. Le colmatage des grilles lié au phénomène de compaction lors du développement d'*A. sojae* entraîne également l'apparition de chemins préférentiels. Les agitations journalières, nécessaires pour homogénéiser la culture et éliminer la chaleur métabolique, sont réduites car elles ont tendance à perturber le développement du microorganisme. La fréquence, la durée ainsi que l'intensité des agitations restent évidemment à mettre au point. La granulométrie et la diffusion d'oxygène au sein de la matrice n'ont pas pu être améliorées avec un apport de 30% de tourne-sol. Malgré cette hétérogénéité, l'analyse de la respiration montre qu'*A. sojae* est stimulée lors d'un apport exogène en source de carbone facilement métabolisable. Bien que le sucre soit entièrement consommé dès le second jour de culture, celui-ci n'est pas suffisamment converti en β -glucane pour permettre sa détection sachant que la biomasse seule (mycélium) du champignon en compte 20%. Les carbohydrates sont donc majoritairement utilisés dans le métabolisme respiratoire qui assure la plus grande part des besoins énergétiques des cellules. Lors des études d'enrichissement en nutriment la stérilité du tourteau de colza est indispensable, par conséquent de nouvelles conditions de stérilisation à l'autoclave ont été appliquées par rapport à la quantité de substrat à traiter. L'abaissement du pH représente une alternative applicable à plus grande échelle pour diminuer le développement de contaminants bactériens. Le stockage du tourteau étant l'étape qui présente le risque de contamination le plus élevé, il serait préférable d'avoir à terme un système alimentant directement le bioréacteur en sortie de trituration.

Les essais en CNS mettent en évidence des complications supplémentaires liées à la présence de contaminants bactériens après 48h de culture malgré l'acidification initiale du milieu et les précautions employées lors des différentes opérations (chargement, ensemencement, agitations, etc.). En effet, la stérilité ne peut pas être garantie avec ce type de matériel. Bien qu'*A. sojae* se développe en présence de contaminants bactériens, ceux-ci posent problème du fait de leur concentration pouvant dépasser 10⁶ UFC.g⁻¹ dans le produit fermenté séché 24h à 105°C. Un inoculum plus conséquent et la modification des conditions de culture (humidité, activité de l'eau et maintien d'un pH acide) sont des pistes envisageables pour limiter la prolifération en créant un environnement défavorable à leur croissance. Le phénomène de compaction déjà observé à petite échelle est encore plus marqué avec l'augmentation de la hauteur de couche. La granulométrie du tourteau de colza est l'inconvénient

majeur qui limite les performances de croissance car il favorise la formation de gradients d'oxygène et de température. Des cosubstrats plus grossiers que le tournesol, comme la pulpe de betterave qui a une forte capacité de gonflement, peuvent être testés pour tenter d'améliorer la porosité et faciliter la circulation de l'air au sein de la couche. L'ensemble des données expérimentales ont également mis en évidence les inconvénients de ce type de réacteur surtout concernant l'élimination de la chaleur métabolique avec le passage de l'air dans le bain-marie dont la température la plus basse est limitée à la température de l'eau froide du réseau. Afin d'atteindre des valeurs de température plus faibles, la teneur en humidité relative doit être obligatoirement diminuée car la génération de vapeur implique le réchauffement inévitable de l'eau du bain-marie. Cette opération occasionne un risque d'assèchement de la culture et la probabilité de devoir ajouter manuellement de l'eau sous agitation.

L'activité pharmacologique déterminée sur BMDM montre une augmentation significative de la production d'IL-1 β par les cellules stimulées pour le produit sec prélevé à 48h de culture en CNS. Des essais complémentaires doivent être menés pour déterminer l'origine de la réponse immunitaire. Malgré une phase d'optimisation non achevée, des premiers essais sur animaux sont envisageables en arrêtant la culture suivant son degré de contamination. Le contenu en molécule bioactive devra cependant être suffisant pour obtenir un effet significatif chez l'animal.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail était de développer un produit par fermentation en milieu solide à partir du tourteau de colza pour une application en alimentation animale. Cette nouvelle voie de valorisation s'appuie sur un procédé simple à mettre en œuvre, particulièrement bien adapté au traitement de la biomasse végétale et viable sur le plan environnemental et économique.

Dans un premier temps, l'étude bibliographique a permis de mettre en évidence les limites de l'utilisation du tourteau de colza en alimentation animale et l'absence de technologies suffisamment efficaces pour améliorer ses qualités nutritionnelles, notamment sa teneur en protéines, pour le rendre plus compétitif face au soja. La FMS, ayant fait l'objet de nombreuses recherches pour une application en alimentation animale, peut parfaitement répondre à cette problématique bien que très peu d'études aient été consacrées à l'enrichissement en protéines du tourteau de colza. En tenant compte de l'aspect économique et des besoins du marché en matière de performances zootechniques, un autre volet a été particulièrement développé, la recherche d'une activité biologique d'intérêt. Les immunomodulateurs naturels, tels que les polysaccharides fongiques, sont particulièrement bien étudiés par la recherche scientifique ces dernières années car ils représentent une alternative à l'utilisation des antibiotiques. A l'heure actuelle, cette voie n'a jamais été explorée en utilisant le procédé FMS, sachant que les effets pharmacologiques rapportés sont pour le moment limités aux champignons médicinaux.

Les premiers travaux ont été consacrés à la mise en place d'un criblage de souches focalisé sur la croissance des microorganismes et leur capacité à enrichir le tourteau de colza en protéines. Le premier critère de sélection est estimé à partir de l'évolution du profil respiratoire obtenu à partir du pourcentage de CO₂ mesuré quotidiennement en fiole Erlenmeyer. Cette méthodologie inédite est facilement applicable dans le cadre d'un criblage et permet d'établir un profil de croissance corrélé à la perte de masse sèche sans système de mesure en ligne. L'application du modèle de croissance logistique fournit une aide à la décision supplémentaire grâce à la détermination des paramètres de cinétiques de croissance. Le modèle utilisé dans ce travail peut être aisément appliqué aux procédés FMS en utilisant un système de mesure de la respiration en ligne afin de vérifier les données expérimentales et optimiser le procédé à plus grande échelle *via* la modification des paramètres de culture au cours du temps. La mesure de la perte de masse sèche, décrivant avec succès la croissance des microorganismes à petite échelle, peut en revanche être difficilement appliquée à plus grande échelle car elle nécessite des prélèvements fréquents et homogènes. En tenant compte de la teneur en protéines totales et solubles des cultures, plusieurs souches ont été mises en évidence avec des valeurs atteignant celles du tourteau de soja. Parmi les microorganismes retenus, les champignons inférieurs, dont le développement est le plus rapide, sont particulièrement intéressants dans l'optique d'une utilisation au stade industriel. En parallèle de ces essais, il a également été démontré que la qualité nutritionnelle du tourteau varie en fonction du traitement thermique (trituration, stérilisation, pasteurisation, etc.) notamment la digestibilité des protéines. Ces modifications affectent le développement des souches dont le métabolisme est certainement moins bien adapté comme ça a été le cas pour certains champignons supérieurs.

Dans la seconde partie de ce projet, le pouvoir immunomodulateur des souches cultivées sur tourteau de colza a été démontré *in vitro* sur cellules immunitaires. Cette voie, inexplorée jusqu'à présent à partir de culture en milieu solide, confère une valeur ajoutée au produit fermenté *via* un apport en molécules biologiques d'intérêt d'origine fongique. L'activation des neutrophiles sanguins (test NBT), évaluée à partir des cultures FMS et du mycélium seul, a dans un premier temps mis en évidence le potentiel immunostimulant de certaines souches, notamment *A. sojae* et *T. versicolor*. En raison d'une variabilité de la réponse immunitaire suivant les échantillons de sang utilisés, deux modèles cellulaires plus conventionnels ont été employés, à savoir les PBMC et les BMDM. Bien que l'implication des β -glucanes n'ait pas été validée, en intégrant notamment des préparations commerciales concentrées en β -glucane de *S. cerevisiae*, les effets pharmacologiques des produits obtenus sur ces modèles sont significatifs. Cette étude a permis de sélectionner la souche *A. sojae* dont l'activité immunomodulatrice n'a jamais été examinée dans la littérature scientifique, de même pour tous les champignons inférieurs. La réponse inflammatoire des cellules stimulées par une endotoxine reste néanmoins difficile à interpréter en se basant uniquement sur la modulation de la sécrétion des IL-1 β . La réponse immunitaire est en effet dépendante d'un certain nombre de facteurs, dont la composition des échantillons, la dose incorporée et l'environnement inflammatoire d'autant plus que ces modèles *in vitro* ont chacun leur propre spécificité et limite. Les résultats de cette étude ont notamment fait l'objet d'un dépôt de brevet international ²⁹¹ et d'une publication scientifique ²⁹² (**Annexe 3**).

Le dernier volet de l'étude consacré à la phase d'optimisation du procédé FMS a démontré une augmentation des performances de croissance de la souche *A. sojae* en modifiant les conditions de culture (température, pH, aération) et en enrichissant le milieu avec des sources de carbones facilement métabolisables comme le saccharose. Bien que celui-ci soit entièrement consommé par le microorganisme, il n'est pas suffisamment converti en biomasse pour rendre le contenu en β -glucane détectable. L'ensemble des essais effectués en condition aérée (miniréacteur et pilote de 50 L CNS) ont permis de mettre en place une stratégie visant à maintenir les conditions optimales de croissance *via* la modification des consignes de régulation et l'application des agitations qui sont nécessaires à l'élimination de la chaleur métabolique. Cette étude a mis en évidence la formation de gradients d'oxygène et de température principalement dus à la granulométrie fine du tourteau de colza entraînant un phénomène de compaction qui est amplifié avec l'augmentation de la hauteur de couche. La présence de contaminants bactériens en cours de fermentation dans les CNS a été en partie maîtrisée grâce à l'abaissement du pH initial car la stérilisation du tourteau n'est évidemment pas envisageable à échelle industrielle. Pour baisser le pH du milieu de culture, plusieurs stratégies peuvent être envisagées comme l'addition de solutions acides ou l'apport de sels d'ammonium favorisant la sécrétion d'acides organiques ¹⁹⁶. L'utilisation d'une souche plus compétitive dont le métabolisme maintient des valeurs de pH assez basses représente une solution supplémentaire. La qualité

microbiologique du tourteau de colza peut également être contrôlée en limitant le temps de stockage suite au procédé de trituration des graines de colza.

Ces travaux ont montré que la valorisation biotechnologique du tourteau de colza par fermentation en milieu solide est particulièrement intéressante et prometteuse dans le cadre d'une application en alimentation animale. En effet, cette technologie est relativement simple à mettre en œuvre pour l'élaboration d'un aliment fermenté innovant qui comporte à la fois des bénéfices concernant l'aspect nutritionnel et fonctionnel dans le but de répondre au mieux aux besoins de la filière. Afin d'atteindre ces objectifs et valider la faisabilité du procédé pour une extrapolation à échelle industrielle, des études complémentaires sont nécessaires en se focalisant particulièrement sur l'étude de la granulométrie, la maîtrise de la qualité microbiologique et l'identification des molécules responsables de l'activité immunomodulatrice.

Concernant la valeur nutritionnelle du tourteau de colza fermenté, des analyses supplémentaires seraient intéressantes à mener notamment par rapport à la composition en acides aminés digestibles, minéraux et vitamines. *A. sojae* est également connue pour sa production d'enzymes extracellulaires (pectinases, protéases, xylanases et β -glucosidases²⁹³⁻²⁹⁵) susceptibles d'augmenter la digestibilité du tourteau de colza en dégradant certains facteurs antinutritionnels comme les fibres. Cette étude permettrait également d'établir un lien entre les enzymes sécrétées et la solubilisation progressive des protéines du tourteau. Il serait également possible de sélectionner d'autres souches dont le profil enzymatique est plus adapté. La présence d'une activité enzymatique dans le produit fermenté est avantageuse dans la mesure où des cocktails enzymatiques sont systématiquement additionnés dans la ration alimentaire destinée aux animaux.

D'autres axes restent également à développer pour la phase d'optimisation du procédé. La recherche d'un cosubstrat de granulométrie plus importante que le tourteau est primordiale pour éviter la formation de gradients et favoriser les transferts de masse (oxygène, nutriments et métabolites) et de chaleur au sein de la matrice solide. L'utilisation du tourteau seul sous forme de farine n'est pas envisageable à l'heure actuelle au stade industriel mais un prétraitement comme la cuisson-extrusion peut éventuellement être envisagé en tenant compte de l'incidence qu'il peut avoir sur la qualité des nutriments. Les limites constatées lors du fonctionnement du réacteur CNS ont conduit à des modifications du système de régulation de l'air entrant pour le rendre plus réactif et performant par rapport aux changements de consignes et à l'élimination de la chaleur métabolique. Le bain-marie a été remplacé par un groupe froid, un circuit chaud composé d'une résistance électrique, ainsi qu'un humidificateur raccordé au réseau de vapeur du laboratoire. Chaque module est piloté indépendamment en tenant compte des valeurs de consignes et de celles enregistrées par les sondes de température et d'humidité relative. Ce système de régulation a depuis lors été validé en utilisant

différents couples microorganisme/substrat et peut donc servir de base à la conception d'une future installation de type industrielle.

L'étude concernant l'activité immunomodulatrice déterminée *in vitro* reste à approfondir pour l'identification des molécules impliquées particulièrement chez les champignons inférieurs et la compréhension des mécanismes d'action sur le système immunitaire. Certains échantillons servant de référence avec essentiellement du β -glucane purifié n'ont pas donné de résultats significatifs, suggérant une différence entre la qualité des produits et/ou la composition modifiant de ce fait la réponse immunitaire.

Afin de pouvoir conclure sur l'effet pharmacologique potentiellement induit par le tourteau fermenté avec la souche *A. sojae*, le produit fermenté a été testé *in vivo* sur animaux. Deux séries d'essais sur poulet ont été effectuées à l'issue du projet avec un témoin représenté par une ration quotidienne sans complément, la ration avec le produit fermenté issu d'une culture en réacteur CNS ainsi que le produit commercial ImmunoWall. Ces additifs ont été apportés à des concentrations allant de 0.1 à 1% et appliqués sur une période allant de 0 à 38 jours, chaque traitement a été répété 9 fois. Afin de mettre en évidence des effets sur la santé des animaux des conditions « challenge » ont été appliquées avec des poussins plus fragiles issus de jeunes pondeuses soumis à des stress immunitaires (vaccins), alimentaires et sanitaires. Malgré ces conditions, les résultats ne sont pas significatifs avec une trop forte variabilité quel que soit le traitement appliqué (témoin et complément) concernant les paramètres zootechniques mesurés (mortalité, poids vif, gain moyen quotidien, indice de consommation, etc.) ainsi que les analyses complémentaires visant à déterminer un éventuel effet sur le système immunitaire (formule leucocytaire, dosage des anticorps, etc.). Des taux d'incorporations supérieurs devront être testés à l'avenir en intégrant éventuellement d'autres produits commerciaux riches en glucane fongique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Commissariat général au développement durable. Les chiffres clés de l'énergie, édition 2015. *Repères* 1–48 (2016).
2. Directive 2009/28/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 avril 2009 relative à la promotion de l'utilisation de l'énergie produite à partir de sources renouvelables et modifiant puis abrogeant les directives 2001/77/CE et 2003/30/CE. *J. Off. L'Union Eur.* **L140**, 16–62 (2009).
3. Bouvarel, I. *et al.* Des sources de protéines locales pour l'alimentation des volailles : quelles voies de progrès ? *OCL* **21**, D405 (2014).
4. Khajali, F. & Slominski, B. A. Factors that affect the nutritive value of canola meal for poultry. *Poult. Sci.* **91**, 2564–2575 (2012).
5. Vig, A. P. & Walia, A. Beneficial effects of *Rhizopus oligosporus* fermentation on reduction of glucosinolates, fibre and phytic acid in rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Bioresour. Technol.* **78**, 309–312 (2001).
6. Ugwuanyi, J. O., McNeil, B. & Harvey, L. M. Production of Protein-Enriched Feed Using Agro-Industrial Residues as Substrates. in *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation* (eds. Nigam, P. S. nee' & Pandey, A.) 77–103 (Springer Netherlands, 2009).
7. Shi, C. *et al.* Solid state fermentation of rapeseed cake with *Aspergillus niger* for degrading glucosinolates and upgrading nutritional value. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **6**, 13 (2015).
8. Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R. & Pandey, A. Oil cakes and their biotechnological applications—A review. *Bioresour. Technol.* **98**, 2000–2009 (2007).
9. Duchiron, F. & Copinet, E. Fermentation en milieu solide (FMS). *Tech. L'ingénieur* (2011).
10. Singhanian, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R. & Pandey, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **44**, 13–18 (2009).
11. Basalan, M. & Abubakar, M. Biotechnology and Animal Nutrition. in *The Role of Biotechnology in Improvement of Livestock* (eds. Abubakar, M., Saeed, A. & Kul, O.) 27–39 (Springer Berlin Heidelberg, 2015).
12. Huyghebaert, G., Ducatelle, R. & Van Immerseel, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* **187**, 182–188 (2011).
13. Zhu, F., Du, B. & Xu, B. A critical review on production and industrial applications of beta-glucans. *Food Hydrocoll.* **52**, 275–288 (2016).
14. Tzianabos, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 523–533 (2000).
15. Dalonso, N., Goldman, G. H. & Gern, R. M. M. β -(1→3),(1→6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 7893–7906 (2015).
16. Lull, C., Wichers, H. J. & Savelkoul, H. F. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm.* **2005**, 63–80 (2005).
17. Fédération Française des Producteurs d'Oléagineux et de Protéagineux (FOP). Marché mondial des oléagineux. 1–7 (2016).
18. FranceAgriMer. Note de conjoncture Oléo-protéagineux, Analyse économique de FranceAgriMer - Panorama trimestriel des marchés oléo-protéagineux. 1–6 (2016).
19. Carre, P. & Pouzet, A. Rapeseed market, worldwide and in Europe. *OCL* **21**, D102 (2014).
20. FranceAgriMer. Les fiches de FranceAgriMer, Grandes cultures – filière Oléagineux. 1–2 (2015).
21. Terres inovia. *Rapport d'activité 2014*. 1–79 (2014).
22. Devillers, P. H. *et al.* Huiles végétales, guide d'aide à l'application des Meilleures Technologies Disponibles. *ITERG* (2010).

23. Jahreis, G. & Schäfer, U. Rapeseed (*Brassica napus*) Oil and its Benefits for Human Health. in *Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention (1st ed.)* (eds. Preedy, V. R., Watson, R. R. & Patel, V. B.) 967–974 (Academic Press, 2011).
24. Peyronnet, C., Lacampagne, J.-P., Cadre, P. L. & Pressenda, F. Les sources de protéines dans l'alimentation du bétail en France : la place des oléoprotéagineux. *OCL* **21**, D402 (2014).
25. Vigour, B., Peyronnet, C., Quinsac, A., Hallouis, J. M. & Lessire, M. Comparison of energy utilisation and nitrogen digestibility of rapeseed meal in roosters, broiler chicken and turkeys. in *13th European Poultry Conference (EPC 2010)* **66**, 459 (World's Poultry Science Journal, 2010).
26. Blum, J. C. *L'alimentation des animaux monogastriques porc lapin volailles*. (Institut National de la Recherche Agronomique - INRA, 1989).
27. Lessire, M., Hallouis, J. M., Quinsac, A., Peyronnet, C. & Bouvarel, I. Valeurs énergétique et azotée des nouveaux tourteaux de colza obtenus par pressage; comparaison entre coq et poulet. in *8èmes Journées de la Recherche Avicole* 249–253 (Journées de la Recherche Avicole, 2009).
28. Evrard, J. Les tourteaux d'oléagineux, source de protéines en alimentation animale. *Ol. Corps Gras Lipides* **12**, 224–227 (2005).
29. Interventions d'automne : les bons conseils pour la campagne 2011/2012, Le tourteau de colza : sûr, économique et facile à utiliser. *Arvalis - Cetiom* 18–23 (2011).
30. Rymer, C. & Short, F. *The Nutritive Value for Livestock of UK Oilseed Rape and Rapeseed Meal*. (Home Grown Cereals Authority, 2003).
31. Sauvant, D., Perez, J. M. & Tran, G. *Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage (Porcs, volailles, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons)*. (INRA Editions, 2004).
32. Bellostas, M. N., Sorensen, H. & Sorensen, S. Quality of rapeseed meal for animal nutrition and as a source of value-added products - glucosinolates, protein and fibres. in *Nutrition and Processing Workshop of the International Rapeseed Congress* (2007).
33. Martineau, R., Ouellet, D. R. & Lapierre, H. The effect of feeding canola meal on concentrations of plasma amino acids. *J. Dairy Sci.* **97**, 1603–1610 (2014).
34. Lacassagne, L. Inra Productions Animales - Alimentation des volailles : substituts au tourteau de soja. 2. Le tourteau de colza. *INRA Prod. Anim.* **1**, 123–128 (1988).
35. Rodrigues, I. M., Coelho, J. F. J. & Carvalho, M. G. V. S. Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *J. Food Eng.* **109**, 337–346 (2012).
36. Tripathi, M. K. & Mishra, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **132**, 1–27 (2007).
37. Wickramasuriya, S. S., Yi, Y.-J., Yoo, J., Kang, N. K. & Heo, J. M. A review of canola meal as an alternative feed ingredient for ducks. *J. Anim. Sci. Technol.* **57**, 29 (2015).
38. Diarra, S. S., Usman, B. A., Igwebuike, J. U. & Yisa, A. G. Breeding for Efficient Phytate-phosphorus Utilization by Poultry. *Int. J. Poult. Sci.* **9**, 923–930 (2010).
39. Coulibaly, A., Kouakou, B. & Chen, J. Phytic acid in cereal grains: structure, healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. *Am. J. Plant Nutr. Fertil. Technol.* **1**, 1–22 (2011).
40. Bedford, M. R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition—their current value and future benefits. *Anim. Feed Sci. Technol.* **86**, 1–13 (2000).
41. Haefner, S. *et al.* Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 588–597 (2005).
42. Selle, P. H. & Ravindran, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* **135**, 1–41 (2007).

43. Rozan, P. *et al.* Detoxication of rapeseed meal by *Rhizopus Oligosporus* sp-T3: A first step towards rapeseed protein concentrate. *Int. J. Food Sci. Technol.* **31**, 85–90 (1996).
44. Xu, L. & Diosady, L. L. Removal of phenolic compounds in the production of high-quality canola protein isolates. *Food Res. Int.* **35**, 23–30 (2002).
45. Naczek, M., Amarowicz, R., Sullivan, A. & Shahidi, F. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: a review. *Food Chem.* **62**, 489–502 (1998).
46. Xu, L. & Diosady, L. L. Interactions between canola proteins and phenolic compounds in aqueous media. *Food Res. Int.* **33**, 725–731 (2000).
47. Larbier, M. & Leclercq, B. *Nutrition et alimentation des volailles*. (Editions Quae, 1992).
48. Kracht, W. *et al.* Effect of dehulling of rapeseed on feed value and nutrient digestibility of rape products in pigs. *Arch. Anim. Nutr.* **58**, 389–404 (2004).
49. Slominski, B. A., Simbaya, J., Campbell, L. D., Rakow, G. & Guenter, W. Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. *Anim. Feed Sci. Technol.* **78**, 249–262 (1999).
50. Carré, B., Mignon-Grasteau, S. & Juin, H. Breeding for feed efficiency and adaptation to feed in poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* **64**, 377–390 (2008).
51. Dhama, K. *et al.* Growth promoters and novel feed additives improving poultry production and health, bioactive principles and beneficial applications: The trends and advances-A Review. *Int. J. Pharmacol.* **10**, 129–159 (2014).
52. Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Sigoillot, J.-C. & Fine, F. Rapeseed and sunflower meal: a review on biotechnology status and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1105–1114 (2012).
53. Wenk, C. Recent advances in animal feed additives such as metabolic modifiers, antimicrobial agents, probiotics, enzymes and highly available minerals. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **13**, 86–95 (2000).
54. Ravindran, V. Main ingredients used in poultry feed formulations. *Poult. Dev. Rev. Ed FAO* 67–69 (2013).
55. Règlement (CE) n° 999/2001 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2001 fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *J. Off. Communautés Eur.* **L 147**, 1–40 (2001).
56. Règlement (UE) n° 56/2013 de la Commission du 16 janvier 2013 modifiant les annexes I et IV du règlement (CE) n°999/2001 du Parlement européen et du Conseil fixant les règles pour la prévention, le contrôle et l'éradication de certaines encéphalopathies spongiformes transmissibles. *J. Off. L'Union Eur.* **L21**, 3–16 (2013).
57. Règlement (CE) n° 1831/2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux. *J. Off. L'Union Eur.* **L268**, 30–43 (2003).
58. Castanon, J. I. R. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult. Sci.* **86**, 2466–2471 (2007).
59. Demain, A. L. & Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot. (Tokyo)* **62**, 5–16 (2009).
60. Leeson, S. & Summers, J. D. *Commercial poultry nutrition (3rd edition)*. (Nottingham University Press, 2009).
61. Scanes, C. G., Brant, G. & Deceased, M. E. E. *Poultry Science (4th edition)*. (Prentice Hall, 2003).
62. Gallois, M. & Oswald, I. P. Les additifs immunomodulateurs dans l'alimentation du porcelet sont-ils une alternative aux antimicrobiens facteurs de croissance ? in *Journées Recherche Porcine* **41**, 79–88 (2009).

63. Anupama & Ravindra, P. Value-added food:: Single cell protein. *Biotechnol. Adv.* **18**, 459–479 (2000).
64. Ghorai, S. *et al.* Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Res. Int.* **42**, 577–587 (2009).
65. Dharmaraj, S. & Dhevendaran, K. Evaluation of *Streptomyces* as a probiotic feed for the growth of ornamental fish *Xiphophorus helleri*. *Food Technol. Biotechnol.* **48**, 497–504 (2010).
66. Chand, N. & Khan, R. U. Replacement of Soybean Meal with Yeast Single Cell Protein in Broiler Ration: The Effect on Performance Traits. *Pak. J. Zool.* **46**, 1753–1758 (2014).
67. Chiang, G. *et al.* Effects of feeding solid-state fermented rapeseed meal on performance, nutrient digestibility, intestinal ecology and intestinal morphology of broiler chickens. *Asian-Aust J Anim Sci* **23**, 263–271 (2010).
68. Hong, K.-J., Lee, C.-H. & Kim, S. W. *Aspergillus oryzae* GB-107 Fermentation Improves Nutritional Quality of Food Soybeans and Feed Soybean Meals. *J. Med. Food* **7**, 430–435 (2004).
69. Mathivanan, R., Selvaraj, P. & Nanjappan, K. Feeding of fermented soybean meal on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.* **5**, 868–872 (2006).
70. Chen, K.-L. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* var. natto and *Saccharomyces cerevisiae* mixed fermented feed on the enhanced growth performance of broilers. *Poult. Sci.* **88**, 309–315 (2009).
71. Shimizu, S. Vitamins and related compounds: microbial production. *Biotechnol. Set Second Ed.* 318–340 (2008).
72. Leuchtenberger, W., Huthmacher, K. & Drauz, K. Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 1–8 (2005).
73. Ikeda, M. Amino Acid Production Processes. in *Microbial Production of l-Amino Acids* (eds. Faurie, D. R. *et al.*) 1–35 (Springer Berlin Heidelberg, 2003).
74. Butaye, P., Devriese, L. A. & Haesebrouck, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 175–188 (2003).
75. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).
76. Elander, R. P. Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 385–392 (2003).
77. Graminha, E. B. N. *et al.* Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* **144**, 1–22 (2008).
78. Howard, R. L., Abotsi, E., Van Rensburg, E. J. & Howard, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *Afr. J. Biotechnol.* **2**, 602–619 (2003).
79. Kumar, C. G. & Takagi, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* **17**, 561–594 (1999).
80. Jayani, R. S., Saxena, S. & Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem.* **40**, 2931–2944 (2005).
81. Bonneau, M. & Laarveld, B. Biotechnology in animal nutrition, physiology and health. *Livest. Prod. Sci.* **59**, 223–241 (1999).
82. Patterson, J. A. & Burkholder, K. M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poult. Sci.* **82**, 627–631 (2003).
83. Aida, F. M. N. A., Shuhaimi, M., Yazid, M. & Maaruf, A. G. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 567–575 (2009).

84. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N. & Prapulla, S. G. Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 442–457 (2005).
85. Albayrak, N. & Yang, S.-T. Production of galacto-oligosaccharides from lactose by *Aspergillus oryzae* β -galactosidase immobilized on cotton cloth. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 8–19 (2002).
86. Van Zyl, W. H., Rose, S. H., Trollope, K. & Görgens, J. F. Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochem.* **45**, 1203–1213 (2010).
87. Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. & Branduardi, P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends Biotechnol.* **26**, 100–108 (2008).
88. Bhosale, P. & Bernstein, P. S. Microbial xanthophylls. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 445–455 (2005).
89. Kirti, K., Amita, S., Priti, S. & Jyoti, S. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. *Adv. Biol.* **2014**, (2014).
90. Hernandez-Almanza, A. *et al.* Lycopene: Progress in microbial production. *Trends Food Sci. Technol.* **56**, 142–148 (2016).
91. Breithaupt, D. E. Modern application of xanthophylls in animal feeding—a review. *Trends Food Sci. Technol.* **18**, 501–506 (2007).
92. Hayen, G. D. & Pollmann, D. S. Animal feeds comprising yeast glucan. US6214337 (B1). (2001).
93. Guo, F. C. *et al.* Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of *Eimeria tenella*-infected chickens. *Poult. Sci.* **83**, 1124–1132 (2004).
94. Hashemi, S. R. & Davoodi, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Vet. Res. Commun.* **35**, 169–180 (2011).
95. Jacob, J. P. & Pescatore, A. J. Barley β -glucan in poultry diets. *Ann. Transl. Med.* **2**, (2014).
96. Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R. & Lan, C. Q. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.* **104**, 1–13 (2008).
97. Silva, P. M., Gonçalves, S. & Santos, N. C. Defensins: antifungal lessons from eukaryotes. *New Edge Antibiot. Dev. Antimicrob. Pept. Corresp. Resist.* **5**, 75 (2014).
98. *CFR - Code of Federal Regulations Title 21, Food and Drugs.* (FDA - Food and Drug Administration, 2016).
99. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update): QPS 2013 update. *EFSA J.* **11**, 3449 (2013).
100. Règlement (UE) N° 68/2013 relatif au catalogue des matières premières pour aliments des animaux. *J. Off. L'Union Eur.* **L29**, 1–64 (2013).
101. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. *EFSA J.* **14**, e04522 (2016).
102. Rahardjo, Y. S., Tramper, J. & Rinzema, A. Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: a review and perspectives. *Biotechnol. Adv.* **24**, 161–179 (2006).
103. Couto, S. R. & Sanroman, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *J. Food Eng.* **76**, 291–302 (2006).
104. Hölker, U. & Lenz, J. Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 301–306 (2005).
105. Durand, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**, 113–125 (2003).

106. Mienda, B. S., Idi, A. & Umar, A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications-An overview. *Res. Biotechnol.* **2**, 21–26 (2011).
107. Assamoi, A. A., Destain, J. & Thonart, P. Microbial aspects of endo- β -1, 4-xylanase production in solid-state fermentation by Penicillia: the case of *Penicillium canescens*. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **13**, 281–294 (2009).
108. Pandey, A., Soccol, C. R. & Mitchell, D. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochem.* **35**, 1153–1169 (2000).
109. Mitchell, D. A., de Lima Luz, L. F., Krieger, N. & Berovič, M. 2.25-Bioreactors for Solid-State Fermentation. in *Comprehensive Biotechnology, Second ed* **2**, 347 – 360 (Elsevier, 2011).
110. Bennett, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.* **66**, 101–107 (1998).
111. Branger, A. Fabrication de produits alimentaires par fermentation: les ferments. *Tech. Ing. Agroaliment.* **2**, (2004).
112. Fan, L., Soccol, C. R. & Pandey, A. Mushroom Production. in *Current Developments in Solid-state Fermentation* (eds. Pandey, A., Soccol, C. R. & Larroche, C.) 253–274 (Springer New York, 2008).
113. Bourdichon, F. *et al.* Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* **154**, 87–97 (2012).
114. *Fermented foods, Part I: biochemistry and biotechnology.* (CRC Press, 2015).
115. Blandino, A., Al-Aseeri, M. E., Pandiella, S. S., Cantero, D. & Webb, C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* **36**, 527–543 (2003).
116. Sari, M., Prange, A., Lelley, J. I. & Hambitzer, R. Screening of beta-glucan contents in commercially cultivated and wild growing mushrooms. *Food Chem.* **216**, 45–51 (2017).
117. Blumenthal, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **39**, 214–228 (2004).
118. Mitchell, D. A., Berovic, M. & Krieger, N. *Solid-State Fermentation Bioreactors - Fundamentals of Design and Operation.* (Springer, 2006).
119. Dhillon, G. S., Oberoi, H. S., Kaur, S., Bansal, S. & Brar, S. K. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind. Crops Prod.* **34**, 1160–1167 (2011).
120. Gawande, P. V. & Kamat, M. Y. Production of *Aspergillus* xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application. *J. Appl. Microbiol.* **87**, 511–519 (1999).
121. Shivanna, G. B. & Venkateswaran, G. Phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through submerged and solid-state fermentation. *Sci. World J.* **2014**, (2014).
122. Pandya, J. J. & Gupte, A. Production of xylanase under solid-state fermentation by *Aspergillus tubingensis* JP-1 and its application. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**, 769–779 (2012).
123. Raghavarao, K., Ranganathan, T. V. & Karanth, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**, 127–135 (2003).
124. Gervais, P. & Molin, P. The Role of Water in Solid State Fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**, 85–101 (2003).
125. Junior, Z., Luiz, L., Linde, G. A. & Colauto, N. B. Carbon-to-nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. *Acta Sci. Agron.* **32**, 55–60 (2010).
126. *Current Developments in Solid-state Fermentation.* (Springer Science & Business Media, 2008).
127. Durand, A., Vergoignan, C. & Desgranges, C. Biomass estimation in solid state fermentation. in *Advances in Solid State Fermentation* (eds. Roussos, S., Lonsane, B. K., Raimbault, M. & Viniegra-Gonzalez, G.) 23–37 (Springer, 1997).

128. Abdul Manan, M. Design aspects of solid state fermentation. (PhD Thesis. University of Manchester, 2014).
129. Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M. & Javed, S. Solid-state fermentation: an overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **22**, 49–70 (2008).
130. Terebiznik, M. R. & Pilosof, A. M. R. Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. *Biotechnol. Tech.* **13**, 215–219 (1999).
131. Desgranges, C., Georges, M., Vergoignan, C. & Durand, A. Biomass estimation in solid state fermentation II. On-line measurements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 206–209 (1991).
132. Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M. & Durand, A. Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 200–205 (1991).
133. Steudler, S. & Bley, T. Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **38**, 1313–1323 (2015).
134. Ali, H. K. Q. & Zulkali, M. M. D. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: a review. *Chem. Biochem. Eng. Q.* **25**, 255–266 (2011).
135. Durand, A. & Chereau, D. A new pilot reactor for solid-state fermentation: Application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 476–486 (1988).
136. Villas-Boas, S. G., Esposito, E. & Mitchell, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **98**, 1–12 (2002).
137. Wang, X. *et al.* Screening of glucosinolate-degrading strains and its application in improving the quality of rapeseed meal. *Ann. Microbiol.* **62**, 1013–1020 (2012).
138. Zuchowski, J., Pecio, L., Jaszek, M. & Stochmal, A. Solid-state fermentation of rapeseed meal with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **171**, 2075–2081 (2013).
139. Kupski, L. *et al.* Solid-state fermentation for the enrichment and extraction of proteins and antioxidant compounds in rice bran by *Rhizopus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **55**, 937–942 (2012).
140. Bau, H.-M. *et al.* Effect of a solid-state fermentation using *Rhizopus oligosporus* sp.T-3 on elimination of antinutritional substances and modification of biochemical constituents of defatted rapeseed meal. *J. Sci. Food Agric.* **65**, 315–322 (1994).
141. Safari, O. *et al.* Study on the effect of solid state fermentation with *Aspergillus niger* on antinutritional factors of canola protein concentrate with aim of using in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). in *The 1th International and the 4th National Congress on Recycling of Organic Waste in Agriculture* (2012).
142. Anderson-Hafermann, J. C., Zhang, Y. & Parsons, C. M. Effects of processing on the nutritional quality of canola meal. *Poult. Sci.* **72**, 326–333 (1993).
143. Caprita, A. & Caprita, R. In vitro techniques to estimate amino acid digestibility. *J. Agroaliment. Process. Technol.* **15**, 19–27 (2009).
144. Shi, C. *et al.* Amino acid, phosphorus, and energy digestibility of fermented rapeseed meal fed to growing pigs. *J. Anim. Sci.* **93**, 2916–2925 (2015).
145. Snyder, A., Morra, M. J., Johnson-Maynard, J. & Thill, D. C. Seed Meals from Brassicaceae Oilseed Crops as Soil Amendments: Influence on Carrot Growth, Microbial Biomass Nitrogen, and Nitrogen Mineralization. *HortScience* **44**, 354–361 (2009).
146. Croat, J. R., Berhow, M., Karki, B., Muthukumarappan, K. & Gibbons, W. R. Conversion of canola meal into a high-protein feed additive via solid-state fungal incubation process. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **93**, 499–507 (2016).

147. Maesoomi, S. M., Ghorbani, G. R., Alikhani, M. & Nikkhah, A. Short communication: Canola meal as a substitute for cottonseed meal in diet of midlactation Holsteins. *J. Dairy Sci.* **89**, 1673–1677 (2006).
148. Wang, X.-D. *et al.* Degradation of tannins and phytic acid in double-low rapeseed meal by *Aspergillus niger* in solid fermentation and optimization of fermenting condition. *Period. Ocean Univ. China* **43**, 15–22 (2013).
149. Liu, L., Guo, Y., Qiu, S. & Zhou, H. Study on improving the nutritive value of cold-pressed rapeseed cake with microbes under solid-state fermentation. *Food Sci. Technol.* **8**, 5 (2011).
150. Nair, V. C. & Duvnjak, Z. Reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus ficuum* in solid state fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 183–188 (1990).
151. Wu, Y., Yao, X., Sun, H., Wang, X. & Tang, J. Optimization of solid-state fermentation conditions of rapeseed meal using response surface analysis combined with principal component analysis. *J. Zhejiang Univ. Agric. Life Sci.* **38**, 490–496 (2012).
152. Al-Asheh, S. & Duvnjak, Z. Phytase production and decrease of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* in solid-state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 228–231 (1995).
153. Ashayerizadeh, A., Dastar, B., Shargh, M. S., Mahoonak, A. S. & Zerehdaran, S. Fermented rapeseed meal is effective in controlling *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection and improving growth performance in broiler chicks. *Vet. Microbiol.* **201**, 93–102 (2017).
154. Fazhi, X. *et al.* Effects of fermented rapeseed meal on growth performance and serum parameters in ducks. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **24**, 678–684 (2011).
155. Xu, F. Z., Zeng, X. G. & Ding, X. L. Effects of Replacing Soybean Meal with Fermented Rapeseed Meal on Performance, Serum Biochemical Variables and Intestinal Morphology of Broilers. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **25**, 1734–1741 (2012).
156. Song, Y. S., Pérez, V. G., Pettigrew, J. E., Martinez-Villaluenga, C. & de Mejia, E. G. Fermentation of soybean meal and its inclusion in diets for newly weaned pigs reduced diarrhea and measures of immunoreactivity in the plasma. *Anim. Feed Sci. Technol.* **159**, 41–49 (2010).
157. Yuan, L. *et al.* Fermented soybean meal improves the growth performance, nutrient digestibility, and microbial flora in piglets. *Anim. Nutr.* **3**, 19–24 (2017).
158. Kim, S. W., Van Heugten, E., Ji, F., Lee, C. H. & Mateo, R. D. Fermented soybean meal as a vegetable protein source for nursery pigs: I. Effects on growth performance of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* **88**, 214–224 (2010).
159. Huff, G. R., Huff, W. E., Rath, N. & Tellez, G. Limited treatment with β -1, 3/1, 6-glucan improves production values of broiler chickens challenged with *Escherichia coli*. *Poult. Sci.* **85**, 613–618 (2006).
160. Chan, G. C.-F., Chan, W. K. & Sze, D. M.-Y. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2**, (2009).
161. Latgé, J.-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**, 279–290 (2007).
162. Chen, J. & Seviour, R. Medicinal importance of fungal β -(1→3),(1→6)-glucans. *Mycol. Res.* **111**, 635–652 (2007).
163. Meng, X., Liang, H. & Luo, L. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydr. Res.* **424**, 30–41 (2016).
164. Ferreira, S. S., Passos, C. P., Madureira, P., Vilanova, M. & Coimbra, M. A. Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* **132**, 378–396 (2015).

165. Volman, J. J. Immune modulation by dietary glucans from oat and mushrooms; results from in vitro, animal and human studies. (PhD Thesis. Maastricht university, 2009).
166. Kumar, S. *et al.* Immune response gene expression in spleens of diverse chicken lines fed dietary immunomodulators. *Poult. Sci.* **90**, 1009–1013 (2011).
167. Tang, Y., Zhu, L., Li, H. & Li, D. Submerged culture of mushrooms in bioreactors-challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol. Biotechnol.* **45**, 221–229 (2007).
168. Wasser, S. P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 258–274 (2002).
169. Zhu, F., Du, B., Bian, Z. & Xu, B. Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *J. Food Compos. Anal.* **41**, 165–173 (2015).
170. Kyanko, M. V., Canel, R. S., Ludemann, V., Pose, G. & Wagner, J. R. β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Appl. Biochem. Microbiol.* **49**, 41–45 (2013).
171. Pengkumsri, N. *et al.* Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Sci. Technol. Camp.* **37**, (2016).
172. Ferreira, J. A., Mahboubi, A., Lennartsson, P. R. & Taherzadeh, M. J. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. *Bioresour. Technol.* **215**, 334–345 (2016).
173. Ramberg, J. E., Nelson, E. D. & Sinnott, R. A. Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutr. J.* **9**, (2010).
174. Singdevsachan, S. K. *et al.* Mushroom polysaccharides as potential prebiotics with their antitumor and immunomodulating properties: A review. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **7**, 1–14 (2016).
175. Ruthes, A. C., Smiderle, F. R. & Iacomini, M. Mushroom heteropolysaccharides: A review on their sources, structure and biological effects. *Carbohydr. Polym.* **136**, 358–375 (2016).
176. Chen, K.-L. *et al.* Direct enhancement of the phagocytic and bactericidal capability of abdominal macrophage of chicks by β -1, 3-1, 6-glucan. *Poult. Sci.* **87**, 2242–2249 (2008).
177. Lowry, V. K. *et al.* Purified β -glucan as an abiotic feed additive up-regulates the innate immune response in immature chickens against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int. J. Food Microbiol.* **98**, 309–318 (2005).
178. Cox, C. M. *et al.* Immune responses to dietary β -glucan in broiler chicks during an *Eimeria* challenge. *Poult. Sci.* **89**, 2597–2607 (2010).
179. Rathgeber, B. M., Budgell, K. L., MacIsaac, J. L., Mirza, M. A. & Doncaster, K. L. Growth performance and spleen and bursa weight of broilers fed yeast beta-glucan. *Can. J. Anim. Sci.* **88**, 469–473 (2008).
180. Zhang, B., Guo, Y. & Wang, Z. The modulating effect of beta-1, 3/1, 6-glucan supplementation in the diet on performance and immunological responses of broiler chickens. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* **21**, 237–244 (2008).
181. Chae, B. J. *et al.* Effects of supplementation of β -glucan on the growth performance and immunity in broilers. *Res. Vet. Sci.* **80**, 291–298 (2006).
182. An, B. K. *et al.* Growth performance and antibody response of broiler chicks fed yeast derived β -glucan and single-strain probiotics. *Asian-Aust J Anim Sci* **21**, 1027–1032 (2008).
183. Shi, M., Yang, Y., Guan, D., Zhang, Y. & Zhang, Z. Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. *Carbohydr. Polym.* **89**, 1268–1276 (2012).

184. Kim, H., Suh, H.-J., Kwon, K.-H., Hwang, J.-H. & Yu, K.-W. Immunostimulation activity of a polysaccharide from fermented ginseng with *Herichium erinaceum* mycelia in solid-state culture. *Food Sci. Biotechnol.* **25**, 311–318 (2016).
185. Liu, Y.-H. *et al.* Effects of hot-water extracts from *Ganoderma lucidum*. *Bot. Stud.* **56**, 1–10 (2015).
186. Shi, M., Yang, Y., Guan, D., Wang, Y. & Zhang, Z. Evaluation of solid-state fermentation by *Ganoderma lucidum* using soybean curd residue. *Food Bioprocess Technol.* **6**, 1856–1867 (2013).
187. Jia, X.-N., Dong, W., Lu, W.-D., Guo, L.-Z. & Wei, Y.-X. In vivo immunostimulatory and tumor-inhibitory activities of polysaccharides isolated from solid-state-cultured *Trametes robiniophila* Murrill. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 2057–2063 (2009).
188. Svagelj, M. *et al.* Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (Dicks: Fr) SF Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra- and extracellular β -polysaccharides. *New Biotechnol.* **25**, 150–156 (2008).
189. Oner, E. T. Microbial production of extracellular polysaccharides from biomass. in *Pretreatment techniques for biofuels and biorefineries* (ed. Fang, Z.) 35–56 (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
190. Nwe, N., Furuike, T. & Tamura, H. Production, properties and applications of fungal cell wall polysaccharides: chitosan and glucan. in *Chitosan for Biomaterials II* (eds. Jayakumar, R., Prabakaran, M. & Muzzarelli, R. A. A.) **244**, 187–207 (Springer, 2011).
191. Khalaf, S. A. Production and characterization of fungal chitosan under solid-state fermentation conditions. *Int. J. Agric. Biol. Pak.* **6**, 1033–1036 (2004).
192. Sugumaran, K. R., Jothi, P. & Ponnusami, V. Bioconversion of industrial solid waste—Cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. *Carbohydr. Polym.* **99**, 22–30 (2014).
193. Yu, K. W., Kim, Y. S., Shin, K. S., Kim, J. M. & Suh, H. J. Macrophage-stimulating activity of exo-biopolymer from cultured rice bran with *Monascus pilosus*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **126**, 35–48 (2005).
194. Li, S. Utilization of Soybean Curd Residue for Polysaccharides Production by *Morchella esculenta* and Evaluation of its Biological Activity. (PhD Thesis. University of Tsukuba, 2014).
195. Tamang, J. P., Shin, D.-H., Jung, S.-J. & Chae, S.-W. Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
196. Raimbault, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* **1**, 26–27 (1998).
197. Mitchell, D. A., von Meien, O. F., Krieger, N. & Dalsenter, F. D. H. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **17**, 15–26 (2004).
198. Nagel, F.-J., Oostra, J., Tramper, J. & Rinzema, A. Improved model system for solid-substrate fermentation: effects of pH, nutrients and buffer on fungal growth rate. *Process Biochem.* **35**, 69–75 (1999).
199. Smits, J. P., Rinzema, A., Tramper, J., Sonsbeek, H. V. & Knol, W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 489–496 (1996).
200. Larroche, C., Moksia, J. & Gros, J.-B. A convenient method for initial dry weight determination in samples from solid state cultivations. *Process Biochem.* **33**, 447–451 (1998).
201. Smits, J. P., Rinzema, A., Tramper, J., Schlösser, E. E. & Knol, W. Accurate determination of process variables in a solid-state fermentation system. *Process Biochem.* **31**, 669–678 (1996).
202. Mauron, J. Influence of processing on protein quality. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **36**, 57–69 (1990).

203. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. *Vol 15th Ed AOAC Arlingt. VA* (1990).
204. BIPEA Bureau Interprofessionnel d'Etudes. Recueil des méthodes d'analyse des communautés européennes. *BIPEA Gennevilliers* (1976).
205. Fernandez, S. R., Zhang, Y. & Parsons, C. M. Determination of protein solubility in oilseed meals using coomassie blue dye binding. *Poult. Sci.* **72**, 1925–1930 (1993).
206. Saucedo-Castaneda, G. *et al.* On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem.* **29**, 13–24 (1994).
207. Lareo, C., Sposito, A. F., Bossio, A. L. & Volpe, D. C. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme Microb. Technol.* **38**, 391–399 (2006).
208. Delhalle, L., Daube, G., Adolphe, Y., Crevecoeur, S. & Clinquart, A. Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Société Environ.* **16**, 369 (2012).
209. Mazaheri, D. & Shojaosadati, S. A. Mathematical models for microbial kinetics in solid-state fermentation: A review. *Iran. J. Biotechnol.* **11**, 156–167 (2013).
210. Okazaki, N., Sugama, S. & Tanaka, T. Mathematical model for surface culture of koji mold: Growth of koji mold on the surface of steamed rice grains (IX). *J. Ferment. Technol.* **58**, 471–476 (1980).
211. Wang, R. *et al.* Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. *Enzyme Microb. Technol.* **47**, 77–83 (2010).
212. Sun, X., Liu, Z., Qu, Y. & Li, X. The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **146**, 119–128 (2008).
213. Kontro, M., Lignell, U., Hirvonen, M.-R. & Nevalainen, A. pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. *Lett. Appl. Microbiol.* **41**, 32–38 (2005).
214. Salazar-Villanea, S. *et al.* Physical and chemical changes of rapeseed meal proteins during toasting and their effects on in vitro digestibility. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **7**, 62 (2016).
215. Esbelin, J., Mallea, S., Ram, A. F. & Carlin, F. Role of pigmentation in protecting *Aspergillus niger* conidiospores against pulsed light radiation. *Photochem. Photobiol.* **89**, 758–761 (2013).
216. Farinas, C. S., Vitcosque, G. L., Fonseca, R. F., Neto, V. B. & Couri, S. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. *Ind. Crops Prod.* **34**, 1186–1192 (2011).
217. Gombert, A. K., Pinto, A. L., Castilho, L. R. & Freire, D. M. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochem.* **35**, 85–90 (1999).
218. Augustine, A., Imelda, J., Paulraj, R. & David, N. S. Growth kinetic profiles of *Aspergillus niger* S14 a mangrove isolate and *Aspergillus oryzae* NCIM 1212 in solid state fermentation. *Indian J. Fish.* **62**, 100–106 (2015).
219. Favela-Torres, E., Cordova-Lopez, J., Garcia-Rivero, M. & Gutierrez-Rojas, M. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochem.* **33**, 103–107 (1998).
220. Hamidi-Esfahani, Z., Shojaosadati, S. A. & Rinzema, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **21**, 265–272 (2004).
221. Li, H. *et al.* Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. *Microb. Biotechnol.* **8**, 266–274 (2015).

222. Sforza, E., Bertucco, A., Morosinotto, T. & Giacometti, G. Vegetal oil from microalgae: species selection and optimization of growth parameters. *Chem. Eng. Trans.* **20**, 199–204 (2010).
223. Sparringa, R. A. & Owens, J. D. Causes of alkalization in tempe solid substrate fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 677–681 (1999).
224. Misra, A. K. *et al.* Optimization of solid state fermentation of mustard (*Brassica campestris*) straw for production of animal feed by white rot fungi (*Ganoderma lucidum*). *ASIAN Australas. J. Anim. Sci.* **20**, 208 (2007).
225. Xue, M., Liu, D., Zhang, H., Qi, H. & Lei, Z. A pilot process of solid state fermentation from sugar beet pulp for the production of microbial protein. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 203–205 (1992).
226. Lee, H. & Garlich, J. D. Effect of overcooked soybean meal on chicken performance and amino acid availability. *Poult. Sci.* **71**, 499–508 (1992).
227. Araba, M. & Dale, N. M. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing soybean meal. *Poult. Sci.* **69**, 76–83 (1990).
228. Pastuszewska, B. *et al.* The protein value of differently processed rapeseed solvent meal and cake assessed by in vitro methods and in tests with rats. *Anim. Feed Sci. Technol.* **106**, 175–188 (2003).
229. Meng, X. & Slominski, B. A. Nutritive values of corn, soybean meal, canola meal, and peas for broiler chickens as affected by a multicarbohydrase preparation of cell wall degrading enzymes. *Poult. Sci.* **84**, 1242–1251 (2005).
230. Manan, M. A. & Webb, C. Multi-enzymes Production Studies in Single Tray Solid State Fermentation with Opened and Closed System. *J. Life Sci.* **10**, 342–356 (2016).
231. Kruger, N. J. The Bradford method for protein quantitation. *Basic Protein Pept. Protoc.* 9–15 (1994).
232. Bisaria, V. S., Saxena, S. K., Manihar, R. B. & Gopalkrishnan, K. S. Solid state fermentation of plant residues for improved animal feed by *Pleurotus* sp. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **9**, 341–341 (1984).
233. Jin, M. *et al.* Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Exp. Biol. Med.* **228**, 749–758 (2003).
234. Kumar, S. *et al.* Immune response gene expression in spleens of diverse chicken lines fed dietary immunomodulators. *Poult. Sci.* **90**, 1009–1013 (2011).
235. Guo, Y., Ali, R. A. & Qureshi, M. A. The Influence of β -Glucan on Immune Responses in Broiler Chicks. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **25**, 461–472 (2003).
236. El Enshasy, H. A. & Hatti-Kaul, R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends Biotechnol.* **31**, 668–677 (2013).
237. Singh, R. S., Bhari, R., Rana, V. & Tiwary, A. K. Immunomodulatory and therapeutic potential of a mycelial lectin from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **165**, 624–638 (2011).
238. Mahapatra, S. & Banerjee, D. Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydr. Polym.* **97**, 627–634 (2013).
239. Takahashi, J. A. & Carvalho, S. A. Nutritional potential of biomass and metabolites from filamentous fungi. *Curr. Res. Technol. Educ. Top. Appl. Microbiol. Microb. Biotechnol.* 1126–1135 (2010).
240. Stites, D. P., Terr, A. I. & Parslow, T. C. *Basic & Clinical Immunology (8th edition)*. (1994).
241. Castro, R., Couso, N., Obach, A. & Lamas, J. Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish Shellfish Immunol.* **9**, 529–541 (1999).
242. Gifford, R. H. & Malawista, S. E. The nitroblue tetrazolium reaction in human granulocytes adherent to a surface. *Yale J. Biol. Med.* **45**, 119–132 (1972).

243. Couso, N., Castro, R., Noya, M., Obach, A. & Lamas, J. Location of superoxide production sites in turbot neutrophils and gilthead seabream acidophilic granulocytes during phagocytosis of glucan particles. *Dev. Comp. Immunol.* **25**, 607–618 (2001).
244. Paul, I. *et al.* Orally administered β -glucan of edible mushroom (*Pleurotus florida*) origin upregulates innate immune response in broiler. *Indian J Anim Sci* **82**, 745–748 (2012).
245. Nerren, J. R. & Kogut, M. H. The selective Dectin-1 agonist, curdlan, induces an oxidative burst response in chicken heterophils and peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **127**, 162–166 (2009).
246. Hofstaetter, T. & Brammsen, H. A microassay for nitroblue tetrazolium reduction by human neutrophils. *Immunobiology* **159**, 283–292 (1981).
247. Pietretti, D., Vera-Jimenez, N. I., Hoole, D. & Wiegertjes, G. F. Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard® and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. *Fish Shellfish Immunol.* **35**, 847–857 (2013).
248. Soltanian, S. *et al.* Enhanced disease resistance in *Artemia* by application of commercial β -glucans sources and chitin in a gnotobiotic *Artemia* challenge test. *Fish Shellfish Immunol.* **23**, 1304–1314 (2007).
249. Stier, H., Ebbeskotte, V. & Gruenwald, J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutr. J.* **13**, 38 (2014).
250. Wang, X., Zhang, Y., Zhang, L. & Ding, Y. Multiple conformation transitions of triple helical lentinan in DMSO/water by microcalorimetry. *J. Phys. Chem. B* **113**, 9915–9923 (2009).
251. Danielson, M. E. *et al.* Enzymatic method to measure β -1, 3- β -1, 6-glucan content in extracts and formulated products (GEM assay). *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10305–10308 (2010).
252. Lee, Y.-T. & Kim, Y.-S. Water-solubility of β -Glucans in Various Edible Mushrooms-Research Note. *Prev. Nutr. Food Sci.* **10**, 294–297 (2005).
253. Israilides, C. *et al.* In vitro cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. *Phytomedicine* **15**, 512–519 (2008).
254. Wu, S.-J., Lu, T.-M., Lai, M.-N. & Ng, L.-T. Immunomodulatory activities of medicinal mushroom *Grifola frondosa* extract and its bioactive constituent. *Am. J. Chin. Med.* **41**, 131–144 (2013).
255. Ca, D. The biological properties of interleukin-1. *Eur. Cytokine Netw.* **5**, 517–531 (1994).
256. Chan, W. K., Law, H. K. W., Lin, Z.-B., Lau, Y. L. & Chan, G. C.-F. Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. *Int. Immunol.* **19**, 891–899 (2007).
257. Guey, B., Bodnar, M., Manie, S. N., Tardivel, A. & Petrilli, V. Caspase-1 autoproteolysis is differentially required for NLRP1b and NLRP3 inflammasome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 17254–17259 (2014).
258. Lew, W., Oppenheim, J. J. & Matsushima, K. Analysis of the suppression of IL-1 alpha and IL-1 beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. *J. Immunol.* **140**, 1895–1902 (1988).
259. Sonck, E., Stuyven, E., Goddeeris, B. & Cox, E. The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **135**, 199–207 (2010).
260. Engstad, C. S., Engstad, R. E., Olsen, J.-O. & Osterud, B. The effect of soluble β -1, 3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 1585–1597 (2002).
261. Poutsika, D. D., Mengozzi, M., Vannier, E., Sinha, B. & Dinarello, C. A. Cross-linking of the beta-glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. *Blood* **82**, 3695–3700 (1993).

262. Luhm, J. *et al.* β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κ B, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1 β /IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunol.* **7**, 5 (2006).
263. Abel, G. & Czop, J. K. Stimulation of human monocyte β -glucan receptors by glucan particles induces production of TNF- α and IL-1 β . *Int. J. Immunopharmacol.* **14**, 1363–1373 (1992).
264. Han, X.-Q. *et al.* Structure elucidation and immunomodulatory activity of a beta glucan from the fruiting bodies of *Ganoderma sinense*. *PloS One* **9**, e100380 (2014).
265. Smeeckens, S. P. *et al.* An anti-inflammatory property of *Candida albicans* β -glucan: Induction of high levels of interleukin-1 receptor antagonist via a Dectin-1/CR3 independent mechanism. *Cytokine* **71**, 215 (2015).
266. Jang, S.-A., Kang, S.-C. & Sohn, E.-H. Phagocytic Effects of β -Glucans from the Mushroom *Coriolus versicolor* are Related to Dectin-1, NOS, TNF- α Signaling in Macrophages. *Biomol. Ther.* **19**, 438–444 (2011).
267. Hoffman, O. A., Olson, E. J. & Limper, A. H. Fungal β -glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor- α in response to bacterial lipopolysaccharide. *Immunol. Lett.* **37**, 19–25 (1993).
268. Zhuang, J. C. & Wogan, G. N. Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produce nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 11875–11880 (1997).
269. Luther, K., Torosantucci, A., Brakhage, A. A., Heesemann, J. & Ebel, F. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by murine macrophages involves recognition by the dectin-1 β -glucan receptor and Toll-like receptor 2. *Cell. Microbiol.* **9**, 368–381 (2007).
270. Ji, Z. *et al.* Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *J. Ethnopharmacol.* **112**, 445–450 (2007).
271. Lin, Z.-B. Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *J. Pharmacol. Sci.* **99**, 144–153 (2005).
272. Hsu, H.-Y. *et al.* Extract of Reishi polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways. *J. Immunol.* **173**, 5989–5999 (2004).
273. Suzuki, I. *et al.* Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **12**, 675–684 (1990).
274. Chanput, W. *et al.* β -Glucans are involved in immune-modulation of THP-1 macrophages. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 822–833 (2012).
275. Taofiq, O., Martins, A., Barreiro, M. F. & Ferreira, I. C. Anti-inflammatory potential of mushroom extracts and isolated metabolites. *Trends Food Sci. Technol.* **50**, 193–210 (2016).
276. Municio, C. *et al.* The response of human macrophages to β -glucans depends on the inflammatory milieu. *PloS One* **8**, e62016 (2013).
277. Sanchez, C. Bioactives from Mushroom and Their Application. in *Food Bioactives* (ed. Puri, M.) 23–57 (Springer, 2017).
278. Pandey, A. Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**, 81–84 (2003).
279. Hamad, H. O., Alma, M. H., Ismael, H. M. & Gocerı, A. The Effect of Some Sugars on the Growth of *Aspergillus niger*. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilim. Derg.* **17**, 7–11 (2014).
280. Krishna, C. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* **25**, 1–30 (2005).
281. Ajdari, Z. *et al.* Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on solid state cultivation. *BioMed Res. Int.* **2011**, (2011).
282. Kumeda, Y. & Asao, T. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section Flavi. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 2947–2952 (1996).

283. Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R. & Pandey, A. Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* **66**, 621–626 (2007).
284. Duru, C. C. & Uma, N. U. Protein enrichment of solid waste from cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) cormel processing using *Aspergillus oryzae* obtained from cormel flour. *Afr. J. Biotechnol.* **2**, 228–232 (2003).
285. Zambare, V. Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. *Int. J. Life Sci.* **4**, 16–25 (2010).
286. Curvetto, N., Figlas, D., Gonzalez Matute, R. & Delmastro, S. Shiitake Bag Cultivation on sunflower seed hulls. in *Mushroom Growers' Handbook 2: Shiitake Cultivation* 100–104 (MushWorld, 2005).
287. Hoa, H. T. & Wang, C.-L. The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology* **43**, 14–23 (2015).
288. Dhananjay, S. K. & Mulimani, V. H. Purification of α -galactosidase and invertase by three-phase partitioning from crude extract of *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1565–1569 (2008).
289. Miloski, K., Wallace, K., Fenger, A., Schneider, E. & Bendinskas, K. Comparison of biochemical and chemical digestion and detection methods for carbohydrates. *Am. J. Undergrad. Res.* **7**, 48–52 (2008).
290. Freitas, F., Alves, V. D. & Reis, M. A. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **29**, 388–398 (2011).
291. Thevenieau, F., Bourdillon, A., Durand, A., De Coninck, J. & Sutter, S. Food Product and Method for Producing Same. WO2015101650 (A2). (2015).
292. Sutter, S., Thevenieau, F., Bourdillon, A. & De Coninck, J. Immunomodulatory Properties of Filamentous Fungi Cultivated through Solid-State Fermentation on Rapeseed Meal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **182**, 910–924 (2017).
293. Heerd, D., Yegin, S., Tari, C. & Fernandez-Lahore, M. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus* spp. in solid-state fermentation: A comparative study. *Food Bioprod. Process.* **90**, 102–110 (2012).
294. Kimura, I., Sasahara, H. & Tajima, S. Purification and characterization of two xylanases and an arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae*. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 334–339 (1995).
295. Kimura, I. & Tajima, S. Subsite affinities of β -glucosidase from *Aspergillus sojae* on various xylooligosaccharides. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 572–575 (1999).
296. Delaunay, S., Rondags, E. & Germain, P. Production d'antibiotiques par biotechnologies. *Tech. Ing. Bioprocédés* (2003).
297. AFSSA. *Propositions pour une démarche d'évaluation de substances ou de produits « nouveaux » destinés à l'alimentation animale. Cas particulier des substances et produits à base de plantes.* (2007).

ANNEXES

Annexe 1. Composition des milieux de cultures gélosés

Milieu gélosé	Composition	pH
PDA (Potato Dextrose Agar)	Fécule de pomme de terre : 4 g/L Glucose : 20 g/L Agar : 20 g/L	5,6
PDYA (Potato Dextrose Yeast Agar)	PDA + extrait de levure : 2 g/L	5,6
YMA (Yeast Malt Agar)	Extrait de levure : 4 g/L Extrait de malt : 10 g/L Glucose : 4 g/L Agar : 20 g/L	7,3
MEA (Malt Extract Agar)	Extrait de malt : 30 g/L bactopeptone ou bactotryptone : 5 g/L Agar : 20 g/L	5,4

Annexe 2. Détermination de l'activité antimicrobienne

Mode opératoire

- *Technique et souches cibles utilisées*

La méthode employée est celle de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé suivant les recommandations 2010 du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie). Deux souches bactériennes pathogènes du poulet, à savoir *Escherichia coli* et *Enterococcus cecorum*, fournies par le laboratoire Labofarm sont testées. *E. coli* est cultivée sur gélose Luria Broth (LB) tandis qu'*E. cecorum* est cultivée en jarre anaérobie sous atmosphère CO₂ sur gélose Columbia au sang de mouton (5%). A partir des cultures pures, une suspension est réalisée dans de l'eau physiologique et ajustée à une densité optique équivalente au standard Mc Farland (McF) de 0,5. Une dilution supplémentaire au dixième est nécessaire pour la souche *E. coli*. Pour obtenir un tapis homogène, la surface de la gélose est ensemencée en stries serrées suivant trois orientations décalées de 60°. Des disques de cellulose de 6 mm de diamètre sont imbibés de différents extraits et déposés sur la surface de la gélose. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24h d'incubation à 37°C.

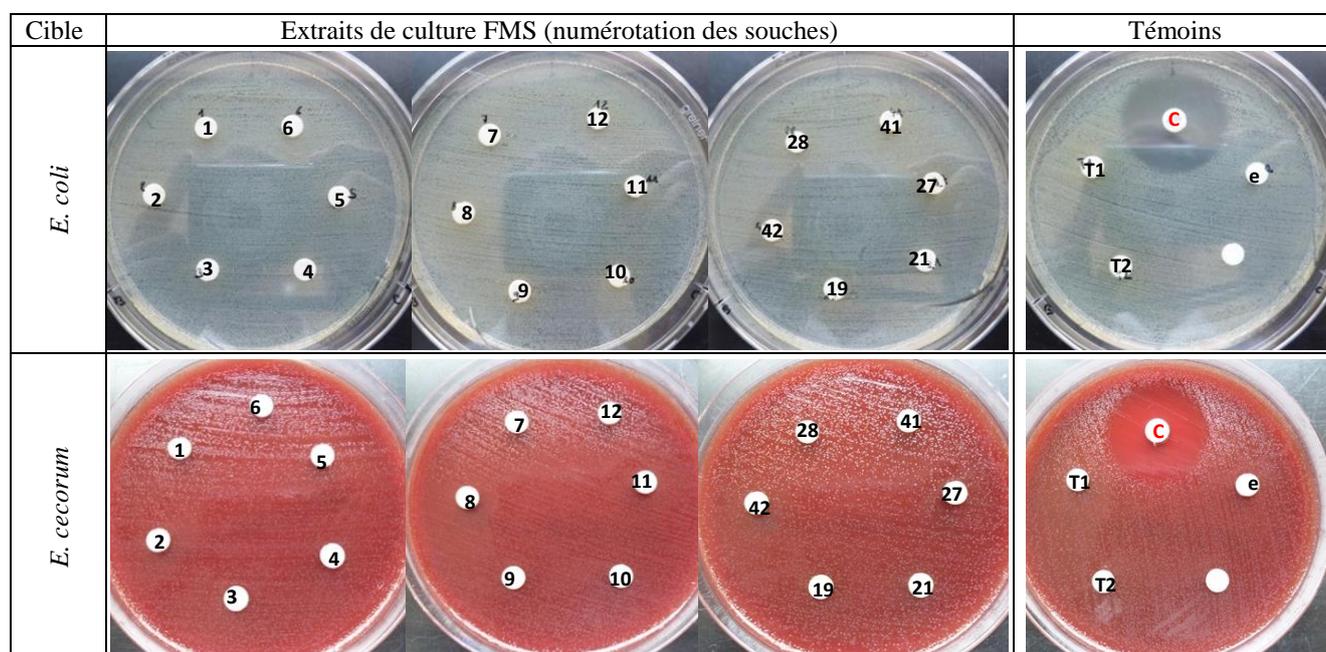
- *Préparation des extraits de culture FMS et des témoins*

Les échantillons de culture sur tourteau de colza sont décongelés, broyés à l'Ultra-turrax 30 secondes à 9500 rpm en présence d'eau puis centrifugés pendant 10 min à 3500 rpm. Le surnageant est prélevé et filtré sur 0.5 puis 0.22 µm pour supprimer toute trace de biomasse (spores et fragments mycéliens). Chaque disque stérile est chargé avec 25 µL d'extrait de culture. En plus des échantillons issus des cultures FMS des quatorze souches de champignons inférieurs prélevées à J3 et des quatre champignons supérieurs prélevés à J5, cinq témoins sont testés. Il s'agit d'extraits provenant de deux lots de tourteau préalablement stérilisés (lot 1 et lot 2), d'eau stérile, d'un antibiotique témoin (chloramphénicol à 30 µg) et d'un disque non chargé. Trois répétitions sont effectuées par échantillon.

Résultats

Aucune activité antimicrobienne n'est constatée contre *E. coli* et *E. cecorum* avec les extraits de culture FMS et les témoins négatifs (disque seul, tourteau lot 1 et 2, et eau stérile). Le témoin positif avec le chloramphénicol permet d'obtenir un diamètre d'inhibition respectif de 28 et 26 mm de diamètre. Uniquement deux souches bactériennes pathogènes du poulet ont été testées dans cette étude, celles-ci peuvent être insensibles aux molécules présentes dans les extraits de culture ce qui peut expliquer les réponses négatives obtenues. Les extraits utilisés ne sont peut-être pas suffisamment concentrés en molécules bioactives par rapport au chloramphénicol. Une méthode d'extraction à l'aide de solvants pourrait être appliquée afin de concentrer davantage les extraits. Par ailleurs, l'activité

antimicrobienne a été testée sur des extraits de culture prélevés à des temps définis correspondants à la phase de ralentissement et au début de la phase stationnaire. Ce laps de temps n'est peut-être pas suffisant pour libérer des molécules bioactives et à des quantités pouvant être détectées par l'antibiogramme ²⁹⁶. Une étude plus fine en cinétique et dans des conditions optimisées devrait être entreprise, à condition toutefois d'avoir bien identifié les bactéries sensibles et ce, pour chaque champignon testé. Compte tenu de l'absence d'informations sur les molécules bioactives potentiellement présentes dans les extraits et une perspective de mise au point laborieuse il été décidé de ne pas poursuivre les recherches. L'aspect réglementaire tient également compte de cette décision puisque le produit fermenté constitue une matière première pour l'alimentation animale qui peut contenir des molécules à activité antimicrobienne. Or, les additifs à base d'antibiotiques sont interdits en alimentation animale depuis 2006 dans l'Union Européenne et concernant les matières premières, la présence de molécules à activité antimicrobienne n'est pas précisément abordée dans les textes. L'effet particulier revendiqué pour une matière première fonctionnelle (par exemple la résistance vis-à-vis de processus infectieux) peut éventuellement faire l'objet d'une validation sur le fondement d'une démonstration scientifiquement étayée d'après une proposition de l'AFSSA. L'identification d'un antibiotique référencé pourrait dans ce cas conduire à une interdiction puisqu'il s'agit d'une substance indésirable ^{57,100,297}. La réglementation concernant ces nouveaux types d'aliments reste confuse.



Témoins : C = Chloramphénicol ; T1 = tourteau lot 1 ; T2 = tourteau lot 2 ; e = eau stérile.



Immunomodulatory Properties of Filamentous Fungi Cultivated through Solid-State Fermentation on Rapeseed Meal

Stéphanie Sutter^{1,2} · France Thevenieau³ ·
Anne Bourdillon³ · Joëlle De Coninck^{1,2}

Received: 3 October 2016 / Accepted: 12 December 2016 /
Published online: 16 December 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Water extracts from solid-state fermentation (SSF) on rapeseed meal using filamentous fungi exhibit interesting immunomodulatory activities *in vitro*. Immunomodulation was determined by the capacity of the compounds to activate blood neutrophils and to influence cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM). Among the strains tested, *Aspergillus sojae* mycelium and SSF extracts were the most promising in terms of enhancing the immune response. The filamentous fungus was also successfully cultivated in a pre-pilot bioreactor with forced aeration. The results indicated that the extracts not only activated blood neutrophils but also significantly modulated IL-1 β cytokine levels with lipopolysaccharide (LPS)-stimulated PBMC and BMDM without any cytotoxicity in immune cells. IL-1 β was down-regulated in a dose-dependent manner in the presence of *A. sojae* crude mycelium and SSF extract with PBMC, which indicated that there was an anti-inflammatory activity, whereas IL-1 β secretion was up-regulated in the presence of stimulated BMDM with the highest concentration that was tested (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The non-fermented rapeseed had no effect at the same concentration. SSF culture, as a natural product, may be a good source for the development of functional feed with an immunostimulating effect or could potentially be used in medicinal applications.

Keywords Solid-state fermentation · Rapeseed meal · Filamentous fungi · β -glucan · Immunomodulation · Immune cells

✉ Stéphanie Sutter
stephanie.sutter@welience.com

¹ Welience, Plateforme de Prédéveloppement en Biotechnologies, site INRA, 17 rue de Sully, 21000 Dijon, France

² University Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

³ Groupe Avril-Direction Innovation, 11 Rue de Monceau, 75378 Paris, Cedex 08, France

Introduction

World rapeseed meal production is currently more than 25 million tons a year and ranks second after soybean meal in global meal production. Rapeseed meal from the plant *Brassica napus* is the main by-product of European biodiesel production [1]. However, the incorporation rate of these by-products into animal feed is limited; thus, there is a real need to provide agri-products that are reusable for animal feed but have improved nutritional properties [2, 3]. In particular, oilcakes have been widely used in biotechnology for the industrial production of various enzymes, antibiotics, bio-pesticides, vitamins, and other biochemical compounds. Some of these products, mostly enzymes, are also commonly used as animal feed additives. The carbohydrate and mineral content as well as the physical structure of the cakes makes them good sources of nutrients and/or solid supports for the development of microorganisms. However, these nutrients are not easily assimilated by the majority of bacteria and industrial yeasts. Therefore, microbial growth is more efficient with mold than bacteria because its morphology and physiology enable it to colonize this type of substrate more easily [4]. Strains of the genera *Aspergillus* and *Rhizopus* are the most studied strains in the literature for food and feed production through solid-state fermentation (SSF). SSF has attracted more attention from researchers compared to other fermentation techniques because there are abundant waste materials for making it cost-effective and easy to manage [5, 6]. This process has been around since ancient times and various fungi have been cultivated in SSF for food production. Typical examples include the fermentation of rice with *Aspergillus oryzae* to initiate the koji process and *Penicillium roquefortii* for cheese production [7]. Solid-state fermentation is characterized by microbial growth on moist solid particles in the absence of free water [8].

Microbial conversion of oilcakes by SSF seems to be a practical and a promising alternative for an increasing nutritional value and transforming them into a value-added product [9–11]. However, because vegetable protein sources are abundant in the market at competitive prices, microbial feed and food products need to offer additional benefits [12]. For centuries, mushrooms have been abundant sources of bioactive compounds for the treatment of various diseases. Several major substances with immunomodulatory and/or antitumor activity have been isolated from edible mushrooms, such as *Ganoderma lucidum* and *Lentinus edodes*. These substances are mainly polysaccharides, in particular β -glucans, and they have not been studied yet in filamentous fungi. Immunomodulatory activity has been demonstrated for crude fungal extracts and isolated compounds such as polysaccharides. This activity has been studied in vivo and in vitro to characterize the major immunomodulatory effects of β -glucans, including mitogenicity and activation of the great variety of immune cells that produce cytokines. The levels of interleukin IL-1 β are affected in both mouse and human immune cells by β -glucan treatment [13–15]. These bioactive compounds induce both innate and adaptive immune responses and can bind directly to specific receptors of immune cells. The immune cells include monocytes, macrophages, and neutrophils in particular [16, 17].

Recently, there has been growing interest in natural immunomodulators, and their applications in animal feed are increasing due to the total ban of antibiotic growth promoters in the European Union. However, most known fungal bioactive compounds were obtained primarily from higher basidiomycete fruiting bodies after a long cultivation time or from submerged fermentation using synthetic media [18]. Very few studies have examined the possibility of producing bioactive compounds such as glycoproteins [19], β -glucan [17], and exopolysaccharide [20] by non-basidiomycetes filamentous fungi, which are widely used in the production of several compounds that are used as food additives [21]. Thus, currently, there

is little information in published studies concerning polysaccharide production by SSF using low-cost plant residues such as rapeseed meal [22]. There are a few reports about higher medicinal fungi such as *F. velutipes*, *H. erinaceum*, and *G. frondosa* cultivated on agro-industrial residues for mycelium and polysaccharides production. These studies have particularly shown that the extracts exhibit strong in vitro immunomodulatory activity in macrophages and peripheral blood mononuclear cells [23–25]. To date, the immunomodulatory properties of fermented rapeseed meal with filamentous fungi have not been studied despite the possibility of bioconversion of these residues into a value-added feed that can improve animal health and growth. However, many researchers have evaluated the yield of chitosan and a chitosan–glucan complex for several filamentous fungi (*Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*) and concluded that SSF is the best method for the production of these polysaccharides under optimized conditions [26]. To reduce the costs of fermentation, pullulan production was also investigated using low-cost industrial waste (cassava bagasse) in SSF by *Aureobasidium pullulans* [27]. Only a few researchers have reported biological activity in immune cells from SSF cultured rice bran with *Aspergillus* and *Monascus* strains and from SSF soybean curd residue with *Morchella esculenta* [28, 29].

The aim of this study was first to evaluate and compare the β -glucan content of four species of filamentous fungi from the genera *Aspergillus* and *Rhizopus* cultivated in a semi-synthetic liquid medium and in the natural solid medium composed of rapeseed meal. Culture samples collected from the SSF process were then used to evaluate their in vitro immunomodulatory properties in several immune cell models, including human blood neutrophils, human peripheral blood mononuclear cells, and macrophages derived from mouse bone marrow. The most promising strain was then investigated for an SSF scale-up study in a pre-pilot packed-bed bioreactor with forced aeration.

Materials and Methods

Microorganisms and Spore Production

Four strains of filamentous fungi were used in the present study: *A. sojae* CBS 100934, *A. oryzae* UMIP 1042.72, *Rhizopus oryzae* CBS 131512, and *Rhizopus oligosporus* CBS 338.62. The cultures were grown on potato dextrose (PDA) agar slants and maintained in a frozen bank in the form of a spore suspension in glycerol at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inoculum for the experiments in the form of a spore suspension was obtained from precultures in Roux flasks containing PDA agar. The flasks were incubated for 4 days at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. A suspension of approximately 10^{10} spores/mL (depending on the strain) was achieved by gently scraping the agar surface.

Solid-State Fermentation in Erlenmeyer Flasks

The experiments were conducted in 250-mL Erlenmeyer flasks stopped with cotton plugs. The rapeseed meal was sterilized at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min, cooled, and inoculated with spore suspension adjusted to 1×10^7 spores/g dry matter. The percentage of dry matter was adjusted between 40 and 50% with sterile water containing the spores. Four flasks per strain were used to perform kinetic measurements requiring sacrifice of the whole culture (1 sample per day). The strains were incubated at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ under static conditions.

Solid-State Fermentation in a Pre-Pilot Bioreactor (Scale-Up Study)

The general design feature of the packed-bed bioreactor involves the introduction of air through a grid that supports the substrate. The cylindrical reactor has a capacity of 50 L and can be sterilized in situ by steam injection. Cultures can be monitored by regulating the temperature, relative humidity, and flow rate of the air passing through the substrate layer. This type of pre-pilot reactor developed on our platform is an interesting tool for analyzing the global process evolution under forced aeration and determining the environmental parameters for temperature and moisture regulation [30]. The rapeseed meal was first autoclaved (1 h at 121 °C) and then poured into the reactor and inoculated with a spore suspension with an inoculation rate of 1×10^7 spores/g dry matter, and the percentage of the final dry matter was adjusted between 40 and 50%. The initial parameters were as follows: temperature 28 °C, humidity 95% of inlet air, and air flow (outlet) between 7 and 12 m/s. At regular time intervals, temperature measurements were made in the outlet air stream and at different points within the culture. Culture samples were also taken for moisture analysis and the determination of immunomodulatory activity.

Submerged Fermentation for Mycelium Production

Cultures were performed in 250-mL flasks containing 200 mL of potato dextrose broth medium (PDB) supplemented with a yeast extract (2 g/L) at 25 °C in the dark on a rotary shaker at 120 rpm. The flasks were inoculated with a spore suspension from a PDA agar slant. The mycelium was collected by centrifugation (10 min at 1250 g) after three rinsing cycles with sterile water. Samples were then oven dried for 24 h at 105 °C and ground into a fine powder (<0.5 mm).

Estimation of Fungal Growth and β -Glucan Content

Biomass in a solid-state fermentation can be indirectly estimated by measurements of CO₂ evolution and dry matter weight loss. The gas inlet to the Erlenmeyer flasks was analyzed twice a day using an O₂/CO₂ gas analyzer, canal 120 (Vigaz). The entire contents of a flask were homogenized and recovered to determine the percentage of dry matter loss, which was correlated with microorganism respiration. The moisture content of the culture was combined with gravimetric measurements to determine the dry matter weight loss. Dry matter content was determined in each sample through the oven-drying method at 105 °C [31]. All samples were taken at a constant weight. The moisture content was then expressed as the percentage of the dry weight of the sample. The product, once dried, was ground into a fine powder (<0.5 mm) and stored at room temperature pending determination tests of the immunomodulatory activity.

Quantification of β -glucan based on the enzymatic release of glucose was performed using the Mushroom and Yeast β -glucan assay procedure (Megazyme). All values of glucan content of the control, dried culture, or mycelium sample were expressed as g/100 g (%) of a dry weight of sample.

NBT Reduction Assay

The NBT reduction assay (Nitro Blue Tetrazolium Reduction kit, Sigma) was performed on human blood stimulated with culture extracted from the SSF process. The method was adapted from its initial purpose, which was the detection of intrinsic defects in neutrophil function with

the bacterial extract provided in the kit. In the presence of a stimulating agent (bacteria, toxins, latex particles and glass, membrane protein of yeast, etc.), the white blood cells become activated and showed intracytoplasmic deposits of formazan. Microscopic examination was performed to determine the percentage of activated cells. To obtain stimulation of neutrophils, the extract must be concentrated as much as the bacterial extract provided in the kit. Using this approach, a concentrated culture water extract (250 mg/mL) was incorporated in heparinized blood in stimulated NBT test conditions. The water extract from dried cultures was obtained using a high speed mixer (Ultra-Turrax).

Isolation and Culture of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Blood mononuclear cells from healthy donors were separated from a human buffy coat pocket (supplied by the French Blood Establishment) by Ficoll density centrifugation of 1077 g/mL. The cells were washed three times with PBS (phosphate buffered saline) by centrifugation at 4 °C. After counting viable cells, 1×10^5 cells were added to 96-well, round-bottom microtiter plates in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medium + 10% fetal calf serum (FCS) + 1% glutamine + 1% PSA (penicillin + streptomycin + amphotericin B). Two anti-inflammatory internal references were tested: ZVAD (caspase inhibitor and inhibitor inflammasome NLRP3) at a concentration of 5 μ M and PRED (Prednisolone, steroid) at a concentration of 100 μ M. LPS (lipopolysaccharide from *Escherichia coli*) was used at a concentration of 10 ng/mL. The cell supernatants were recovered the next day and frozen at -20 °C before IL-1 β determination. The cell viability XTT test was conducted on the cell monolayer after 24 h. The cells were treated with soluble culture extracts or internal references after cell seeding and LPS stimulation. The soluble fraction of the SSF products and mycelium was tested at four concentrations: 1, 0.5, 0.25, and 0.125 mg/mL.

Differentiation and Culture of Mouse Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM)

Mouse bone marrow cells were isolated and collected from healthy mice before 5 days of cultivation for differentiation into macrophages in the presence of 50 ng/mL stimulating factor mMCSF [32]. After seeding BMDM in a 96-well plate, the cells were treated overnight with fermentation products or the anti-inflammatory internal references ZVAD at a concentration of 5 μ M and PRED at a concentration of 70 μ M. BMDM stimulation with LPS was performed 24 h after treatment. After overnight stimulation, cell supernatants were collected and frozen at -20 °C. Water extract with soluble and insoluble particles of the SSF products was tested at three concentrations (1, 10, and 100 μ g/mL). LPS was used at a concentration of 1 μ g/mL. The cell viability XTT test was conducted on the cell monolayer.

Cytotoxicity

The XTT test was used for the quantification of cells and their viability. The biochemical procedure of this test is based on the activity of mitochondrial enzymes, which are only active in living cells. Metabolically active cells are able to reduce the tetrazolium salt XTT-(sodium 3'[1-phenyl-aminocarbonyl]-3,4-tetrazoliumbis[4-methoxy-6-nitro] benzene sulfonic acid hydrate) labeling reagent to an orange colored soluble formazan dye [33]. The equipment used for this measurement was 200 M@ Infinity Pro (Tecan). The amount of compound formed was analyzed

spectrophotometrically at 490 nm (reference wavelength 660 nm) using a microtiter plate reader. The intensity of the dye is directly proportional to the number of metabolically active cells. The percentage of cell viability was determined with respect to the corresponding control (culture medium), which was considered to have 100% cell viability, and expressed as the mean \pm standard deviation.

IL-1 β Determination

Cytokines released into supernatants from PBMC or BMDM stimulated with inflammasome activators were quantified using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (eBioscience ELISA kit). The wells of a 96-well plate were coated with a capture antibody. After the addition of a cell culture supernatant, the antigen (IL-1 β) was bound to the capture antibody. A detection antibody was added and bonded to the antigen. A secondary antibody bound to an avidin-HRP enzyme was added and bonded with the detection antibody. The substrate was added and was converted by the enzyme into a quantifiable form by measuring the absorbance at 450 nm. Measurements were made using 200 M[®] Infinity Pro (Tecan) equipment. LPS at a non-cytotoxic concentration induced the production of IL-1 β by both immune cells.

Results and Discussion

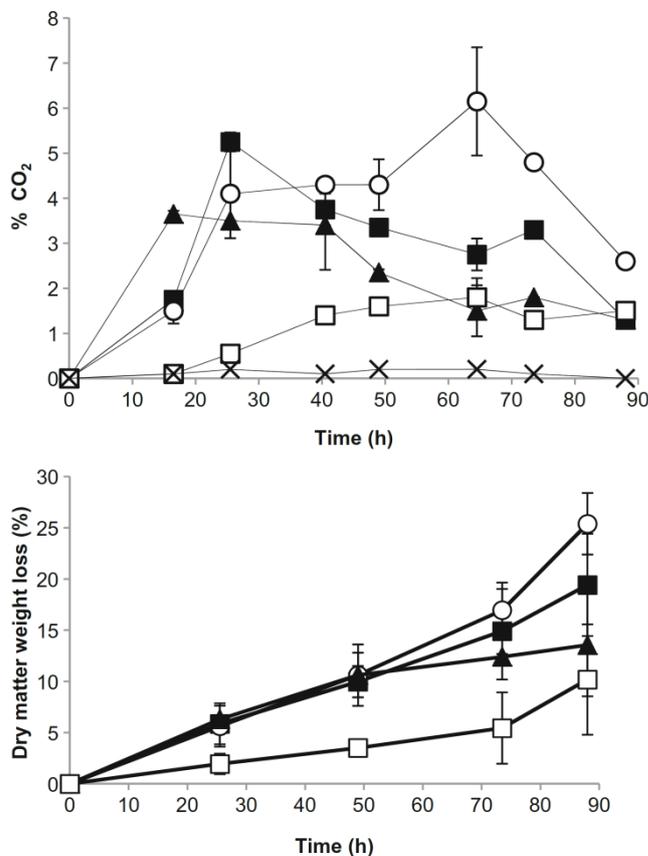
Solid-State Fermentation in Erlenmeyer Flasks

A possible approach to estimating fungal growth in SSF is by measuring respiratory gases. Oxygen consumption and carbon dioxide release result from respiration. These metabolic activities are therefore growth associated and can be used for estimating biomass synthesis [34]. The percentage of CO₂ increased after inoculation for all strains studied (Fig. 1). The spores germinated and the mycelium developed inside the flasks (macroscopic observation). Of the four strains, the two strains belonging to the genus *Aspergillus* produced the largest amount of CO₂. The absence of CO₂ production for the non-inoculated control rapeseed meal confirmed the absence of contaminants. In the presence of microorganisms, the rapeseed meal was converted into biomass and carbon dioxide, which led to the loss of dry matter weight [35–37]. As shown in Fig. 1, the weight loss was greater in the culture with *A. sojae* and *A. oryzae* than the two strains of *Rhizopus*. This loss reflected a metabolism that was better adapted to the culture medium including the synthesis of enzymes to further degrade the substrate to maintain growth after a decline in the available nutrients. Farinas et al. [38] found a close correlation between CO₂ evolution during SSF and enzyme production with an *A. niger* species. Dry matter weight loss varied between 10 and 25% depending on the strains after 88 h of SSF when growth was over. Studies using oil cakes for the production of industrial enzymes, antibiotics, and mushrooms have shown promising results. Biotechnological applications of oil cakes also include their uses for vitamin and antioxidant production. Studies have already shown that fermented meal can be used as an efficient feed source [3].

β -Glucan Content in Solid-State and Submerged Fermentation

The β -glucan content of dry mycelia exhibited a noticeable variability with levels ranging from 2.52 to 20.71% (Table 1), which was consistent with the levels found in the previous studies that

Fig. 1 CO₂ production (respirometric profile) and substrate dry matter weight loss of the different filamentous fungi, including *Aspergillus oryzae* (■), *Aspergillus sojae* (○), *Rhizopus oryzae* (▲), and *Rhizopus oligosporus* (□) grown on rapeseed meal at 25 °C. Control flasks contained rapeseed meal incubated with sterile water but not inoculated (x). There was no dry matter weight loss for the control flask



also used the megazyme β -glucan assay kit with various edible mushrooms (4.71–46.20%) and filamentous fungi (0.9–23.8%) [12, 39]. The highest values were obtained for the strains *A. oryzae* and *A. sojae* (18.41 and 20.71%, respectively). A value of 3.98% was found in the rapeseed meal alone due to the presence of cellulose (1,4- β -D-glucan), which interferes with the method. The β -glucan levels were not detectable in the SSF culture because the biomass concentration was lower compared to mycelium alone. In fact, SSF fungal biomass was diluted

Table 1 Type of culture, age of culture, content of β -glucan in controls, in mycelia (liquid culture), and SSF culture

Filamentous fungi	Culture in liquid media		SSF on rapeseed meal	
	Age of culture (days)	β -glucan content (%)	Age of culture (days)	β -glucan content (%)
<i>Aspergillus oryzae</i>	2	18.41	3	3.4
<i>Aspergillus sojae</i>	2	20.71	3	3.46
<i>Rhizopus oryzae</i>	2	6.99	3	2.37
<i>Rhizopus oligosporus</i>	20	2.52	3	4.56
Control	β -glucan content (%)			
Yeast β -glucan (control kit)	52.01			
Rapeseed meal	3.98			

in the solid substrate. Recovery of fungal biomass from the substrate was impossible in solid-state fermentation because the fungal hyphae penetrated into and tightly bound the solid substrate particles. No data were available for β -glucan production and optimization through solid-state fermentation, but other studies have been done on the production of bioactive compounds such as phenolic compounds and antibiotics. SSF shows a great potential for the application in the production of biologically active compounds from natural sources [40].

Immunomodulatory Activity

Phagocytosis is one widely used method for screening the immune response. The process of phagocytosis, which occurs in neutrophils in blood and macrophages in tissues, consists of sequential stages, such as motility, adhesion to particles, ingestion, degranulation, and intracellular killing of microorganisms [41]. β -Glucan-specific receptors are present on phagocytic cell membranes of several immune cells including neutrophils. The activation of human blood neutrophils was estimated by a nitro blue tetrazolium (NBT) reduction assay. The stimulatory effects of β -glucan have been demonstrated with the NBT test in vitro with several extracts from yeasts and fungi [42, 43]. The choice of SSF culture (Erlenmeyer flask) age for the immune response was the third day because the microorganisms have not yet begun to sporulate but they produce the maximum amount of biomass following CO_2 peaks. Figure 2 shows that only cultures with *A. oryzae* and *A. sojae* have an immunostimulatory potential for activating blood neutrophils. The neutrophil activity was more enhanced with the bacterial extract, which served as the positive control in our experiment. The response obtained with the SSF culture extract of the two strains of *Rhizopus* was equivalent to the rapeseed meal alone and the unstimulated blood, which had positive cells in a normal range according to the assay kit. The immune response measured by the NBT test was correlated with the amount of β -glucan in the mycelium biomass of the filamentous fungi. Castro et al. [42] found that differences in activity depended mainly on the concentration of glucan. In our study, a concentrated water extract of SSF culture was used because the amount of β -glucan was undetectable using the Megazyme β -glucan assay kit, which likely meant that the concentration was very low. Data suggest that fungal β -glucans are variously effective at different doses because of their solubility, molecular

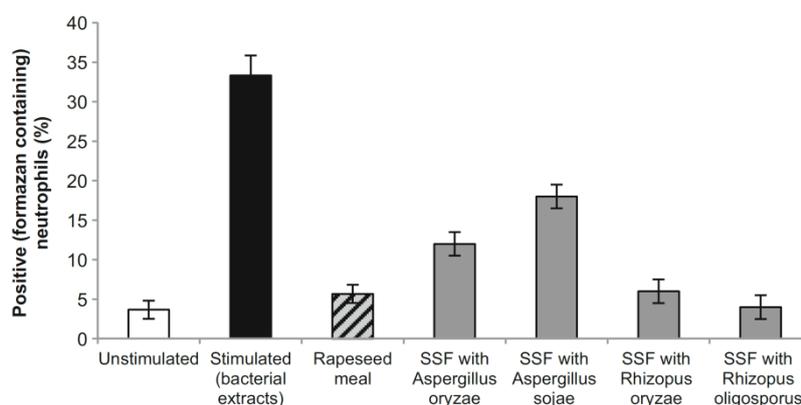


Fig. 2 Percentage of activated neutrophils in blood alone (unstimulated), blood with the bacterial extract (stimulated, control kit), blood with rapeseed meal alone, and blood with a 3-day-old SSF culture of rapeseed meal with *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Rhizopus oryzae*, and *Rhizopus oligosporus*

structure, size, branching frequency, and specific binding affinity to each receptor. The mechanism of action has yet to be fully understood for inducing immunomodulatory activities [44]. Furthermore, in our study, water extracts were used that could contain other bioactive substances, including polysaccharides, polysaccharopeptide, proteins, triterpenes, lipids, and phenols. These other types of compounds have been identified and characterized in mushroom fruiting bodies and mycelia with proven medicinal properties [13].

Another approach to evaluating potential immunomodulatory activity involves assessing the capacity of a particular substance to influence specific immune functions, such as activating individual components of the immune system and promoting cytokine synthesis. Immunomodulation by a fungal compound can be determined by the capacity of the compound to influence cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM). These activities include mitogenicity, stimulation, and activation of immune effector cells. The immune cells exposed to stimulating agents, such as the lipopolysaccharides (LPS), release several inflammatory cytokines including interleukin 1 (IL-1 β). We focused on IL-1 β determination because it exerts multiple pro-inflammatory effects across a broad range of cell types and plays essential homeostatic roles in an inflammatory process by regulating other cytokines [45]. The tests on immune cells were performed exclusively with *A. sojae* mycelium or SSF culture extract because that strain provided the best results in the NBT reduction assay. The secreted cytokine IL-1 β was measured using an ELISA assay as well as non-activated (culture medium alone) and activated immune cells (LPS stimulated), which were used as controls.

The initial approach was to verify the presence of pharmacological activity in the soluble part of the tested products without cell toxicity in the most suitable cell model, the PBMC. To determine IL-1 β levels and the effects of crude extract on cell viability, PBMC were incubated with different concentrations of the mycelium and SSF extracts of *A. sojae* (from 0.125 to 1 mg/mL) for 24 h. Using the XTT assay, no significant effects of the extracts were observed on cell viability at the concentration range shown in Fig. 3. The lowest cell viability of human PBMC was 60% in the presence of 0.25 mg/mL of *A. sojae* SSF culture extract. This cytotoxicity did not increase with the sample concentration. Therefore, interaction with the XTT assay was possible. The stimulation of PBMC with *A. sojae* mycelium or SSF extract caused no cell proliferation either. As shown in Fig. 3, after a 24-h incubation, stimulation by LPS at a concentration of 10 ng/mL induced the production of IL-1 β by PBMC (928 ± 70 pg/mL) compared to the basal level in the control culture medium (13 ± 3 pg/mL). The two anti-inflammatory internal references ZVAD (5 μ M) and PRED (100 μ M) induced a significant decrease in the production of IL-1 β by stimulated PBMC, with 41 and 32% reduction, respectively, compared to LPS alone. Mycelium extract was more potent than *A. sojae* SSF extract because the culture on rapeseed meal was less concentrated in biomass and had a lower amount of polysaccharides such as β -glucan. Both mycelium and SSF extract of *A. sojae* significantly reduced IL-1 β levels at all concentrations tested. Specifically, over 90% reduction was observed at the highest concentrations, which was higher than the two anti-inflammatory references (ZVAD and PRED). IL-1 β responded to *A. sojae* mycelium and SSF extract in a dose-dependent manner. Similar observations on the effect of fungal β -glucan have been reported with PBMC. Poutsiaika et al. [46] demonstrated that particulate β -glucan could induce a strong IL-1Ra response, which is a natural IL-1 β inhibitor, without inducing IL-1 β production. In addition, Luhm et al. [47] demonstrated that β -1,3-D-glucan decreased the IL-1 β /IL-1Ra ratio without inducing any significant production of IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), or interferon γ . Similarly, β -glucan of *C. albicans* induced a strong IL-1Ra response without any other stimulation components [48]. It is clear that

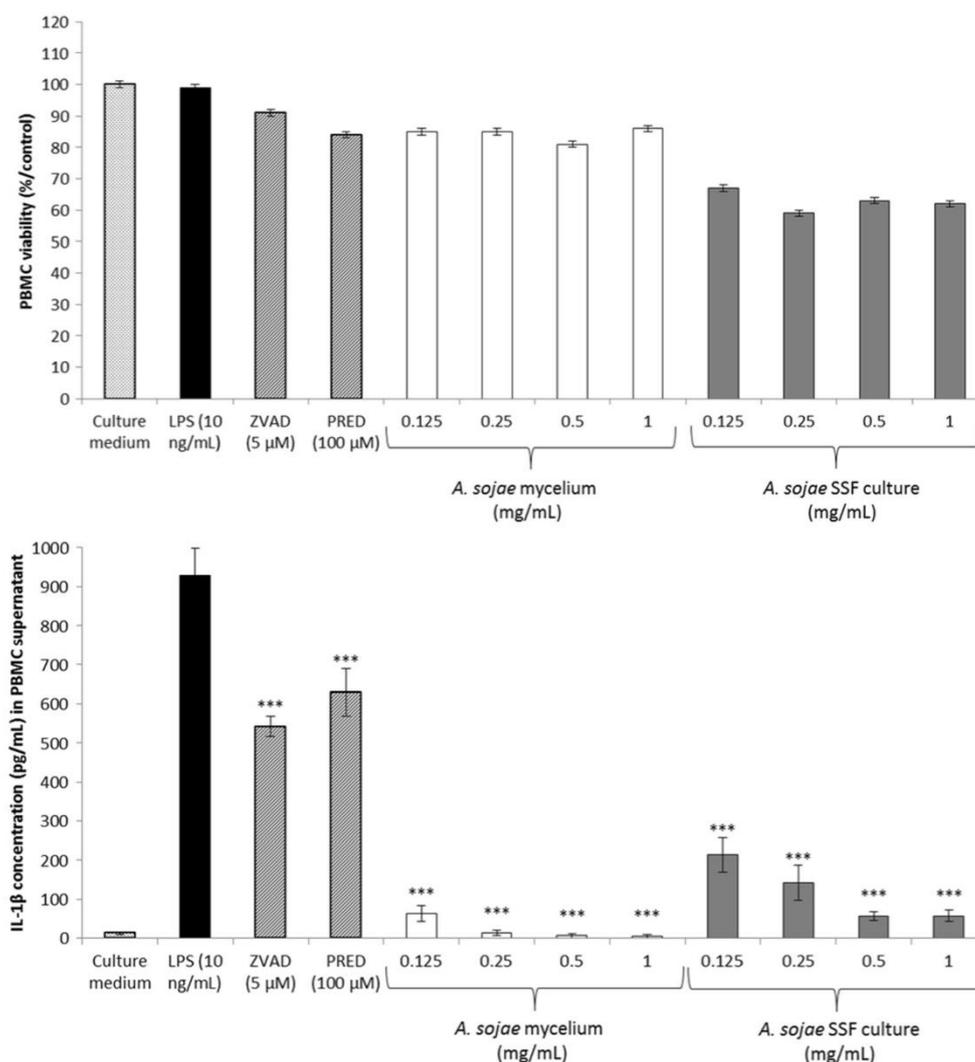


Fig. 3 Percentage of cell viability and concentration of IL-1 β secreted in the cell medium by PBMC in the culture medium alone, the culture medium supplemented with 10 ng/mL LPS, the culture medium supplemented with 10 ng/mL LPS plus the two anti-inflammatory internal references (ZVAD, PRED) and the culture medium supplemented with 10 ng/mL LPS and *Aspergillus sojae* mycelium or SSF culture extract tested at four concentrations (0.125, 0.25, 0.5, and 1 mg/mL). ***Significant difference determined by variance analysis (ANOVA)

the cytokine profile might be different from LPS and also from other stimulation compounds. A water-soluble extract from cultured mycelia of *Lentinus lepideus* significantly increased IL-1 β levels of PBMC while other cytokines were unaffected. Thus, depending on the presence of co-stimulatory factors and molecule conformation, β -glucan recognition could either have pro- or anti-inflammatory effects [15].

Macrophages are the first line of host defense and play an important role in the initiation of adaptive immune responses. According to the in vivo animal data of Chan et al. [16], β -glucans enter the proximal small intestine rapidly and are captured by macrophages after oral administration. The small β -glucan fragments are then released by this first target cell and taken up by the circulating immune cell line. Then, the immune response is elicited. The

response of BMDM to *A. sojae* culture obtained from a solid-state fermentation in a pre-pilot bioreactor was investigated to confirm/compare the immunomodulatory effects observed with PBMC. Using macroscopic observation as well as moisture and temperature analysis, the solid-state process under forced aeration conditions was significantly accelerated in the packed-bed bioreactor (data not shown). Therefore, culture removal was done earlier after 48 h of cultivation before *A. sojae* sporulation. The majority of the metabolic heat was eliminated by manual agitation at 24 h and fresh air injection. Water addition was not necessary to maintain the humidity around 50% during fermentation. The effect of rapeseed meal and SSF product was evaluated on cell toxicity and IL-1 β secretion by mouse mature macrophages stimulated by an endotoxin (LPS). However, the active ingredient was considered to be insoluble (β -glucan), and the presence of pharmacological activity was performed on the complete product including the insoluble particles. For that reason, another cell model was tested because it was adapted to the presence of insoluble particles, especially macrophages that have the ability to perform phagocytosis. LPS used at a non-cytotoxic concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h induced BMDM proliferation (Fig. 4). The cell population also doubled in the presence of all of the other products that were tested. After adding 5 μM of ZVAD, 70 μM PRED, and different concentrations of non-fermented rapeseed meal or *A. sojae* SSF culture in the presence of LPS, there was no statistical change in BMDM viability, and the same degree of cell proliferation was induced. Figure 4 illustrates the production of IL-1 β in response to rapeseed meal and *A. sojae* SSF culture. The anti-inflammatory control products (ZVAD and PRED) reduced the production of IL-1 β induced by stimulated BMDM by 44 and 87%, respectively, compared to LPS. The non-fermented rapeseed meal had no effect on IL-1 β production while *A. sojae* SSF culture increased IL-1 β secretion by stimulated BMDM. The effect of SSF culture was significant at the highest concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with a doubling of IL-1 β secretion from 23 ± 3 to 48 ± 5 pg/mL . The results obtained with BMDM coincided with previous reports concerning IL-1 β secretion after stimulation with fungal compounds, especially from yeast and *G. lucidum* polysaccharides. Ji et al. [49] demonstrated that exposure to *G. lucidum* proteoglycan activated mouse macrophages in a dose-dependent manner and increased the levels of IL-1 β gene expression. Further studies demonstrated that IL-1 β and TNF- α production significantly increased in mouse peritoneal macrophages in vitro treated with *Ganoderma* polysaccharides. This type of response was shown with different *G. lucidum* extracts and mushroom crude material [50]. Hsu et al. [51] also demonstrated that the well-known toll-like receptor 4 (TLR4), which is one of the main pattern recognition receptors expressed by macrophages, is a putative receptor of the extract of *G. lucidum* polysaccharides mediating the consequent immunomodulatory events associated with IL-1 gene expression. Pre-exposure to fungal polysaccharides up-regulates LPS stimulation of pro-IL-1/IL-1 expression in both human and murine macrophages. In other studies, zymosan (β -glucan-rich yeast particles) activated IL-1 β secretion in human macrophages. Zymosan is also known to contain mannans and chitins, which can stimulate responses through toll-like receptors (TLRs). These studies implicate dectin-1 for IL-1 β transcription in human macrophages. Zymosan led to cellular responses as well as to live yeast pathogens. Suzuki et al. [52] demonstrated the effect of orally administered fungal β -glucan in mice by the enhancement of peritoneal macrophage activity with a significant phagocytic activity and hydrogen peroxide as well as interleukin 1 production. Recently, data showed that the response of macrophages to β -glucans depended on their state of differentiation and the presence of LPS and/or cytokines in the microenvironment [53]. Polysaccharides represent one of the most

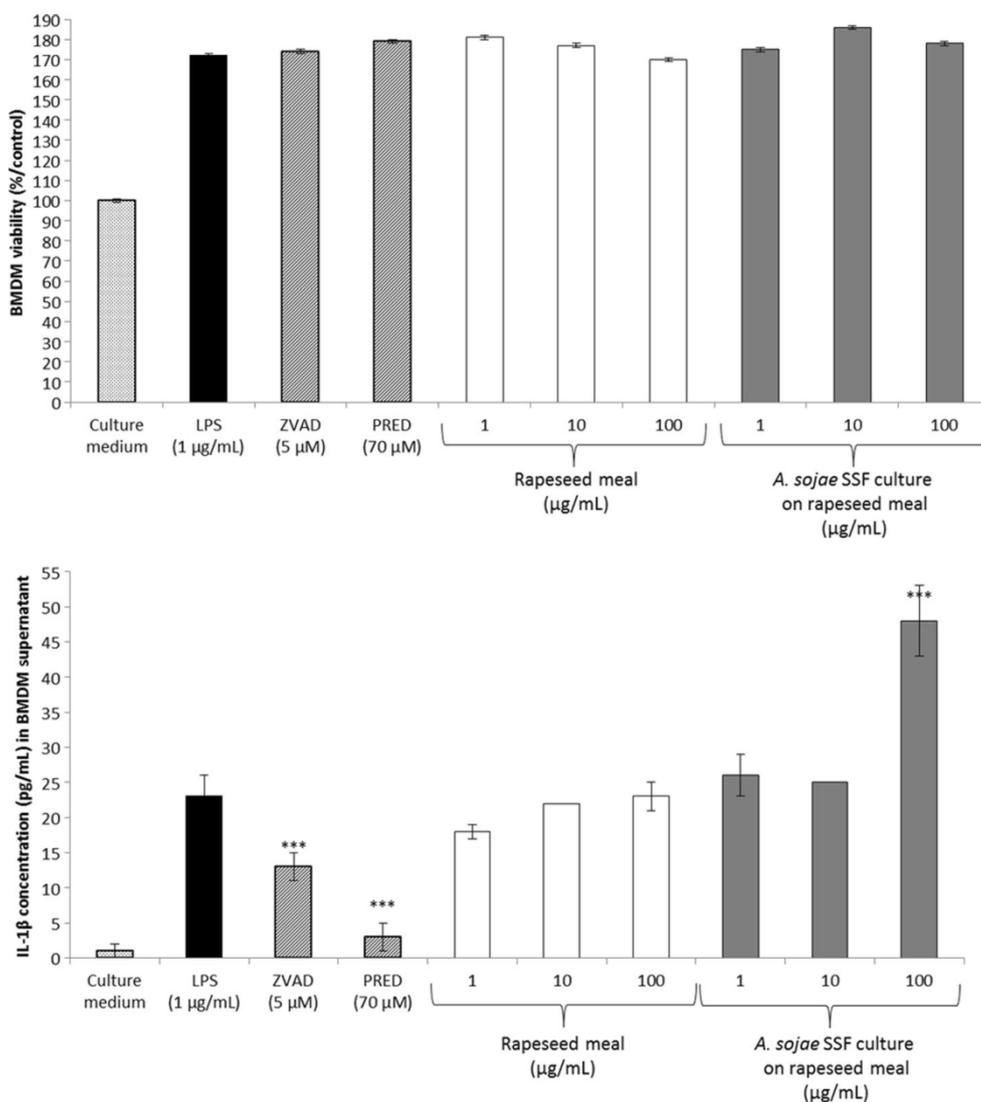


Fig. 4 Percentage of cell viability and concentration of IL-1 β secreted in the cell medium by BMDM in the culture medium alone, the culture medium supplemented with 1 μ g/mL LPS, the culture medium supplemented with 1 μ g/mL LPS plus the two anti-inflammatory internal references (ZVAD, PRED), and the culture medium supplemented with 1 μ g/mL LPS and rapeseed meal or *Aspergillus sojae* SSF culture extract tested at three concentrations (1, 10, and 10 μ g/mL). ***Significant difference determined by variance analysis (ANOVA)

abundant components in fungi. Nevertheless, the multiple pharmacological effects of mushrooms could be attributed to its numerous chemical ingredients, including polysaccharides, proteins, lectin, terpenes, lipids, ergosterol, steroids, and aminophenols [18, 29].

Conclusion

In this paper, we reported an interesting biological activity from crude water extracts obtained after a solid-state fermentation. The cultivation of filamentous fungi on

rapeseed meal showed promising in vitro immunomodulatory properties. The strain *A. sojae* was successfully cultivated in a pre-pilot bioreactor under forced aeration. The results in immune cell models such as neutrophils, peripheral blood monocytes (PBMC), or macrophages differentiated from mouse BMDM showed a significant immunomodulatory activity through IL-1 β secretion of LPS-stimulated cells. According to the literature, this activity may be related to the presence of β -glucans, which are an integral part of fungal biomass. The PBMC response to fungal SSF extract was increased in a dose-dependent manner with a high concentration of β -glucan mycelium extract in relation to SSF extract. In contrast to PBMC, IL-1 β production was increased in BMDM in the presence of SSF culture extract. This target cell model confirmed the potential of *A. sojae* SSF culture extract to stimulate an immune response and showed that β -glucan recognition can have either pro- or anti-inflammatory effects, depending on the type of immune cell that is tested and the inflammatory environment. Further investigations are also necessary to verify these activities in vivo. Despite our current lack of knowledge about the precise mechanisms involved in mediating the immune response by SSF fungal extract, the results presented in this report are promising and suggest that further study is needed, especially for polysaccharide characterization and extraction. Solid-state fermentation cultivation techniques would be most appropriate for the production of immunostimulatory animal feed supplements because in this case, the whole fermented substrate would be used as the product [54]. Extended knowledge of the immunoenhancing activity of *A. sojae* SSF compounds would be useful for understanding the potential applications for SSF-derived preparations for animal feed or immunotherapy.

Acknowledgements The authors would like to thank the Fonds De Developpement Des Filieres Des Oleagineux Et Des Proteagineux for funding this research. We are grateful to Dr. S. Delemasure-Chalumeau and Dr. P. Dutatre (Cohiro Biotechnology) for their contributions to the immune assay and statistical analysis.

References

1. OCDE/FAO. (2015). « Oléagineux et produits oléagineux », in Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2015, Paris, Editions OCDE 2015.
2. Ugwuanyi, J.O., McNeil, B. and Harvey, L.M. (2009). Production of protein-enriched feed using agro-industrial residues as substrates, in P. Singh-Nee Nigam, and A. Pandey (Eds.), Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer.77–103.
3. Ramachandran, S., Singh, S. K., Larroche, C., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2007). Oil cakes and their biotechnological applications—a review. *Bioresource Technology*, 98, 2000–2009.
4. Wang, R., Shaarani, S. M., Godoy, L. C., Melikoglu, M., Vergara, C. S., Koutinas, A. A., & Webb, C. (2010). Bioconversion of rapeseed meal for the production of a generic microbial feedstock. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 77–83.
5. Sivaramkrishnan, S. and Gangadharan, D. (2009). Edible oil cakes, in P. Singh-Nee Nigam, and A. Pandey (Eds.), Biotechnology for agro-industrial residues utilisation. Springer, 253–271.
6. Holker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation—are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, 8, 301–306.
7. Rodriguez Couto, S., & Sanroman, M. A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry—a review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291–302.
8. Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 81–84.
9. Villas-Boas, S. G., Esposito, E., & Mitchell, D. A. (2002). Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 98, 1–12.

10. Graminha, E. B. N., Gonçalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Da Silva, R., & Gomes, E. (2008). Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*, *144*, 1–22.
11. Bisaria, V. S., Saxena, S. K., Manihar, R. B., & Gopalkrishnan, K. S. (1984). Solid state fermentation of plant residues for improved animal feed by *Pleurotus sp.* *Applied Biochemistry and Microbiology*, *9*, 341.
12. Kyanko, M. V., Canel, R. S., Ludemann, V., Pose, G., & Wagner, J. R. (2013). β -Glucan content and hydration properties of filamentous fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *49*, 41–45.
13. Lull, C., Wichers, H. J., & Savelkoul, H. F. (2005). Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*, *2005*, 63–80.
14. Ramberg, J. E., Nelson, E. D., & Sinnott, R. A. (2010). Immunomodulatory dietary polysaccharides: a systematic review of the literature. *Nutrition Journal*, *9*, 1–22.
15. Jin, M., Jung, H. J., Choi, J. J., Jeon, H., Oh, J. H., Kim, B., Shin, S. S., Lee, J. K., Yoon, K. J., & Kim, S. (2003). Activation of selective transcription factors and cytokines by water-soluble extract from *Lentinus lepideus*. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, *228*, 749–758.
16. Chan, G. C., Chan, W. K., & Sze, D. M. (2009). The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, *2*, 25.
17. Volman, J. J., Ramakers, J. D., & Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology and Behavior*, *94*, 276–284.
18. El Enshasy, H. A., & Hatti-Kaul, R. (2013). Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*, *31*, 668–677.
19. Singh, R. S., Bhari, R., Rana, V., & Tiwary, A. K. (2011). Immunomodulatory and therapeutic potential of a mycelial lectin from *Aspergillus nidulans*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *165*, 624–638.
20. Mahapatra, S., & Banerjee, D. (2013). Optimization of a bioactive exopolysaccharide production from endophytic *Fusarium solani* SD5. *Carbohydrate Polymers*, *97*, 627–634.
21. Takahashi, J.A. and Carvalho, S.A. (2010). Nutritional potential of biomass and metabolites from filamentous fungi, in A. Mendez-Vila (Ed.), Current research technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, Formatex, 1126–1135.
22. Zuchowski, J., Pecio, L., Jaszek, M., & Stochmal, A. (2013). Solid-state fermentation of rapeseed meal with the white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *171*, 2075–2081.
23. Shi, M., Yang, Y., Guan, D., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2012). Bioactivity of the crude polysaccharides from fermented soybean curd residue by *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers*, *89*, 1268–1276.
24. Svagelj, M., Berovic, M., Boh, B., Menard, A., Simcic, S., & Wraber, B. (2008). Solid-state cultivation of *Grifola frondosa* (dicks :Fr) S.F. Gray biomass and immunostimulatory effects of fungal intra- and extracellular β -polysaccharides. *New Biotechnology*, *25*, 150–156.
25. Kim, H., Suh, H. J., Kwon, K. H., Hwang, J. H., & Yu, K. W. (2016). Immunostimulation activity of a polysaccharide from fermented ginseng with *Hericium erinaceum* mycelia in solid-state culture. *Food Science and Biotechnology*, *25*, 311–318.
26. Nwe, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2011). Production, properties and applications of fungal cell wall polysaccharides: chitosan and glucan. *Advances in Polymer Science*, *244*, 187–208.
27. Sugumaran, K. R., Jothi, P., & Ponnusami, V. (2014). Bioconversion of industrial solid waste—cassava bagasse for pullulan production in solid state fermentation. *Carbohydrate Polymers*, *99*, 22–30.
28. Yu, K. W., Kim, Y. S., Shin, K. S., Kim, J. M., & Suh, H. J. (2005). Macrophage-stimulating activity of exopolysaccharide from cultured rice bran with *Monascus pilosus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *126*, 35–48.
29. Li, S. (2014). Utilization of soybean curd residue for polysaccharides production by *Morchella esculenta* and evaluation of the biological activity. PhD thesis, University of Tsukuba, Japan.
30. Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*, 113–125.
31. AOAC (1990). *Official methods of analysis* (15th ed.). Washington, DC., USA: Association of Official Analytical Chemists.
32. Maugé, L. (2013). Le modèle cellulaire THP-1: adaptation à l'étude de modulateurs de l'activité inflammatoire précoce impliquant l'inflammasome. PhD thesis, Université de Bourgogne, France
33. Roehm, N. W., Rodgers, G. H., Hatfield, S. M., & Glasebrook, A. L. (1991). An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, *142*, 257–265.
34. Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, *1*, 3.
35. Smits, J. P., Rinzema, A., Tramper, J., Van Sonsbeek, H. M., Hage, J. C., Kaynak, A., & Knol, W. (1998). The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme Microbial Technology*, *22*, 50–57.
36. Roussos, S., Hannibal, L., Durand, A., Diez, M., Saucedo, G., & Montet, D. (1994). Protein enrichment of copra cake—selection of filamentous fungi in SSF. *Oléagineux*, *49*, 235–247.

37. Terebiznik, M. R., & Pilosof, A. M. R. (1999). Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. *Biotechnology Techniques*, *13*, 215–219.
38. Farinas, C. S., Vitcosque, G. L., Fonseca, R. F., Neto, V. B., & Couri, S. (2011). Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. *Industrial Crops and Products*, *34*, 1186–1192.
39. Lee, Y. T., & Kim, Y. S. (2005). Water-solubility of β -glucans in various edible mushrooms. *Journal of Food Science and Nutrition*, *10*, 294–297.
40. Martins, S., Mussatto, S. I., Martinez-Avila, G., Montanez-Saenz, J., Aguilar, C. N., & Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, *29*, 365–373.
41. Daniel, P. S., Abba, I. T., & Tristram, G. P. (1994). *Basic and clinical immunology* (8th ed., pp. 195–215). USA: Appleton and Lange.
42. Castro, R., Couso, N., Obach, A., & Lamasa, J. (1999). Effect of different β -glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology*, *9*, 529–541.
43. Jang, S. A., Kang, S. C., & Sohn, E. H. (2011). Phagocytic effects of β -glucans from the mushroom *Coriolus versicolor* are related to dectin-1, NOS, TNF- α signaling in macrophages. *Biomolecules and Therapeutics*, *19*, 438–444.
44. Chen, J., & Seviour, R. (2007). Medicinal importance of fungal β -glucans. *Mycological Research*, *111*, 635–652.
45. Dinarello, C. A. (1994). The biological properties of interleukin-1. *European Cytokine Network*, *5*, 517–531.
46. Poutsika, D. D., Mengozzi, M., Vannier, E., Sinha, B., & Dinarello, C. A. (1993). Cross-linking of the beta-glucan receptor on human monocytes results in interleukin-1 receptor antagonist but not interleukin-1 production. *Blood*, *82*, 3695–3700.
47. Luhm, J., Langenkamp, U., Hensel, J., Frohn, C., Brand, J. M., Hennig, H., Rink, L., Koritke, P., Wittkopf, N., Williams, D. L., & Mueller, A. (2012). β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors κ B, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1 β /IL-1 receptor antagonist ratio. *BMC Immunology*, *2006*, 7–5.
48. Smeekens, S. P., Gresnigt, M. S., Becker, K. L., Cheng, S. C., Netea, S. A., Jacobs, L., Jansen, T., Veerdonk, F. L., Williams, D. L., Joosten, L. A. B., Dinarello, C. A., & Netea, M. G. (2015). An anti-inflammatory property of *Candida albicans* β -glucan: induction of high levels of interleukin-1 receptor antagonist via a dectin-1/CR3 independent mechanism. *Cytokine*, *71*, 215–222.
49. Ji, Z., Tang, Q., Zhang, J., Yang, Y., Jia, W., & Pan, Y. (2007). Immunomodulation of RAW264.7 macrophages by GLIS, a proteopolysaccharide from *Ganoderma lucidum*. *Journal of Ethnopharmacology*, *112*, 445–450.
50. Lin, Z. B. (2005). Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *Journal of Pharmacological Sciences*, *99*, 144–153.
51. Hsu, H. Y., Hua, K. F., Lin, C. C., Lin, C. H., Hsu, J., & Wong, C. H. (2004). Extract of *Reishi* polysaccharides induces cytokine expression via TLR4-modulated protein kinase signaling pathways. *The Journal of Immunology*, *173*, 5989–5999.
52. Suzuki, I., Tanaka, H., Kinoshita, A., Oikawa, S., Osawa, M., & Yadomae, T. (1990). Effect of orally administered β -glucan on macrophage function in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, *12*, 675–684.
53. Muncio, C., Alvarez, Y., Montero, O., Hugo, E., Rodriguez, M., Domingo, E., Alonso, S., Fernandez, N., & Crespo, M. S. (2013). The response of human macrophages to β -glucans depends on the inflammatory milieu. *PloS One*, *8*, e62016.
54. Thevenieau, F., Bourdillon, A., Durand, A., De Coninck, J. and Sutter, S. (2015). Produit alimentaire et son procédé d'obtention. Fidop. Patent WO 2015101650 A3, 27/08/2015.

Valorisation du tourteau de colza par fermentation en milieu solide pour une application en alimentation animale

La fermentation en milieu solide (FMS) est un procédé biotechnologique particulièrement bien adapté au traitement de la biomasse végétale. Cette technologie, extrapolable à l'échelle industrielle, peut répondre aux besoins actuels du marché de l'alimentation animale en développant des produits fermentés visant à améliorer les qualités des matières premières d'un point de vue nutritionnel et fonctionnel. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse développent ces aspects à partir du tourteau de colza issu du procédé de trituration des graines.

Un premier criblage a mis en évidence le potentiel de certaines souches fongiques en prenant en compte les performances de croissance et leur capacité à enrichir le tourteau en protéines totales et digestibles. Des teneurs comparables à celles du tourteau de soja, principale source de protéine en nutrition animale, ont d'ailleurs été atteintes. Une activité biologique d'intérêt a ensuite été démontrée *in vitro* sur cellules immunitaires. Cette voie, inexplorée jusqu'à présent à partir de culture en milieu solide, confère une valeur ajoutée au produit fermenté *via* un apport en composés immunomodulateurs naturels d'origine fongique comme les β -glucanes. Ces derniers suscitent un intérêt croissant car ils représentent une alternative à l'utilisation des antibiotiques comme facteur de croissance. L'étude consacrée à la phase d'optimisation du procédé FMS a permis d'accroître les performances de croissance de la souche *A. sojae* et de définir une stratégie visant à maintenir les conditions optimales de croissance en réacteur pré-pilote à couche profonde. Des complications liées à la granulométrie très fine du tourteau de colza et à la qualité microbiologique qui évolue en cours de fermentation dans des conditions non stériles ont pu être identifiées mais le procédé mis en place a alors permis de les maîtriser en partie.

Mots-clés: fermentation en milieu solide, alimentation animale, tourteau de colza, champignons filamenteux, cinétique de croissance, protéine, immunomodulation, β -glucane, cellules immunitaires

Valorization of rapeseed meal by solid state fermentation for an application in animal nutrition

Solid state fermentation (SSF) is a biotechnological process particularly well adapted to the treatment of vegetable biomass. This technology adjustable to industrial scale, is adapted to current challenges in animal nutrition by developing fermented products in order to improve the quality of raw materials from a nutritional and functional point of view. The work presented in this thesis considers these issues using rapeseed meal from the oil crushing industry.

A first screening study highlighted several fungal strains based on their growth performance and protein enrichment (total and digestible) of the substrate. Levels similar to those of soybean meal, the main protein source in animal nutrition, have also been reached. An interesting biological activity was then reported *in vitro* on immune cells. To date, this way has never been investigated concerning solid state culture. The presence of fungal immunomodulatory compounds as β -glucan confers added value to the fermented product. Recently, there has been growing interest in natural immunomodulators as they represent an alternative to the use of antibiotics for growth promotion in food animal production. SSF process optimization improved the growth performance of the strain *A. sojae* and helped to determine the best strategy to maintain optimum growth conditions at larger scale in the deep-bed pre-pilot reactor. Complications related to the fine particle size of the rapeseed meal and the changes in microbiological quality during fermentation under non-sterile conditions were also identified and partially controlled by the process.

Keywords: solid-state fermentation, animal nutrition, rapeseed meal, filamentous fungi, growth kinetics, protein, immunomodulation, β -glucan, immune cells