



HAL
open science

Maîtrise de la fermentation butyrique par la microflore lactique réductrice

Edouard Munier

► **To cite this version:**

Edouard Munier. Maîtrise de la fermentation butyrique par la microflore lactique réductrice. Biotechnologies. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCK005 . tel-04053372

HAL Id: tel-04053372

<https://theses.hal.science/tel-04053372>

Submitted on 31 Mar 2023

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

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



**THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ BOURGOGNE
FRANCHE-COMTÉ**

**PRÉPARÉE À INRAE/URTAL-POLIGNY ET INSTITUT AGRO DIJON/UMR PAM-
DIJON**

École doctorale n°554

École doctorale Environnements, Santé

Doctorat de spécialité « Biotechnologie en agroalimentaire »

Par

Mr Munier Edouard

Maitrise de la fermentation butyrique par une microflore lactique réductrice

Thèse présentée et soutenue à « Dijon », le «20 Janvier 2023 »

Composition du Jury :

Monsieur Delaunay Stéphane	Professeur, Université de Lorraine	Président du Jury, rapporteur
Madame Taillandier Patricia	Professeure, INP Toulouse	Rapporteur
Madame Véronique Broussolle	Directrice de Recherche, INRAE	Examinatrice
Monsieur Majou Didier	Directeur de l'ACTIA	Examinateur
Monsieur Beuvier Eric	Ingénieur de Recherche, INRAE	Codirecteur de thèse
Monsieur Cachon Rémy	Professeur, Institut Agro Dijon	Codirecteur de thèse



Titre : Maîtrise de la fermentation butyrique par une microflore lactique réductrice.

Mots clés : Spore, Fermentation butyrique, Bactérie lactique, Potentiel d'oxydoréduction, *Clostridium tyrobutyricum*,

Parmi les *Clostridia*, *C. tyrobutyricum* est l'espèce majeure à l'origine du défaut de gonflement tardif retrouvé chez les fromages à pâte pressée. Il existe différentes méthodes de contrôle ou préventives pour réduire la population de spores de *C. tyrobutyricum* comme « les bonnes pratiques laitières », un dénombrement des spores de *Clostridium* dans le lait avant fabrication fromagère ou encore l'ajout d'additifs, l'utilisation de la bactofugation ou de la microfiltration. Cependant, il suffit d'une très faible concentration de spores pour voir apparaître ce défaut. Les résultats du projet Food-Redox ont montré que la modulation de l'environnement redox par des bactéries lactiques réductrices pourrait avoir un impact sur l'apparition du gonflement tardif dans les fromages. L'objectif de cette thèse a été d'étudier l'impact du E_h sur la germination, la croissance et le métabolisme de *C. tyrobutyricum*.

Pour cela, nous avons sélectionné différentes souches de bactéries lactiques en fonction de leur activité réductrice à l'aide de différentes méthodes déjà existantes. En parallèle, nous avons développé une nouvelle méthode de criblage en plaque 96 puits, permettant de discriminer des bactéries lactiques d'une même espèce en fonction de leur activité réductrice via un milieu spécifique supplémenté avec un sel de tétrazolium. Cette méthode a permis de sélectionner des souches de bactéries lactiques selon leur profil de réduction, en culture pure ou en culture mixte.

Nous avons utilisé ces différentes bactéries lactiques réductrices dans des fabrications type Emmental contaminées avec des spores de *C. tyrobutyricum* afin de déterminer l'impact de leur activité réductrice sur le défaut de gonflement tardif. Il s'est avéré que la combinaison d'un lactocoque et d'un lactobacille hétérofermentaire facultatif, tous deux fortement réducteurs, pourrait permettre de retarder l'apparition de l'accident.

Nous avons travaillé avec la souche *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 connue pour être capable d'engendrer le gonflement tardif dans les fromages type Emmental. Un séquençage de son génome et des analyses bio-informatiques ont permis de proposer un nouveau schéma métabolique avec le lactate et l'acétate comme seules sources de carbone. L'analyse des flux métaboliques de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* a permis de valider ce nouveau schéma à partir des métabolites quantifiés à l'état stationnaire d'une fermentation continue. En revanche, l'étude des flux métaboliques de *C. tyrobutyricum*, à différentes conditions de E_h , n'a pas montré de réel impact de ce paramètre. Néanmoins, l'application de différentes conditions de E_h a permis de démontrer un retardement de l'initiation de la germination en milieu réducteur pouvant apporter une explication des résultats obtenus en fabrication fromagère.

Title : Control of butyric acid fermentation by reducing lactic microflora

Keywords : Spore, Butyric acid fermentation, Lactic bacteria, redox potential, *Clostridium tyrobutyricum*

One of the main specie leading to late blowing defect in hard and semi-hard cheese amongst *Clostridia* is *C. tyrobutyricum*. There are various preventives methods to control or prevent spores contamination from *C. tyrobutyricum* such as Good Dairy Farming Practice, *Clostridium* spore counting in milk before cheese making or even adding food additives, the use of bactofugation or microfiltration. However, only a low concentration leads to the late blowing defect. The results of Food-Redox shown that modulating the cheese redox environment by reducing lactic bacteria could have an impact on the occurrence of the late blowing defect. The aim of this Ph.D work was to study the impact of E_h on *C. tyrobutyricum* germination and metabolism.

Therefore, we selected various lactic bacteria strains according to their reducing activity with various exiting methods. In the meantime, we developed a new microplate screening method to discriminate lactic bacteria from a same specie based on their reducing activity through a specific liquid medium supplemented with tetrazolium salt. This selection let us obtain different reduction profile from lactic acid bacteria cultures composed of one or more species.

We added these reducing lactic bacteria to Emmental cheesemaking contaminated with *C. tyrobutyricum* spores in order to determine the impact of their reducing activity on *C. tyrobutyricum*. It appears that the combination of a *Lactococcus* and a *Lactobacillus*, both of which are highly reducing, could delay the onset of the late blowing defect caused by *C. tyrobutyricum*.

We worked with the *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 strain known to be able to induce late blowing defect in Emmental cheeses. Sequencing genome and bioinformatic analyses have led us to propose a new metabolic scheme with lactate and acetate as the only carbon sources. The analysis of the metabolic flows of the butyric fermentation from *C. tyrobutyricum* allowed to validate this new scheme from metabolites data at steady-state of continuous fermentation.

However, the study of metabolic flux analysis from *C. tyrobutyricum* butyric acid fermentation at different E_h conditions did not really show any impact. On the contrary, the application of different E_h conditions made it possible to demonstrate a delay in the initiation of germination in a reducing environment, which could explain the results obtained in cheesemaking.



Université Bourgogne Franche-Comté
32, avenue de l'Observatoire
25000 Besançon

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Patricia Taillandier et Stéphane Delaunay d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, et Véronique Broussolle et Didier Majou d'avoir accepté d'être examinateurs. Merci également aux membres de mon comité de suivi, Philippe Schmit et Yves Waché pour leurs remarques et conseils sur mes travaux de thèse.

Un grand merci à mes encadrants, Rémy Cachon et Eric Beuvier pour leur bonne humeur, leur soutien et leur accompagnement, leurs réflexions sur tous les sujets de la thèse, leur enseignement précieux et leur bienveillance.

Je remercie également Franck Dufrene, Floriane Revardeau, Pascal Barbet, Fabrice Petitpas et Marie Hélène Duployer, de l'URTAL INRAE Poligny, pour leur aide précieuse pour les expérimentations en fromagerie et les analyses microbiologiques, physico-chimiques. Mention spéciale à Franck pour m'avoir accompagné et supporté pendant mes expériences folles pouvant durer plus de 24 heures : Merci !

Également merci à Nicolas Depretre, mon partenaire de bureau pour ça bonne humeur Rock'n'roll et pour les pauses repas, fléchettes et babyfoots. Et puis comment ne pas mentionner Emillen Delorme, mon collègue covoitureur, devenu un ami précieux, merci pour ton soutien et toutes les longues discussions scientifiques, philosophiques et même farfelues que nous avons eues et continuons à partager !

Merci à tous les membres de l'URTAL de m'avoir accueilli dans vos locaux à Poligny.

D'autre part, je souhaite remercier tous les membres de l'équipe FBI pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire à Dijon et de m'avoir accompagné pendant toute cette période. Merci à Christine d'avoir assuré sur les commandes malgré la jungle administrative et à Hélène pour ses conseils sur les constructions et ses relectures pour les publications écrites lors de ma thèse. Je tiens également remercier tous les doctorants et postdoctorant que j'ai pu croiser en partant des anciens, Aurore, Da, Mai et Antonio (avec ses petits bisous) et aux plus récents, Maria, Estelle, Socheata, Huong, Fanny pour les discussions scientifiques, les parties de molkky et les randonnées autour de Dijon, pour son énergie et sa bonne humeur au quotidien et sans oublier Maxime, mon binôme pour les moments bidouilles, brainstormings pour trouver des solutions à nos problèmes, les discussions au tour du café réalisé dans les règles de l'art (Attention c'est

55 °C la dégustation !!) et de son soutien pendant les périodes difficiles comme les longues soirées d'expériences et surtout pendant le confinement qui ne fût pas facile pour tous les deux.

Merci à tous les membres de l'UMR PAM que j'ai pu rencontrer ainsi que Philippe Cayot et Christelle Caillot pour leur aide et leur bienveillance lors de mon passage à l'institut Agro Dijon.

Merci également à ma précieuse famille et belle famille, toujours à mes côtés pour m'accompagner, pour le soutien à leur « Docteur en Fromage » pendant les moments de doutes, difficile et pour les moments ensembles qui m'ont apporté joie et bonheur.

Enfin, une reconnaissance toute particulière à Audrey, ma compagne, pour m'avoir soutenu chaque instant de ma vie (à 80 km de distance ou non), de m'avoir accompagné pendant cette vie de doctorant, d'avoir endosser le rôle de pilier sans failles et pour m'avoir fait découvrir sans arrêt de nouveaux moments de bonheur.

Abréviations

AAL : Acide aminé libre

ABRA : Absorbance reduction activity method

Abs : Absorbance

Abs_{max} : Valeur d'absorbance la plus élevée

ACK : acétate kinase

ATP : Adénosine triphosphate

Bcd : butyryl-CoA déshydrogénase

Buk, Bk : Butyrate kinase

CRB : Condition réduction basse

CRH : Condition réduction haute

CRT : Crotonase

CTC : 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride

DGT : Défaut du gonflement tardif

DH : déshydrogénase

DO : Densité optique

DO_{max} : Valeur de turbidité/densité optique la plus élevée

E_{h min} : Valeur E_h la plus basse (mV)

E_h : Potentiel d'oxydoréduction

E_{h7} : E_h normalisé à pH 7

E_{hi} : Valeur initiale E_h d'un environnement (mV)

ENILBIO : Ecole Nationale d'Industrie Laitière et des Biotechnologies

ES : Extrait sec

Etf : electron transfer flavoprotein

FAD : flavin adénine dinucléotide

FBEB : Flavin-Based Electron Bifurcation

Fd : Ferrédoxine

FSDA : Fast Low differential agar

GABA : acide g-aminobutyrique

GlcD : domain of FAD-dependent lactate dehydrogenase

HBD : 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase

HPLC : high performance liquid chromatography

Hyd : hydrogenase

iNAD⁺-LDH : Independent NAD⁺ lactate dehydrogenase

KEGG : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LDH : lactate dehydrogenase

LHF : Lactobacille hétérofermentaire facultatif

LldP : lactate permease

MBA : Milieu bromocrésol pourpre agar

MFA : metabolic flux analysis

MG : Matière grasse

MPA : Matière protéique azoté

MRS : Man, Rogosa, Sharpe

MTA : Milieu tétrazolium agar

MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NfnAB : NADH-dependent ferredoxin:NADP reductase

NPP : Nombre le plus probable

ORCA : Colorimetric reduction capacity method

ORP : Potentiel d'oxydoréduction

PFOR : Pyruvate ferredoxin: oxidoreductase

pH_i : Valeur initiale de pH d'un environnement (Unités pH)

pH_{min} : Valeur pH la plus basse (Unités pH)

PORA : Potentiometric reduction activity method

PTA : phosphotransacetylase

Ptb : Phosphotransbutyrylase

RCM : Reinforced Clostridial Medium

RCMG : Reinforced *Clostridia* medium Glucose

RCMLA : Reinforced *Clostridia* medium Lactate acetate

Rnf : ferredoxin:NAD réductase

SASP : small acid soluble spore protein

t_{absmax} : Temps atteint à la vitesse maximale d'absorbance (h)

T_{am}, t_{amax} : Temps atteint à la vitesse maximale d'acidification (h)

TB : Tétrazolium bleu

THL : thiolase

t_{lat} : temps de latence avant germination (h)

t_{min} : temps ou la valeur E_h est la plus basse (h)

T_{rm}, t_{rmax} : Temps atteint à la vitesse maximale de réduction (h)

TTC : Chlorure de triphényltétrazolium

TV : Tétrazolium violet

UHT : Upérisation à haute température

V_{absmax} : Vitesse maximale d'absorbance (abs.h⁻¹)

V_{am}, V_{amax} : Vitesse maximale d'acidification (Unités pH. h⁻¹)

V_{rm} V_{rmax} : Vitesse maximale de réduction (mV.h⁻¹)

WST8 : Water soluble tétrazolium 8

XTT : Chlorure de 2,3,5-triphényl-2H-tétrazol-3-ium

Table des matières

Remerciements	4
Abréviations	6
Table des Figures	15
Table des tableaux	21
Introduction	25
Contexte de la thèse.....	28
Bibliographie.....	29
Chapitre 1: Le défaut du gonflement tardif.....	2
I. Définition	2
II. Impacts économiques	2
III. Impacts organoleptiques sur le fromage.....	3
IV. Origine.....	5
A.Contamination par <i>Clostridium</i> sp. du groupe butyrique	5
B.Apparition du défaut du gonflement tardif au cours d'une fabrication et phénomène lié aux spores et cellules végétatives.....	5
C.Répartition des espèces de <i>Clostridium</i> dans les fromages atteints du défaut de gonflement tardif	6
D.Effet synergique entre les espèces de <i>Clostridium</i>	7
E.Apparition du défaut de gonflement tardif : Dépendant de la souche ?.....	7
F. Vecteur de contamination.....	8
1. Hygiène des animaux du cheptel	8
2. Fourrage et ensilage	8
V. Stratégie de contrôle préventif et méthode de lutte contre les bactéries sporulées	10
A.Bonnes pratiques laitières.....	10
B.Prévention ou inhibition au cours du procédé de fabrication fromagère	10
1. Préparation du lait	10
2. Additifs	11

3.	Contrôle des paramètres de fabrication et d'affinage	12
4.	Modélisation	13
C.	Nouvelles méthodes d'identification et de détection	13
D.	Nouvelles méthodes de lutttes	14
Chapitre 2: <i>Clostridium tyrobutyricum</i> : Sporulation, germination et métabolisme.....		16
I.	Généralités.....	16
II.	La sporulation.....	17
III.	La germination	20
IV.	La fermentation butyrique	26
A.	Généralités.....	26
1.	L'hétérogénéité de la fermentation butyrique : Exemple <i>C. acetobutylicum</i> , <i>C. butyricum</i> et chez <i>C. kluyveri</i>	28
2.	Le schéma métabolique de la fermentation butyrique chez <i>C. tyrobutyricum</i>	32
3.	L'équilibre Redox intracellulaire : la NADH : Ferrédoxine oxydoréductase.....	33
B.	La fermentation butyrique à partir du lactate	37
Chapitre 3: Potentiel d'oxydoréduction		43
I.	Théorie	43
A.	Mesure du E_h	44
1.	Sonde.....	44
2.	Sels de tétrazolium	46
II.	Évolution du E_h dans les produits laitiers fermentés.....	48
III.	Différentes méthodes pour moduler le potentiel redox dans les matrices lactières	50
A.	L'impact de l'activité réductrice microbienne sur le E_h	50
1.	Les bactéries lactiques	50
2.	Les bactéries d'altération	55
B.	Molécules à fort potentiel d'oxydoréduction	55
C.	Électro- réduction et température	55

D.Gaz	56
E. Impact de la modulation du E_h sur les produits laitiers et les microorganismes	56
1. Amélioration rhéologique et organoleptique	56
2. Impact du E_h sur la réponse génétique et sur la réorientation des flux métaboliques chez les microorganismes.....	57
IV. Objectifs de la thèse	59
A.Sélection de la souche de <i>Clostridium tyrobutyricum</i> et des microflores lactiques réductrices	60
B.Étude de l'impact du potentiel de réduction des bactéries lactiques sur le défaut de gonflement tardif en fabrication pilote.....	61
C.Étude à l'échelle laboratoire des effets de l'environnement redox sur <i>Clostridium</i> sp....	61
Matériels et méthodes.....	63
I. Généralité	65
II. Souches bactériennes.....	65
A.Stockage des souches	66
B.Pré-cultures et ensemencement en fermenteur continu.....	66
C.Production et purification de spores de <i>Clostridium tyrobutyricum</i>	67
D.Matériels d'acquisition, calibration vérification et nettoyage des sondes E_h et de pH	68
E. Calcul du E_h et E_{h7}	68
F. Préparation d'aliquotes « prêt à l'emploi » de bactéries lactiques pour des ensemencements sur gélose ou liquide.....	69
G.Analyse des acides organiques	70
H.Analyses statistiques	71
III. Étude de l'impact de bactéries réductrices sur le développement de <i>C. tyrobutyricum</i> en fromagerie	71
A.Sélection des bactéries lactiques réductrices.....	71
1. Méthode de screening ORCA	71
2. Criblage Citrate positif ou négatif.....	72

3.	Criblage de production de bactériocine	72
4.	Screening de la capacité acidifiante des lactocoques.....	72
5.	Mesure de l'activité de réduction dans le lait par la méthode PORA	72
6.	Élaboration de la méthode de criblage ABRA.....	73
B.	Fabrications fromagères	76
1.	Plan expérimental des fabrications	76
2.	Technologie fromagère	78
3.	Suivis analytiques	80
IV.	Étude de l'impact du E_h sur <i>C. tyrobutyricum</i> en laboratoire	85
A.	Effet du E_h sur la germination	85
1.	Méthode de culture et modulation du E_h du milieu	85
2.	Suivi de croissance et analyse des acides organiques	86
B.	Effet du E_h sur l'orientation des flux métabolique.....	86
1.	Séquençage du génome de <i>C. tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237.....	86
2.	Recherche bio-informatique.....	87
C.	Fermentations continues et modulation du E_h par les gaz.....	89
1.	Construction de la matrice des flux	89
2.	Équation des équilibres redox, recouvrement des cofacteurs et bilan ATP.....	91
D.	Analyse des flux métaboliques en fonction du redox.....	92
1.	Milieu de culture	92
2.	Fermenteur continu	92
3.	Analyses des acides organiques	93
4.	Analyses microbiologiques	93
	Résultats	94
	Chapitre 1: Sélection de 4 souches de bactéries lactiques réductrices intervenant au cours de la fabrication fromagère	96
I.	Contexte	96

II.	Sélection des souches réductrices de bactéries lactiques pour les fabrications fromagères type pâte pressée.....	99
	A.Sélection des souches de lactocoques	99
	1. Présélection de souches de <i>Lactococcus lactis</i>	99
	2. Sélection des souches de <i>L. lactis</i> sur la base de leur activité réductrice :	101
	B.Sélection des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs.....	105
	C.Étude de l'activité réductrice de bactéries sélectionnées en culture mixte ou en culture pure.....	108
III.	Élaboration d'une nouvelle méthode de mesure de l'activité réductrice par absorbance	110
	A.Approche de mesure par fluorescence.....	110
	B.Approche mesure par absorbance.....	112
	1. Élaboration d'un milieu spécifique pour bactéries lactiques	112
	2. Choix du sel de tétrazolium et validation de la méthode de criblage	117
Chapitre 2: Étude de l'activité réductrice de bactéries lactiques en fabrication fromagère		125
I.	Contexte	125
II.	Standardisation du lait avant fabrication	129
III.	Contrôle microbien du lait après pasteurisation et ensemencement avec des spores de <i>Clostridium</i>	129
IV.	La fabrication : Étape en cuve jusqu'au démoulage.....	131
	A.Ensemencements bactériens : Levain lactiques (starters) et bactéries lactiques réductrices	132
	A.Analyse des paramètres pH, température et teneur O ₂ dissous	134
	B.Analyse des cinétiques de réduction des différentes modalités	137
V.	Étape Affinage.....	139
	A.Analyse des paramètres d'extrait sec et du taux NaCl/ Extrait sec des fromages.....	139
	B.Analyses microbiologiques, des acides organiques et scanners au cours de l'affinage .	140

Chapitre 3: Effet du potentiel redox sur la germination et/ou les flux métaboliques chez <i>C. tyrobutyricum</i>	151
I. Contexte	151
II. Séquençage du génome de la souche <i>Clostridium tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237	153
III. Études bio-informatiques et flux métaboliques.....	156
A.Sporulation	156
B.Germination.....	157
C.Métabolisme de la fermentation butyrique à partir du glucose	159
IV. Identification du mécanisme impliqué dans l'oxydation du lactate et validation avec une approche de flux métaboliques.....	169
V. Effet du pH et d'un potentiel redox réducteur sur la germination et/ou sur l'orientation des flux métaboliques chez <i>C. tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237	188
VI. Impact du potentiel redox sur l'orientation des flux métaboliques chez <i>C. tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237	191
Discussion générale.....	194
I. Une modulation du E_h par les gaz d'un milieu modèle pour étudier son impact sur <i>C. tyrobutyricum</i>	196
II. Une modulation du E_h par les bactéries lactiques d'un fromage type Emmental pour étudier son impact sur <i>C. tyrobutyricum</i>	201
Valorisation des travaux.....	205
Articles	205
Communications.....	205
Références	207

Table des figures

Figure 1 : Scanner d'un fromage type emmental présentant des symptômes de DGT. Image scanner issue de cette thèse.	2
Figure 2 : Représentation des différentes morphologies de <i>Clostridium</i> au cours de chacune des étapes de la sporulation (Al-Hinai et al., 2015).	18
Figure 3 : (A) représentation de la cascade de régulation lors de la sporulation (B) mécanisme de la sporulation d'un point de vue moléculaire. Ces deux schémas sont retrouvés chez <i>C. acetobutylicum</i>	19
Figure 4 : Représentation des mécanismes de germination retrouvés chez <i>Bacillus subtilis</i> , <i>C. difficile</i> et <i>C. perfringens</i> ; AGFK: mélange de L-asparagine, fructose, glucose et KCl ; GerXX : différents types de récepteurs à germinant appartenant au Ger-type; en rouge: enzyme de lyse cortex (Olguín-Araneda et al., 2015).	21
Figure 5 : Représentation des différentes couches d'une spore de <i>Bacillus subtilis</i> et des récepteurs Ger-type dans la membrane interne (Bhattacharjee et al., 2016).....	22
Figure 6 : Représentation de la configuration des sous-unités A et B des récepteurs du type Ger (Moir & Cooper, 2015).	23
Figure 7 : Représentation des deux mécanismes activant les enzymes lysant le cortex chez <i>Bacillus subtilis</i> et <i>C. difficile</i> (Francis et al., 2015).	24
Figure 8 : Représentations de la voie métabolique de la fermentation butyrique vue par Gottschalk. (A) Edition 1979 (B) Edition 1986. 1 : système de phosphotransférase et la voie métabolique d'Embden-Meyerhof ; 2 : pyruvate :ferrédoxine oxydoréductase ; 3 : hydrogénase ; 4 : acétyl-CoA-acétyltransférase ; 5 : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; 6 : crotonase ; 7 : butyryl-CoA déshydrogénase ; 8 : CoA-transférase ; 9 : phosphotransacétylase ; 10 : acétate kinase (Gottschalk, 1979 ; 1986).	27
Figure 9 : Branche de l'acétate dans la voie métabolique de la fermentation butyrique chez les <i>Clostridium</i> appartenant au groupe des producteurs de butyrate. Pta : Phosphotransacétylase / Ack : Acétate kinase.....	29
Figure 10 : Organisation de transcription des gènes codant pour les enzymes Crt, Bcd, Hbd et un complexe EtfAB retrouvés chez <i>C. acetobutylicum</i> (A) et <i>C. kluyveri</i> (B) (Bennett & Rudolph, 1995; Hu et al., 2016).....	30
Figure 11 : Schéma du complexe de la butyryl-CoA déshydrogénase et Etf (Li et al., 2008).	31

Figure 12 : Schéma général de la voie métabolique de la fermentation butyrique retrouvée chez *C. kluyveri*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* & *C. tyrobutyricum*. Flèches noires : enzymes communes à l'ensemble des *Clostridium* ; Flèches bleues : communs entre *C. butyricum* et *C. acetobutylicum* ; Flèches vertes : retrouvées chez *C. butyricum*, *C. kluyveri* et *C. tyrobutyricum* ; Flèches jaunes : communes chez *C. kluyveri* et *C. tyrobutyricum*, pfor : pyruvate : ferrédoxine oxidoreductase ; Hyd : hydrogenase ; Nfor : NADH ferrédoxine oxidoreductase ; Pta : Phosphoransacétylase ; Ack : Acétate kinase ; Thl : thiolase ; Hbd : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; Bcd : butyryl-CoA déshydrogénase ; Ctf : CoA-transférase ; Ptb : Phosphotransbutyrylase ; Buk : Butyrate kinase..... 36

Figure 13 : Représentation de la voie métabolique de la fermentation butyrique avec deux substrats différents (McSweeney & Sousa, 2000)..... 37

Figure 14 : Schéma métabolique de la fermentation butyrique à partir du lactate et de l'acétate. 1, lactate déshydrogénase ; 2, pyruvate:ferrédoxine oxydoréductase ; 3, hydrogénase ; 4, acétate kinase ; 5, phosphotransacétylase ; 6, Acyltransférase (Thiolase) ; 7, 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; 8, crotonase ; 9, butyryl-CoA déshydrogénase ; 10, phosphotransbutyrylase & 11, butyrate kinase (Kim & Gadd, 2008). 39

Figure 15 : Modèle proposé de la bifurcation d'électrons au niveau complexe lactate déshydrogénase/ EtfAB (Weghoff et al., 2015). 41

Figure 16 : Différents gènes impliqués dans le complexe LDH/EtfAB chez *A. woodii*, *C. botulinum Ba4* et *C. ljungdahlii DSM 13528* (Weghoff et al., 2015). 41

Figure 17 : Structure chimique de différents sels de tétrazolium (Berridge et al., 2005). MTT : Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; NBT : Nitro blue Tetrazolium Chloride ; PMS: phenazinium methylsulfate ; MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium ; XTT : sodium(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide ; WST : Water Soluble Tetrazolium 46

Figure 18 : Réduction d'un sel de tétrazolium en sa forme formazan : exemple du chlorure de triphényltétrazolium (TTC) (França-Neto & Krzyzanowski, 2019). 47

Figure 19 : Cinétique du E_h , du pH et de la T °C au cours de la fabrication en cuve et l'affinage de différents types de fromages (A) Cheddar, (B) Gouda, (C) Emmental & (D) Camembert. (Triangles : E_h (mV) ; Losanges : pH ; Carrés : température (T °C) (Caldeo & McSweeney, 2012). 49

Figure 20: Cinétique de E_h et pH et leur dérivé d'une culture de *Lactococcus lactis* dans du lait. (V_{am} : Vitesse d'acidification maximale ($UpH.h^{-1}$); T_{am} : temps pour atteindre la vitesse

maximale d'acidification (h); $V_{r,m}$: Vitesse de réduction maximale ($mV \cdot h^{-1}$); $T_{r,m}$: Temps pour atteindre la vitesse maximale de réduction (h)) (Cachon et al., 2002).	51
Figure 21 : Exemple de cinétique de réduction dans du lait écrémé. Δ max: Différence entre deux mesures maximales (mV) ; t^* : le temps à Δ max (h) ; $E_{h\ min}$: Valeur E_h minimale de la cinétique (mV) ; t_{min} : le temps à la valeur E_h minimales (h) (Brasca et al., 2007).	52
Figure 22 : Cinétique de potentiel d'oxydoréduction chez différentes espèces de bactéries lactiques dans du lait écrémé (Brasca et al., 2007).	53
Figure 23 : Schéma résumant les fonctions cellulaires impliquées dans l'activité réductrice des <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> . P-SH: Thiols; P-SSP: thiols oxydés; Trx-TrxR: système thioredoxin-thioredoxine réductase; NoxAB: NADH déshydrogénase membranaire composée de deux sous-unités, NoxA et NoxB ; NoxE : NADH oxydase ; AhpR : le complexe Alkyl hydroperoxide réductase ; Ox : molécule oxydée ; Red : molécule réduite ; MK : Menaquinone ; MKH_2 : menaquinol ; ? : hypothèse (Roussel et al., 2022).	54
Figure 24 : Diagramme de fabrication type Emmental (MG : Matière grasse ; MP : Matière protéique).	79
Figure 25 : Fromages type Emmental avec les sondes en PCV au cours de l'affinage.	82
Figure 26 : Montage type des flacon Schott utilisé pour étudier l'impact du E_h sur la germination chez <i>C. tyrobutyricum</i>	85
Figure 27 : Arbre de décision en fonction des résultats obtenus en bio-informatiques. Blastp : comparaison entre différentes séquences protéiques ; Blastn : comparaison entre différentes séquences nucléiques.	87
Figure 28 : Schéma de l'installation du fermenteur continu. ORP : sonde redox ; MRU : système d'acquisition et de contrôle du pH ; du poids ; du redox et de l'agitation du fermenteur.	93
Figure 29 : Répartition souches de <i>L. lactis</i> de la banque de souche ECLAIR en fonction de leur score obtenu avec la méthode ORCA. Chaque score est la moyenne de 3 répétitions pour chacune des souches.	99
Figure 30 : Cinétiques de réduction et d'acidification de <i>L. lactis</i> 4F33 (bleu) et 8F8 (rouge) en milieu lait UHT écrémé à 30 °C. Courbes pleines : cinétiques de réduction (E_{h7}) ; Courbes pointillées : cinétiques d'acidification (pH).	102
Figure 31 : Cinétiques de réduction et d'acidification de <i>L. lactis</i> 4F33 (bleu), 8F8 (rouge) et du ferment commercial (orange) en milieu lait UHT écrémé avec un cycle de température type Emmental. Courbes pleines : cinétiques de réduction E_{h7} ; Courbes pointillées : cinétiques de température (°C).	104

Figure 32 : Répartition des souches de lactobacilles hétérofermentaires de la collection de souche DIVCO en fonction de leur score obtenu avec la méthode ORCA. Chaque score est le résultat de 3 répétitions pour chacune des souches.	106
Figure 33 : Cinétiques de réduction des souches de <i>L. rhamnosus</i> F9 5 60 (bleu foncé), F10 7 64 (bleu clair) et F9 5 27 (vert clair) en milieu lait UHT écrémé avec un cycle de température type Emmental (vert). Courbes pleines : Cinétiques de réduction E_{h7} ; courbe pointillée : cinétique de température.	107
Figure 34 : Cinétique de réduction du CTC en formazan par <i>L. paracasei</i> ATCC 334 et <i>L. lactis</i> 2F21 en milieu lait gélosé (MTA), n=3.....	111
Figure 7 : Observations visuelles des activités réductrices sur milieu MTA supplémenté en CTC. Photo de gauche : les 3 tubes à gauche sont respectivement le MTA, le MBA et le milieu optimale en présence de <i>L. paracasei</i> ATCC 334 et les 3 tubes à droite les mêmes, mais en présence de <i>L. lactis</i> 2F21. Pour la photo de droite, les lignes de puits blanc sont le MTA et les puits jaune et violet sont le MBA. Les puits à gauche sontensemencés avec <i>L. paracasei</i> ATCC334 et ceux à droite avec <i>L. lactis</i> 2F21.	111
Figure 36 : Résultats visuels de la réduction du sel de tétrazolium (TTC) dans chacun des milieux en présence de chacune des espèces. BP : milieux avec présence de bromocrésol pourpre.	113
Figure 37 : Cinétiques de croissance des souches <i>L. paracasei</i> ATCC 334 (A), <i>L. lactis</i> 2F21(B), <i>L. bulgaricus</i> ATCC 20081 (C) et <i>S. thermophilus</i> FTS2 (D) dans le milieu SELL en présence de différentes concentrations de lait UHT écrémé (n=3).	115
Figure 38 : Impact de différentes valeurs de pH sur la réduction du sel de tétrazolium WST8. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.....	118
Figure 39 : Cinétiques de réduction avec la méthode ABRA (A) et la méthode PORA (B) de différents starters commerciaux appartenant au genre lactocoque, n=3.	119
Figure 40 : Dénombrement des flores mésophiles, des Coliformes et des <i>Clostridia</i> avant et après pasteurisation. LB_FM : Flore mésophile avant pasteurisation ; LP_FM : Flore mésophile après pasteurisation ; LB_Coliformes : Coliformes avant pasteurisation ; LP_Coliformes : Coliformes après pasteurisation ; LB_Clostridium : <i>Clostridium</i> avant pasteurisation ; LP_Clostridium : <i>Clostridium</i> après pasteurisation.	130
Figure 41 : Cinétiques de la température (A) et de l'O ₂ dissous (B) au cours de la fabrication fromagère Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey point par point.....	135
Figure 42 : Cinétiques de réduction au cours de la fabrication fromagère. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey point par point.....	137

Figure 43 : Évolution des populations de lactobacilles réducteurs au cours de l'affinage. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.....	144
Figure 44 : Évolution du butyrate au cours au cours l'affinage pour les différentes modalités. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.....	146
Figure 45 : Évolution du citrate, du butyrate et du propionate en cours d'affinage entre J+24 et J+55.	148
Figure 46 : Arbre de décision en fonction des résultats obtenus en bio-informatique.....	152
Figure 47 : Métabolisme du butyrate d'après le site KEGG. La voie étudiée est celle en jaune. Chaque encadré vert représente une enzyme présente chez <i>C. tyrobutyricum</i> ; 2.3.1.54 : pyruvate-formate lyase ; 1.2.7.1 : pyruvate-ferrédoxine/flavodoxine oxydoréductase ; 2.3.1.9 : acétyl-CoA acétyltransférase ; 1.1.1.157 : 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase ; 4.2.1.17 : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydratase ou crotonase ; 1.3.8.1 : butyryl-CoA déshydrogénase...	160
Figure 48 : Représentation de la fermentation butyrique (Yu et al., 2011). Pfor : pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase ; hyda : hydrogénase ; pta : phospho-transacétylase ; ack : acétate kinase ; ctf : CoA-transférase ; thl : acétyl-CoA acétyltransférase.	161
Figure 49 : Schéma montrant la présence d'un complexe Rnf et d'une l'ATPase (Lee et al., 2016).....	162
Figure 50 : Résultats de la recherche bio-informatique sur le complexe Rnf chez <i>C. tyrobutyricum</i> KCTC 5387.....	162
Figure 51 : Schéma récapitulatif de la fermentation butyrique : Pfor : pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase ; hyd : hydrogénase ; pta : phospho-transacétylase ; ack : acétate kinase ; cat : CoA-transférase ; thl : acétyl-CoA acétyltransférase ; HBD : 3-hydrobutyryl-CoA déshydrogénase ; crt : crotonase ; bcd : butyryl-CoA déshydrogénase ; Rnf : complexe Rnf.	163
Figure 52 : Modèle hypothétique de la bifurcation d'électrons du complexe butyryl-CoA déshydrogénase/ EtfAB chez <i>C. kluyveri</i> (Li et al., 2008).....	164
Figure 53 : Différents gènes impliqués dans le complexe BCD/EtfAB chez <i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387. Bcd1 : butyryl-CoA DH, EtfB1 : Electron transport flavoprotein B, EtfA1 : Electron transport flavoprotein B.....	164
Figure 54 : Région génomique chez <i>C. kluyveri</i> regroupant le cluster de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la fermentation butyrique (Wang et al., 2010).	165
Figure 55 : Modèle hypothétique de la bifurcation d'électrons du complexe NfnA et B retrouvé chez <i>C. kluyveri</i> (Buckel & Thauer, 2013).....	165

Figure 56 : Région génomique chez *C. tyrobutyricum* KCTC 5387 retrouvant le cluster de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la fermentation butyrique. crt : crotonase ; hdb : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase NADPH dépendante ; bcd1 : butyryl-CoA déshydrogénase ; CTK_C16420 : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase NADH dépendante.

..... 166

Figure 57 : Schéma proposé pour la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* à partir des résultats d'analyse bio-informatique. Pfor : pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase ; hyd : hydrogénase ; pta : phospho-transacétylase ; ack : acétate kinase ; cat : CoA-transférase ; thl : acétyl-CoA acétyltransférase ; HBD1 : NADH dépendant 3-hydrobutyryl-CoA déshydrogénase ; HBD1 : NADPH dépendant 3-hydrobutyryl-CoA déshydrogénase ; NfnAB : complexe NfnAB ; crt : crotonase ; bcd /etfAB: butyryl-CoA déshydrogénase avec le complexe EtfAB ; Rnf : complexe Rnf. 167

Figure 58 : Surface de réponse de l'impact du E_{h7} et pH sur le temps de latence avant germination des spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237. 190

Figure 59 : Schéma métabolique de l'oxydation du lactate en présence d'acétate chez *C. tyrobutyricum* avec les vitesses flux métaboliques sous différentes conditions de redox. En bleu: CRB et en rouge : CRH ; Flux exprimés en $\text{mM}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g} [\text{poids sec}]^{-1}$ 192

Table des tableaux

Tableau 1 : Composés volatils et leur flaveur issus d'une contamination de fromage par des spores de <i>C. beijerenckii</i> (Garde et al., 2013).	4
Tableau 2 : Espèces bactériennes.....	65
Tableau 3 : Composition du milieu RCMLA.	66
Tableau 4 : Composition du milieu RCMG.....	67
Tableau 5 : Moyenne des coefficients α obtenue à partir des différents milieux expérimentaux.	69
Tableau 6 : Corrélation entre le suivi de DO_{600nm} et les concentrations bactériennes. Equation : Equation obtenue avec le suivi de croissance bactérienne DO_{600nm} en fonction des $UFC.mL^{-1}$; R^2 : R^2 de l'équation ; Théorique : $UCF.mL^{-1}$ calculé à partir des équations pour $DO = 1$; Mesures expérimentales : Dénombrement à $DO = 1$	70
Tableau 7 : Cycle de température lors d'une fabrication de fromage type Emmental.	73
Tableau 8 : Formules des différents milieux de criblage pour ABRA.	75
Tableau 9 : Plan expérimental détaillé des fabrications fromagères. (Lc : Lactocoques ; Lb : Lactobacille; R : réduit Rapidement ; L : réduit Lentement ; Témoin positif : fabrication sans bactérie réductrice ; Témoin négatif : fabrication sans bactéries lactiques réductrices sélectionnées ni de spores de <i>C. tyrobutyricum</i>).	77
Tableau 10 : Plan des analyses réalisées au cours des fabrication et affinage des fromages type Emmental.	81
Tableau 11 : Méthode ORCA appliquée aux souches de <i>L. lactis</i> 8F8, 4F33, 4F19 et 3F24 (N= 3). ;BT : Tetrazolium bleu ; TTC : Tetrazolium Chloride ; VT : Tetrazolium violet ; MA+BP : Lait gélosé avec bromocrésol pourpre ; M17 : milieu bactérien.....	100
Tableau 12 : Activité protéolytique, production de bactériocines et capacité à métaboliser le citrate des souches 8F8, 4F33, 1F19 et 3F24. n=3.	101
Tableau 13 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de <i>L. lactis</i> 8F8 et 4F33. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.....	103
Tableau 14 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de <i>L. lactis</i> 8F8 et 4F33. F : cycle température type Emmental ; O : 30 °C. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.....	104
Tableau 15 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de <i>L. lactis</i> 4F33 et du mix des ferments <i>Lactobacillus helveticus</i> LHB-02 / <i>Streptococcus thermophilus</i> TA60-1	

en cycle de température type Emmental. N=3 et l'analyse statistique Krustal Wallis $p=0,05$	105
Tableau 16 : Screening des souches <i>L. rhamnosus</i> F9 5 60, F10 7 64 et F9 5 27 avec ORCA (n= 3 ; BT). Tetrazolium bleu ; TTC : Tetrazolium Chloride ; VT : Tetrazolium violet ; MA+BP : Lait gélosé avec bromocrésol pourpre ; MRS : milieu bactérien.	106
Tableau 17 : Screening des souches <i>L. rhamnosus</i> F9 5 60, F10 7 64 et F9 5 27 sur leur activité protéolytique, la production de bactériocine et leur capacité à métaboliser le citrate. n=3. ..	107
Tableau 18 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de <i>L. rhamnosus</i> F9 5 60, F10 7 64 et F9 5 27 en cycle de température type Emmental. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.	108
Tableau 19 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de <i>L. rhamnosus</i> et <i>L. lactis</i> sélectionnées et les combinaisons lactocoques et lactobacilles en cycle de température type Emmental. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.	109
Tableau 20 : Résultats des souches <i>L. paracasei</i> ATCC 334 et <i>L. lactis</i> 2F21 sur MTA supplémenté en CTC. MTA: Milieu Tétrazolium Lait ; MBA: Milieu Lait avec du bromocrésol pourpre ; Milieu optimal : MRS pour ATCC 334 et M17 pour 2F21, n=3.....	111
Tableau 21 : Concentrations initiales et finales bactériennes après 16 heures d'incubation à température optimale. SL' : Solution Lactose ; SL : Solution Lactose Tampon ; SELL' : Solution Lactose Extrait de Levure ; SELL : Solution Lactose Extrait de levure Tampon. n=3.	113
Tableau 22 : Valeurs des μ_{\max} et DO_{\max} obtenues pour chacune des souches testées dans le milieu SELL en présence de différentes concentrations de lait UHT. μ_{\max} : taux de croissance maximal et DO_{\max} : valeur maximale de DO à 600 nm. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey ; lecture en colonne.....	116
Tableau 23 : Valeurs des descripteurs de cinétiques de réduction obtenues avec les méthodes PORA et ABRA pour des starters. $V_{r\max}/t_{r\max}$ pour PORA et $V_{abs\max}$ et $t_{abs\max}$ pour ABRA. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey en ligne.	120
Tableau 24 : Valeurs des descripteurs obtenues avec les méthodes PORA et ABRA pour des souches pures. $V_{r\max}/t_{r\max}$ pour PORA et $V_{abs\max}$ et $t_{abs\max}$ pour ABRA. $V_{abs\max}$: Vitesse d'absorbance maximale ; $t_{abs\max}$: temps à la vitesse d'absorbance maximale ; $V_{r\max}$: Vitesse de réduction maximale ; $t_{r\max}$: temps à la vitesse de réduction maximale ; $E_{h7\min}$: Valeur minimal E_{h7} ; Abs_{\max} : valeur d'absorbance la plus haute. n Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.....	122

Tableau 25 : Analyses des laits avant fabrication. MG : Matière grasse ; MAP : Matière azotée protéique ; R : ratio de MG/MAP ; ES : Extrait Sec.	129
Tableau 26 : Dénombrement des flores mésophiles et de <i>Clostridium</i> après pasteurisation. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture en colonne.	131
Tableau 27 : Dénombrement des starters et bactéries lactiques réductrices après ensemencement en cuve. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture en colonne.	133
Tableau 28 : Paramètres des cinétiques d'acidification des fromages et valeurs pH en début et fin de fabrication. pH _i : pH du lait ; pH _{min} : pH en fin de fabrication ; V _a max : Vitesse maximale d'acidification ; t _a max : Temps pour atteindre la vitesse maximale. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture par colonne.	136
Tableau 29 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des fromages. E _{h7 min} : E _{h7} en fin de fabrication ; V _r max : Vitesse maximale de réduction ; t _r max : Temps pour atteindre la vitesse maximale. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture par colonne.	138
Tableau 30 : Valeurs des Extraits secs au cours de l'affinage et du ratio NaCl/Extrait sec à J+72. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.	139
Tableau 31 : Dénombrements des starters, des spores et lactobacilles hétérofermentaires à J+1 d'affinage. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture en colonne.	141
Tableau 32 : Evolutions des populations bactériennes au cours de l'affinage. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture par ligne.	143
Tableau 33 : Dénombrement des lactobacilles réducteurs des modalités LcR+LbL et LcR+LbR au cours de l'affinage. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture en colonne. .	144
Tableau 34 : Suivi de l'évolution morphologique des fromages par scanner (scan par le dessus et transversal). Les tunnels transversaux sont les trous de sondes pour les prélèvements. ...	149
Tableau 35 : Blastn entre les séquences nucléiques sigmas et spo0A retrouvées chez <i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824 ou <i>C. botulinum</i> ATCC 3502 et le génome de <i>C. tyrobutyricum</i>	156
Tableau 36 : Résultats des Blastn/p avec <i>C. tyrobutyricum</i> . CLEs : Enzyme lysant le cortex ; KCTC5387 : Génome souche type de <i>C. tyrobutyricum</i> ; IM : membrane interne.	158
Tableau 37 : Résultats des comparaisons bio-informatiques entre <i>C. tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237 et la souche type <i>C. tyrobutyricum</i> KCTC 5387.	168
Tableau 38 : Impact du E _h sur la germination de <i>C. tyrobutyricum</i> . C _i : concentration initiale en spores ; E _{h7} : Valeur E _{h7} initiale ; pH _i : pH initial ; t _{lat} : temps de latence avant germination. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture par colonne.	189

Tableau 39 : Résultats des fermentations en culture continue de <i>C. tyrobutyricum</i> dans le milieu RCMLA avec le lactate et l'acétate comme seule source de carbone et un pH constant (5,75).	191
Tableau 40 : Comparaison des flux métaboliques d'une culture de <i>C. tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237 sous différentes conditions redox. Les valeurs de flux métabolique sont exprimées en mM.h ⁻¹ .g [poids sec] ⁻¹ Test ANOVA n=3, α=0,05, comparaison tukey. Lecture par ligne... 193	193
Tableau 41 : Comparaison de la technique ABRA avec les autres techniques de la littérature.	202

Introduction

Les bactéries du genre *Clostridium*, et plus particulièrement *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* et *C. beijerinckii* réalisent une fermentation butyrique à l'origine de défauts dans la fabrication de nombreux fromages. Le défaut se caractérise par une dilatation excessive des fromages, due à la production de CO₂ et d'H₂ conduisant à un phénomène de gonflement tardif. Cette production de gaz peut aller jusqu'à fissurer la croûte. L'acide butyrique produit peut également modifier négativement le profil sensoriel du fromage. Le caractère tardif et destructif de cet accident le rend particulièrement redoutable.

C. butyricum et *C. tyrobutyricum* sont des bactéries anaérobies strictes, présentes initialement dans le lait sous forme sporulée (spores thermorésistantes), l'accident est donc fortement dépendant de la qualité microbiologique des laits (recensement jusqu'à 97% des laits contaminés parmi 55 fromageries (Garde et al., 2011)). L'alimentation des bovins à base d'ensilage augmente le risque d'accident par la microflore butyrique (Brändle et al., 2016).

À l'heure actuelle, il n'existe aucune méthode fiable et rapide de prévenir ce défaut. La méthode actuellement utilisée pour contrôler la concentration des spores butyriques dans le lait est une approche de dénombrement microbiologique connue comme le nombre le plus probable (NPP), dont il existe plusieurs variantes (Brändle et al., 2017). Les inconvénients de cette méthode sont : le temps d'incubation relativement long, qui est de 7 jours, le seuil de détection et le volume d'échantillonnage. Cependant, il existe de nouvelles méthodes de biologie moléculaire (Cremonesi et al., 2012; Bassi et al., 2013), immunochimiques (Bédouet et al., 1998; Lavilla et al., 2008, 2009; Gómez-Torres et al., 2018), microbiologiques (Abgrall et al., 1985; Brändle et al., 2017, 2018; D'Incecco et al., 2018) ou par microscopie (Bassi et al., 2009; D'Incecco et al., 2018) qui ont été proposées comme alternatives dans la littérature scientifique. Néanmoins, ces dernières sont onéreuses et parfois lourdes à mettre en œuvre pour les industriels et demandent des investissements importants au niveau du matériel et des formations à prévoir pour les utiliser. L'industrie peine donc à trouver une réelle alternative pour prévenir ce phénomène.

La difficulté additionnelle concerne la nature de la bactérie à l'origine du défaut de gonflement tardif. En effet, *C. tyrobutyricum* est une bactérie anaérobie stricte et sporulée. De plus, il a été démontré dans plusieurs publications que le nombre de spores présentes dans un échantillon de lait n'influe pas sur le risque d'apparition du phénomène de gonflement tardif.

En ce qui concerne des techniques de lutte utilisées en industrie, aucune n'est efficace à 100% contre les spores de *Clostridium* :

- La technique de bactofugation (séparation centrifuge) permet de réduire la contamination en spores, mais pas complètement, d'autant que d'après certains auteurs, une faible quantité de spores dans le lait peut suffire à l'apparition d'accidents (Brändle et al., 2016).
- L'utilisation d'additif comme le lysozyme (activité muramidase active sur le peptidoglycane des bactéries à Gram positif) qui diminuerait la population de *Clostridia*, mais qui pourrait également avoir un effet favorisant la population de *C. butyricum* au détriment de *C. tyrobutyricum* (Bassi et al., 2015; Zucali et al., 2015; Brändle et al., 2016). Historiquement, les nitrates ont été également utilisés pour limiter la germination des spores, première étape de leur développement dans le produit favorisée par l'environnement anaérobie rencontré au cours de l'affinage des fromages (Devoyod et al., 1974; Korenekova et al., 2000). Mais cette pratique d'ajout d'additifs peut modifier leur écologie et atteindre la santé du consommateur.

En effet, certains fromages comme ceux bénéficiant d'une AOP obéissent à un cahier des charges interdisant l'emploi des composés chimiques précités, et de plus, la demande des consommateurs oriente l'industrie à limiter les conservateurs. Dans la bibliographie sont évoqués des risques d'allergie pour le lysozyme (Brändle et al., 2016), ainsi que son activité négative à forte dose sur la microflore lactique acidifiante (Brändle et al., 2016). Concernant les nitrates, ils peuvent conduire à la genèse de nitrosamines, molécules cancérigènes, ce qui a conduit les pouvoirs publics (EFSA) à recommander d'en limiter l'emploi (Brändle et al., 2016). Il est également mentionné l'effet négatif des nitrates sur une autre microflore technologique, les bactéries propioniques (Beresford et al., 2001) ; ces bactéries interviennent au cours de l'affinage de certains fromages et sont utilisatrices des lactates comme les *Clostridia* (McSweeney, 2004).

Différentes données de la littérature montrent un impact du processus (pH, concentrations en acides lactique et acétique, taux de sel, température, etc.) sur l'accident ; l'augmentation du taux de sel, l'absence de spores dans la saumure, et la diminution de la température d'affinage limitent l'accident dans la fabrication de Gouda (Su & Ingham, 2000). D'un autre côté, le projet Européen TeRiFiQ a montré que la diminution de 30% du taux de sel, bien que positif sur le plan nutritionnel, limitait le contrôle des microflores indésirables (Kerjean et al., 2014). Dans une synthèse sur l'affinage des fromages, McSweeney (2004) explique l'impact du procédé de salage (et notamment de la cinétique de diffusion du sel) sur la fréquence de l'accident dans le cas des produits saumurés.

Ainsi, de nouveaux leviers de contrôle sont nécessaires afin de limiter les accidents en fromagerie, et évoluer vers de nouveaux produits plus conformes aux demandes des consommateurs et du législateur (diminution des taux de sel, absence de nitrates, absence d'allergènes potentiels). Une voie de recherche concerne par exemple l'utilisation de microflore technologiques productrices de bactériocines. Cependant, ces bactéries lactiques productrices de bactériocines contre les bactéries butyriques sont non seulement plus sensibles aux bactériophages, mais inhiberaient également des microflore d'intérêts pour la production des fromages, les bactéries lactiques levains et non-levains (Bogovič Matijašić et al., 2007; Gómez-Torres et al., 2015; Brändle et al., 2016).

Contexte de la thèse

Le projet ANR Food-Redox (2012-2015) a montré qu'une nouvelle voie de recherche était envisageable ; elle concerne l'impact de l'activité réductrice de la microflore technologique (microflore lactique) sur la fermentation butyrique par *Clostridium* sp. Ainsi, il a été montré un impact de la microflore réductrice sur la consommation des lactates, la production de butyrate, et le défaut du gonflement tardif (résultats Food-Redox présentés par E. Beuvier et S. Gavoye en 2015, au Centre national interprofessionnel de l'économie laitière, représentant l'interprofession laitière nationale). Ces résultats restent cependant à approfondir. L'activité réductrice est l'aptitude d'une flore microbienne à abaisser le potentiel d'oxydoréduction (E_h) du milieu. Parmi les différentes microflore lactiques utilisées en technologie fromagère, on distingue des microflore très réductrices et des microflore peu réductrices, indépendamment de leur potentiel acidifiant (Brasca et al., 2007 ; Cachon et al., 2002). Ainsi ces résultats nous ont menés à poser deux questions de recherche :

- Quel est l'impact de l'activité réductrice de la microflore lactique sur la germination des spores et/ou sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium* (effet indépendant et effet d'interaction avec d'autres paramètres physicochimiques) ;
- Quel est l'impact de l'activité réductrice de la microflore lactique sur la distribution des flux métaboliques lors de la fermentation butyrique par *Clostridium* et ses conséquences sur la diminution de la production de gaz ?

Bibliographie

Chapitre 1 : Le défaut du gonflement tardif

Chapitre 2 : *Clostridium tyrobutyricum*

Chapitre 3 : Le potentiel d'oxydoréduction

Chapitre 1: Le défaut du gonflement tardif

I. Définition

Le défaut du gonflement tardif (DGT) est la cause majeure d'altération irréversible des fromages à pâtes pressées cuites et non cuites. Ce défaut survient plusieurs semaines après la fabrication en cuve lors de l'étape d'affinage. Son apparition varie en fonction du procédé d'affinage du fromage fabriqué. Il se caractérise par un changement apparent de la structure via un changement de la couleur et l'apparition de grosses ouvertures irrégulières, pouvant aller jusqu'au craquement de la croûte du fromage (Figure 1). À cela s'ajoute un changement de la flaveur avec un goût rance et une mauvaise odeur rendant le fromage impropre à la consommation. Le DGT est un des phénomènes des plus critiques dans l'industrie laitière, car son apparition ne peut pas être corrigée ; il concerne plusieurs types de fromages (majoritairement des fromages à pâte pressée cuite et non cuite), ce qui engendre un impact économique avec des pertes financières très importantes.

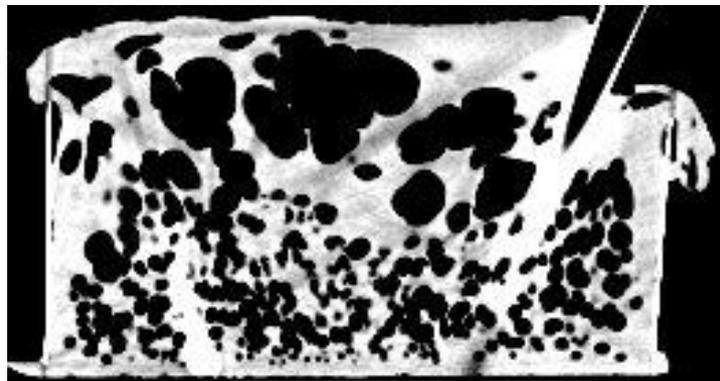


Figure 1 : Scanner d'un fromage type Emmental présentant des symptômes de DGT. Image scanner issue de cette thèse.

II. Impacts économiques

Les produits laitiers sont des aliments fortement ancrés dans l'alimentation mondiale. En 2018, le secteur des produits laitiers représentait plus de 30 % du marché mondial alimentaire. La production laitière mondiale a été évaluée à 843 millions de tonnes, soit une augmentation de 2,2 % par rapport à l'année 2017. Cette croissance s'explique principalement par l'expansion des productions dans les pays leaders (USA et EU) et aussi dans les pays émergents (Inde,

Pakistan, Argentine, Turquie, ...). Ce marché laitier se décompose en plusieurs segments; le fromage représentant le troisième segment le plus exporté dans le monde après le beurre et le lait. De plus, comparé à 2017, l'exportation de fromage a augmenté de + 0,8 %, et le premier exportateur est l'UE avec 832 000 tonnes produites.

Le DGT affecte habituellement des lots entiers de production de fromage de type pâte pressée cuite et non cuite, réduisant la valeur du produit et causant de graves pertes économiques pour les producteurs (Doyle et al., 2015).

Il existe très peu d'informations chiffrées sur les pertes économiques ou perte de rendement dues au DGT. Les rares données concernent les pertes de production du Grana Padano, à base de lait de vache, et du Machengo, à base de lait de brebis. De l'ordre de 15 % à 35 % des meules de fromage (0,63% de la production estivale) sont concernées par an, respectivement (Borreani & Tabacco, 2008; Garde et al., 2011).

Des données plus récentes, issues d'une enquête menée auprès de différents industriels laitiers par Alvenäs (2015), font l'état de perte de rendement allant de 2 à 30 % à l'année due au DGT soulignant de fait qu'il s'agit d'un problème majeur et toujours d'actualité en fabrication fromagère.

III. Impacts organoleptiques sur le fromage

Les fromages, développant le DGT, présentent une modification de leur texture et de leur couleur. L'accumulation de gaz dans le fromage par l'activité métabolique des *Clostridium* favorise la formation de grosses cavités irrégulières pouvant aller au craquement de la croûte. Ce phénomène est accompagné par l'apparition d'une saveur rance et d'un mauvais goût modifiant le profil aromatique. L'acide butyrique crée une saveur fermentée et acide désagréable du fromage ainsi qu'une odeur de rance (Goudkov & Sharpe, 1966). L'acide acétique donne un goût amer et une odeur âcre au fromage. Certaines espèces comme *C. beijerinckii* et *C. tyrobutyricum* peuvent développer d'autres composés volatils via un changement métabolique (Garde et al., 2013; Ávila et al., 2017). L'activité métabolique de ces dernières passe d'une phase acidogène avec la production du butyrate et d'acétate à une phase de solvant-génèse produisant d'autres composés volatils (Tableau 1).

Tableau 1 : Composés volatils et leur flaveur issus d'une contamination de fromage par des spores de *C. beijerenckii* (Garde et al., 2013).

Composés volatils	Flaveurs	Références
Butanal	Poivré et piquant	Barron et al., (2005)
2-Methylbutanal	Impur et dur	Dunn & Lindsay (1985)
Hexanal	Vert, herbacé	Barron et al., 2005
2-butanone	Caramel, éthéré et nauséabond	Curioni & Bosset 2002; Barron et al., 2005
2,3-Pentanedione	Huileux-beurré et piquant	Barron et al., 2005
3-Hydroxy-2-pentanone	Truffe	Curioni & Bosset 2002
2-Hydroxy-3-pentanone	Truffe	Curioni & Bosset 2002
2-Propanol	Vin et fruité	Barron et al., 2005
2-Butanol	Huile vineuse, fruitée	Barron et al., 2005
1-Propanol	Alcool, vin et sucré	Curioni & Bosset 2002; Barron et al., 2005
1-Methoxy-2-propanol	Composé inhabituel dans le fromage	-
1-Butanol	Vin et fruité	Barron et al., 2005
2-Methyl-1-butanol	Impur et dur	Dunn & Lindsay 1985
3-Methyl-1-butanol	Impur et dur	Dunn & Lindsay 1985
3-Methyl-3-buten-1-ol	Herbacé	Barron et al., 2005
1-Octanol	Note indescriptible	-
Acide acétique	Vinaigré et piquant	Curioni & Bosset 2002
Acide propionique	Gaz, brûlé et piquant	Curioni & Bosset 2002
Acide 2-Methylpropionique	Fruits moites, pourris et rances	Molimard & Spinnler 1996; Curioni & Bosset 2002
Acide butyrique	Rance, fécal et en sueur	Curioni & Bosset 2002
Acide 2-Methylbutyrique	Fruits moites, pourris et rances	Molimard & Spinnler 1996; Curioni & Bosset 2002
Ether d'ethyl	Composé inhabituel dans le fromage	-
Anhydride propionique	Composé inhabituel dans le fromage	-

Les fromages avec ce défaut montrent également un pH plus élevé par rapport à des fromages non contaminés en raison de l'activité métabolique des *Clostridium* (Le Bourhis et al., 2007; Gómez-Torres et al., 2015; D'Incecco, Pellegrino, et al., 2018)

IV. Origine

A. Contamination par *Clostridium* sp. du groupe butyrique

Les bactéries productrices de butyrate sont regroupées en une famille de bactéries d'altération regroupant *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* et *C. tyrobutyricum*. Ces espèces sont responsables du DGT en raison de leur capacité à métaboliser le lactate en acétate, butyrate, CO₂ et H₂ résultant en un fromage altéré. Plus précisément, leur métabolisme impacte le pH du fromage et également d'un point de vue organoleptique. En effet, il est à l'origine d'ouvertures irrégulières dans le fromage allant jusqu'au craquement de la croûte (libération de CO₂ et H₂), d'une accumulation de molécules volatiles associées à des odeurs de rance et piquante (butyrate, acétate) en fin d'affinage et d'un changement de couleur du fromage. La production de gaz, à l'origine des ouvertures irrégulières, peut également être à l'origine d'une activité protéolytique comme chez *C. sporogenes*.

Ce sont des bactéries sous forme de bacilles pouvant se retrouver également dans les tractus intestinaux des animaux et des humains. Elles sont Gram positive, sporulées et anaérobies strictes.

Le degré d'importance du gonflement tardif dépend de l'espèce. *C. tyrobutyricum* est connue comme étant l'espèce majeure à l'origine du DGT (Klijn et al., 1995). La concentration de spores de *Clostridium* retrouvée dans le lait brut est généralement basse et varie en fonction de la saison de l'année (Goudkov & Sharpe, 1966). Il a été constaté que les contaminations par des spores de *Clostridium* étaient deux fois plus importantes au cours de l'été que par rapport aux autres saisons au cours d'une même année (Garde et al., 2011).

B. Apparition du défaut du gonflement tardif au cours d'une fabrication et phénomène lié aux spores et cellules végétatives

La majorité des études se penchent sur l'évolution microbienne des spores de *Clostridium* et de leur besoin nutritif leur permettant d'induire le gonflement tardif au cours de fabrication fromagère. Les spores peuvent survivre pendant l'étape de pasteurisation et durant le processus de fabrication. Deux événements principaux peuvent être observés : (i) la sporulation des cellules végétatives lors de la mise en cuve et (ii) la germination des spores au cours de l'affinage. Le nombre de spores reste presque inchangé jusqu'à la fin du salage. En fin de pressage et après salage, les valeurs de pH comprises entre 5,3 et 5,5, variables en fonction du

type fromage à pâte pressée, et l'absence d'O₂ créent des conditions favorables pour la germination (Bassi et al., 2009; Ruusunen et al., 2012).

Le lactate est bien connu dans la littérature comme source carbonée nécessaire au développement des *Clostridium* dans les fromages à pâte pressée, mais certaines sources azotées joueraient également un rôle important.

Storari et al. (2016) ont montré que la biotine et le para-aminobenzoate (PABA), un précurseur du folate, ont été identifiés comme les sources azotées nécessaires à *C. tyrobutyricum* pour sa croissance dans le fromage. De plus, la biotine est également essentielle à la croissance de *C. butyricum*, *C. beijerenckii* et *C. sporogenes* (Storari et al., 2016). Concernant les acides aminés libres (AAL), D'Incecco et al., (2018) ont observé qu'aucun des AAL n'avait été épuisé, à l'exception de l'arginine (sa teneur diminuait progressivement et s'épuisait dans le fromage affiné à 6 mois), ce qui indique que leur disponibilité n'est pas un facteur limitant pour la croissance cellulaire, à l'exception de l'arginine. Ces observations ont permis de confirmer que *C. tyrobutyricum* était capable de métaboliser l'arginine libre et produisant de la citrulline puis de l'ornithine dans le fromage. Ils ont également observé que l'acide g-aminobutyrique (GABA) avait un niveau plus élevé indiquant que la formation de cet acide aminé non protéique était due au métabolisme de *C. tyrobutyricum*. La production de GABA, médiée par la glutamate décarboxylase, représente un moyen courant de limiter le stress acide pour plusieurs espèces bactériennes (Dhakal et al., 2012; Brasca et al., 2016). Cependant, le gène codant pour la glutamate décarboxylase n'est pas présent dans la séquence du génome de *C. tyrobutyricum* (Bassi et al., 2013). En revanche, celui codant pour la 4-aminobutyrate transaminase (EC 2.6.1.19) pouvant conduire à la biosynthèse du GABA par transamination, est présente dans son génome.

C. Répartition des espèces de *Clostridium* dans les fromages atteints du défaut de gonflement tardif

L'apparition du DGT n'est pas due qu'à la contamination d'une seule espèce de *Clostridium* mais de plusieurs. Ces contaminations multi-espèces varient en fonction du type de fromage, de la situation géographique et de la saison de la récolte du lait. En effet, sur des fromages type Grana panado, 47,5 % des lots de fromages ont montré la présence de souches identifiées comme *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* et *C. butyricum* avec une répartition de 45 %, 45% et 7,5 %, respectivement (Matteuzzi et al., 1977). Dans les fromages Manchego avec DGT, *C. sporogenes*, *C. beijerenckii*, *C. tyrobutyricum* et *C. butyricum* ont été identifiés avec une

répartition de 78,9 %, 10,3 %, 9,0 % et 1,8 %, respectivement. Sur 40 % du lot de fromage étudié, plus d'une espèce a été isolée (Garde et al., 2011). Dans une autre étude, Garde et al. (2013) ont trouvé une grande diversité génomique intraspécifique de *Clostridium*, et les isolats ont pu être regroupés selon l'usine et la date de fabrication du fromage.

D. Effet synergique entre les espèces de *Clostridium*

La présence de plus d'une espèce et/ou souche de *Clostridium* dans les fromages avec DGT, suggère qu'elle peut ne pas être le résultat de l'activité métabolique d'une seule espèce, mais dépendre d'une action synergique de plusieurs espèces et/ou souches de *Clostridium*. Ainsi, il a été rapporté que l'association de *C. beijerenckii* ou *C. sporogenes* à *C. tyrobutyricum* stimulerait leur métabolisme de la fermentation butyrique et ainsi accélérerait l'apparition du DGT (Le Bourhis et al., 2007). Garde et al. (2011) ont également signalé un effet synergique sur la production d'acide butyrique et de gaz lorsqu'une souche de *C. beijerenckii* était associée à une souche de *C. tyrobutyricum* ou de *C. sporogenes*. De plus, comme rapporté par Bassi et al. (2015), l'interaction de *Clostridium* sp. avec le reste de la microflore fromagère peut être cruciale pour l'apparition de DGT dans le fromage. De même, Goudkov et Sharpe (1966), Gómez-Torres et al. (2015) ont observé que la croissance de *Clostridium* pouvait être favorisée par la présence d'autres micro-organismes dans le fromage, tels que les coliformes, les lactocoques, les leuconostocs, les lactobacilles et les bactéries propioniques.

E. Apparition du défaut de gonflement tardif : Dépendant de la souche ?

Cependant, toutes les souches de ces espèces de *Clostridium* ne semblent pas avoir la capacité nécessaire à engendrer le DGT. L'étude de Podrzaj et al. (2020) soutient l'hypothèse selon laquelle la détérioration du fromage peut dépendre non seulement des concentrations de spores de Clostridiens, mais également des caractéristiques propres à chaque souche. Les résultats de cette étude indiquent que certaines souches de cette espèce peuvent être plus impliquées dans l'altération du fromage que d'autres, en fonction de leur capacité à germer et à former du gaz. Précédemment, Bergère (1985) avait mis en évidence deux groupes sérologiques principaux (A avec un antigène thermostable et B sans cet antigène) chez l'espèce *C. tyrobutyricum* dont un étant plus favorable à l'apparition du DGT. Ruusunen et al. (2012) ont pu constater ces mêmes observations avec des souches dans des fromages avec différentes concentrations de NaCl. Alors que toutes les souches de *C. tyrobutyricum* se développaient en présence de 1,0 à 2,0 % de NaCl, seulement 8 souches sur 10 se sont développées en présence de 2,5 % de NaCl et jusqu'à 5 souches sur 10 en présence de 3,0 % de NaCl. Cette découverte a démontré que les

souches sont différemment sensibles aux fortes concentrations de sel suggérant que certaines souches peuvent se développer dans les fromages avec une concentration relativement élevée de NaCl, de l'ordre de 3,0 %.

F. Vecteur de contamination

L'origine de l'apparition de ce défaut dû à une contamination bactérienne, se passe au moment de la traite du cheptel. Les pis sont les vecteurs principaux qui se contaminent au contact de la terre et des fèces en cas de mauvaise préparation avant la traite. A ceci s'ajoute la qualité de l'alimentation du cheptel. La charge de contamination par les spores de *Clostridium* peut venir à augmenter en raison d'aliments préalablement altérés par ces mêmes espèces et donc accentuer le risque de contamination lors de la récolte du lait.

1. Hygiène des animaux du cheptel

Initialement, les *Clostridium* se trouvent dans le sol sous forme de spores. Le rôle de la propreté du pis et de la routine de traite joue un rôle important lors de la contamination du lait par les spores. Cependant, cette étape à risque de contamination n'a fait l'objet que d'un nombre limité d'études. Zucali et al. (2015) ont constaté que la présence dans le troupeau de plus de 40 % des vaches en lactation ayant des pis sales augmentait de 15 % la teneur moyenne en bactéries contaminantes du lait. Muck et al. (2018) ont observé que les troupeaux suédois dont la propreté des vaches était médiocre présentaient plus de contaminants dans le lait.

2. Fourrage et ensilage

Au moment de la récolte des fourrages, principale source de fibres pour les cheptels d'élevage, la contamination par les spores butyriques se réalise par l'incorporation de terre dans le fourrage. Une fois ce fourrage consommé, les spores butyriques, ingérées par l'animal, passent dans le tractus intestinal et sont éjectées avec les fèces, provoquant la contamination de leur litière et leur trayon (Driehuis et al., 2016). La contamination des foin est généralement faible, moins de 50 spores.g⁻¹ (Demarquilly, 1998). Cependant, afin de subvenir au besoin alimentaire tout au long de l'année des cheptels d'élevage, les agriculteurs peuvent avoir recours à l'ensilage ; le but principal de l'ensilage étant de préserver les fourrages au cours des saisons lorsque le frais n'est plus disponible. L'ensilage est un terme traduisant un fourrage avec un taux d'humidité élevée et préservé par une fermentation lactique. Il représente une grande part de la ration de nourriture dans les cheptels bovins et caprins en Europe et aux Etats-Unis. En Europe, l'ensilage représente 55 % des fourrages conservés, correspondant à 550 millions de tonnes de fourrage frais.

La microflore de l'ensilage peut se diviser en deux groupes, les microorganismes désirables (principalement les bactéries lactiques), et les microorganismes indésirables, ces derniers étant divisés en deux sous-groupes :

- Les microorganismes anaérobies sporulés ;
- Les microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs comme les levures, moisissures ou *Listeria*.

Les bactéries lactiques associées à l'ensilage appartiennent aux genres *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* et *Enterococcus*. Espèces dépendantes du type d'ensilage, elles sont capables de réduire rapidement le pH entre 4 et 5 via leur fermentation lactique et consomment l'oxygène engendrant un environnement en anaérobie. Il s'agit du point majeur de la préservation de l'ensilage.

Dans le cas d'une contamination par les spores butyriques, la germination des spores survient lors de la seconde étape de la préservation de l'ensilage. Elle se déclenche dans le cas où l'acidification par fermentation lactique ne se fait pas rapidement. La germination leur permet de passer de l'état de spores dormantes à l'état de cellules végétatives actives.

Les cellules végétatives se multiplient dans l'ensilage, engendrant une augmentation du pH et par conséquent une croissance des bactéries anaérobies moins acido-tolérantes (Driehuis et al., 2016). La dégradation des protéines par les *Clostridium* est à l'origine d'une augmentation de produits indésirables impactant la qualité nutritionnelle de l'ensilage. Une fois la croissance des cellules végétatives de *Clostridium* terminées, elles sporulent, augmentant la charge de spores butyriques dans l'ensilage. L'ensilage peut contenir plus de 100 000 spores/g ; l'espèce majeure retrouvée étant *C. tyrobutyricum* (Bryant & Burkey, 1956; Demarquilly, 1998). Une contamination de l'ensilage par *Clostridium* se caractérise par une valeur de pH élevée, une forte charge de spores butyriques, une concentration élevée d'acide butyrique, d'ammoniaque et d'amines (Driehuis & Elferink, 2000).

Les *Clostridium* sont anaérobies strictes, ce qui leur donne un avantage concurrentiel lors de l'ensilage sans oxygène et peuvent se développer si la réduction du pH par les bactéries lactiques dans l'ensilage est insuffisante et que l' A_w est suffisante (Thylin, 2000).

V. Stratégie de contrôles préventifs et méthodes de lutte contre les bactéries sporulées

A. Bonnes pratiques laitières

La première mesure de contrôle consiste à minimiser la présence de spores dans le lait cru par l'application de bonnes pratiques d'élevage (Vissers et al., 2007a, 2007b). Les bonnes pratiques d'élevage comprennent l'utilisation d'un ensilage de bonne qualité, des routines de nettoyage et d'entretien de la salle et du matériel de traite, ainsi que le nettoyage du pis et la préparation des trayons avant la traite.

Concernant la routine de traite, Melin et al. (2002) ont montré qu'une bonne hygiène des pis avant la traite pouvait mener à un contrôle de la contamination par les spores. Magnusson et al. (2006) ont montré que la méthode la plus efficace pour réduire la teneur en spores du lait était l'utilisation d'une serviette humide suivie d'un séchage avec une serviette en papier. Doyle et al. (2015) ont signalé que les bonnes pratiques de traite, comme le trempage et le nettoyage des trayons à l'aide de papier individuel ou de serviettes en coton, réduisaient la charge bactérienne des trayons des vaches.

B. Prévention ou inhibition au cours du procédé de fabrication fromagère

1. Préparation du lait

La bactofugation et la microfiltration permettent à l'industrie laitière de réduire le nombre de spores, diminuant ainsi le risque d'apparition du phénomène du gonflement tardif sans l'ajout d'additifs inhibiteurs de la germination des spores, tels que les nitrates, le lysozyme ou la nisine (Sheehan, 2011; Garde et al., 2013).

La bactofugation, également connue sous le nom de clarification bactérienne, consiste en une centrifugation à grande vitesse, avec des efficacités d'élimination des spores bactériennes rapportées entre 90 et 98 % (Bergère et al., 1969; Gésan-Guiziou, 2010). Alternativement, la microfiltration utilise une membrane semi-perméable avec différentes tailles de pores pour séparer les bactéries et les composants du lait en fonction de la taille des particules. La microfiltration permettrait des niveaux d'élimination bactérienne plus élevés que la

bactofugation, avec des efficacités comprises entre 99,1 et 99,99 % (Gésan-Guiziou, 2010). Cependant, ces techniques sont coûteuses, chronophages et laborieuses. De plus, la microfiltration ne peut être appliquée qu'au lait écrémé, car les globules de matière grasse du lait sont trop gros pour passer à travers la membrane de microfiltration.

La pasteurisation inactive les cellules végétatives de *Clostridium*, mais les températures de procédé fromager ne suffisent pas pour l'inactivation des cellules végétatives de *C. tyrobutyricum* dans le lait dans des conditions aérobies (Garde et al., 2011).

Pour les technologies fromagères concernées, l'écémage est un moyen de réduire la concentration de spores dans le lait. Les IgA et, dans une moindre mesure, les IgM, présentes dans le lait, font partie des composants responsables du regroupement des globules gras et de l'agglutination de spores des *Clostridium* aux globules gras lors de l'écémage naturel du lait. *C. tyrobutyricum* a montré une forte affinité pour les molécules d'IgA, ce qui indique que la variation naturelle de la concentration d'IgA et d'immunoglobulines dans le lait pourrait contribuer à la variabilité du DGT. L'ajout d'immunoglobulines au lait cru avant l'écémage naturel pourrait également améliorer la « dé-sporification », réduisant ainsi le risque de DGT dans le Grana Padano ou des fromages similaires (D'Incecco et al., 2018).

2. Additifs

L'utilisation d'additifs alimentaires est une autre stratégie pour prévenir la croissance des bactéries sporulées. Le nitrate et/ou le lysozyme sont les additifs les plus couramment utilisés pour contrôler la croissance de *C. tyrobutyricum* et pour prévenir le DGT dans le fromage ; mais les nitrates peuvent entraîner la formation de nitrosamines potentiellement cancérigènes et le lysozyme pourrait présenter des risques pour les sujets allergiques et/ou inhiber d'autres microflores technologiques (Beresford et al., 2001; Garde et al., 2013).

La nisine, une bactériocine produite comme par *Lactococcus lactis*, est utilisée comme additif dans les pâtes pressées pour contrôler la croissance de *C. tyrobutyricum* (Hassan et al., 2021). L'inoculation du lait avec des bactéries lactiques de différentes espèces productrices de bactériocines ayant le rôle de levain lactique ou non-levain lactique dans la fabrication du fromage a été étudiée avec succès pour prévenir ce défaut (Thuault et al., 1991; Aktypis et al., 1998; Bogovič Matijašić et al., 2007; Anastasiou et al., 2009).

Plus récemment, le DGT a été empêché avec l'utilisation de *Lactobacillus reuteri* INIA P572, une souche productrice de reuterine (β -hydroxypropionaldéhyde), comme culture non-levain,

avec du glycérol, co-substrat nécessaire à la production de reuterine, dans la fabrication du fromage (Ávila et al., 2017). De même, Garde et al. (2020) ont utilisé un levain lactique de *Lactococcus lactis* exprimant une endolysine venant d'un bactériophage spécifique à *C. tyrobutyricum*.

3. Contrôle des paramètres de fabrication et d'affinage

La croissance des *Clostridium* est affectée par la température, le nombre initial de spores du lait, le pH, la salinité, le taux de pénétration du sel à partir des saumures et par les types de cultures starter et auxiliaires utilisés. Les études sur l'impact de ces paramètres ont permis de proposer de nouvelles approches pour limiter ou prévenir de l'apparition du DGT. L'influence combinée du pH et de la concentration d'acide lactique sur la croissance de *C. tyrobutyricum* dans le lactosérum et le fromage a été étudiée (Thylin et al., 1995). Il a été montré que 200 mmol.L⁻¹ d'acide lactique à un pH inférieur ou égal à 4,8 ou 400 mmol.L⁻¹ d'acide lactique à pH égal à 5,1-5,2 suffisaient à prévenir la germination dans le lactosérum pendant au moins 40 jours. Dans le fromage Gouda, le gonflement tardif a été empêché à pH 5,1 avec 450 mmol.L⁻¹ d'acide lactique (Thylin et al., 1995). Silvetti et al. (2018) ont pu observer qu'à pH 5, aucune des spores des espèces de *Clostridium* n'avait pu germer.

Dans les fromages affinés, une teneur en sel > 3 % inhibe la croissance de *Clostridium* et par conséquent les DGTs, ainsi que d'autres micro-organismes indésirables (Ledenbach & Marshall, 2009; Ruusunen et al., 2012; Silvetti et al., 2018).

L'activité réductrice, marqueur caractéristique de l'activité métabolique des *Clostridium*, serait également fortement impactée par la température. En effet, à 20 °C, seulement certaines espèces de *Clostridium* pouvaient réduire le milieu et atteindre des valeurs E_h négatives. Une température inférieure à 15 °C a empêché de manière efficace la formation de gaz par les cellules végétatives pendant plus de 70 jours, tandis qu'une température inférieure à 10 °C était nécessaire pour éviter la germination des spores et la production de gaz. Des résultats similaires ont été obtenus dans des études précédentes par Su & Ingham (2000) et Ruusunen et al. (2012). Ils ont obtenu une germination et une production de gaz à partir de spores de *C. tyrobutyricum* à 13 °C, mais pas à 8 °C. Ainsi, une température de maturation inférieure à 10 °C représente une stratégie potentielle pour prévenir l'apparition de DGT (Silvetti et al., 2018).

D'autres études sur la combinaison de ces paramètres ont permis de proposer de nouvelles stratégies pour inhiber l'apparition du DGT. Morandi et al. (2021) ont montré que la combinaison d'une température, d'un salage et d'un affinage appropriés pourrait être une

stratégie utile pour prévenir et contrôler le DGT dans les fromages à pâte pressée. Dans leur étude, une température de saumure de 13 °C suivie d'une maturation à 8 °C a permis d'inhiber la germination des spores de *Clostridium* et par conséquent le développement de *C. tyrobutyricum*. Silveti et al. (2018) ont observé qu'une combinaison de température ≤ 15 °C, pH $\leq 5,00$ et d'un stress osmotique (NaCl 2 %) permettaient d'éviter la germination des spores et leur production de gaz dans le fromage.

4. Modélisation

Des équipes se sont penchées sur la prévention du DGT en s'appuyant sur la modélisation pour identifier une stratégie de contrôle efficace au niveau de la ferme. Vissers et al. (2006) ont développé un modèle de simulation basé sur une traduction de la voie de contamination impliquant les facteurs liés à la qualité des aliments, à la gestion des aliments, à l'hygiène des étables et aux pratiques de traite sur le niveau de contamination. À l'aide de diverses simulations, ils ont pu montrer les effets du niveau de contamination de l'ensilage s'avérant être le facteur le plus important à l'origine des contaminations. Leur modèle a permis de montrer que lorsque l'ensilage contient en moyenne moins de 3 log [spores butyriques].g⁻¹, un prétraitement de base des trayons du pis avant la traite (~75 % d'élimination des spores attachées) est suffisant pour assurer un niveau de contamination inférieur à 1 spore.mL⁻¹. Par contre, lorsque l'ensilage contient plus de 5 log spores.g⁻¹, ce dernier ne doit pas être utilisé pour l'alimentation du cheptel, car il devient alors quasiment impossible d'assurer un niveau de contamination inférieur à 1 UFC.mL⁻¹ de *Clostridium* butyrique dans le lait. D'autres équipes ont également mis au point d'autres modèles, comme Qian et al. (2022) avec leur version bêta d'un outil d'aide à la décision qui pourrait être précieux pour certains fromagers.

C. Nouvelles méthodes d'identification et de détection

Actuellement, il n'existe aucune méthode officiellement normalisée disponible pour vérifier les teneurs de spores de *Clostridium* dans le lait. Les techniques NPP (nombre le plus probable) conventionnelles sont majoritairement utilisées comme contrôles de routine, mais présentent des inconvénients majeurs tels que la longue durée d'analyse, l'intensité du travail, l'incertitude des résultats et une sélectivité insuffisante pour les *Clostridia* (Brändle et al., 2017). La mise au point d'une technique de contrôle fiable a fait l'objet de plusieurs études.

Brändle et al. (2018) ont mis au point une nouvelle technique de détection de spores par approche de culture bactérienne et pouvant détecter des spores butyriques avec une meilleure

sélectivité, sensibilité et de temps d'analyse par rapport aux techniques conventionnelles comme les NPP.

D'autres études se sont penchées sur les approches de biologie moléculaire. Ces dernières années, des méthodes basées sur la PCR (Klijn et al., 1995) ont été développées avec l'inconvénient d'être spécifiques pour une seule espèce. Ainsi pour une étude complète de *Clostridium* sp. dans le fromage, un ensemble d'amorces spécifiques devait être disponible. Plus récemment, Cocolin et al. (2004) ont développé un protocole d'électrophorèse sur gel à gradient dénaturant PCR (DGGE) pour profiler les populations microbiennes dans les fromages avec le DGT tandis que Le Bourhis et al. (2005) ont réalisé une approche PCR-TTGE pour évaluer l'évolution des espèces de *Clostridium* au cours de la maturation. Par ailleurs, Cremonesi et al. (2012) ont identifié par PCR multiplex plusieurs espèces de *Clostridium* à partir de fromages, laits crus et ensilages.

D'autres approches méthodologiques sur la prévention ou détection des spores ont été étudiées comme la combinaison du bactériophage CTP1L (endolysin) spécifique à *Clostridium tyrobutyricum* et ses domaines d'enzymes actifs et domaines d'accroches membranaires couplés avec la Green Fluorescent Protein (GFP) pour détecter par microscopie fluorescence et pouvant se fixer sur les cellules végétatives et les spores (Gómez-Torres et al., 2018), ou encore la détection immunologique en produisant des anticorps polyclonaux contre les spores de *C. tyrobutyricum* (Bergere & Favreau, 1987; Lavilla et al., 2008, 2010).

D. Nouvelles méthodes de luttes

D'autres approches d'inhibition du DGT ont été étudiées afin de diminuer l'apparition de DGT dans le fromage, comme l'utilisation de lait d'ânesse, qui se caractérise par une teneur élevée en lysozyme (Cosentino, 2015), l'irradiation (Velasco et al., 2011), l'ajout d'extraits de plantes aromatiques au lait de fromagerie (Moro et al., 2015), et l'application d'une pression élevée (Ávila et al., 2016).

En résumé de ce chapitre, le DGT chez les fromages à pâte pressée engendre de grosses pertes économiques aux industriels laitiers. Il se caractérise par l'apparition de cavités irrégulières pouvant aller jusqu'au craquement de la croûte du fromage et l'apparition de goût de rance, piquant, rendant le produit impropre à la consommation. Le DGT apparaît au cours de l'étape d'affinage limitant toutes possibles interventions. L'apparition de ce défaut est d'origine bactérienne. La contamination s'effectue lors de la récolte du lait. Les contaminants sont des spores appartenant à un groupe de *Clostridium* d'altération connu pour leur production de gaz (CO₂ et H₂) et d'acides organiques (butyrate et acétate) à l'origine des altérations organoleptiques des fromages atteints. *C. tyrobutyricum* est l'espèce majeure à l'origine du DGT. Il existe des solutions de prévention comme de la modélisation préventive, les bonnes pratiques de traites ou encore des techniques de détection ou de dénombrement des spores pour éviter le défaut (NPP). Il existe également différentes stratégies pour limiter l'apparition du défaut en ajoutant des additifs (lysozyme), en contrôlant les paramètres de fabrication et d'affinage (Température, taux de NaCl, ...) ou encore au cours de la préparation du lait avec les technologies de bactofugation ou encore d'ultracentrifugation. Mais ces approches ne sont pas suffisantes pour contrôler totalement l'apparition du DGT. D'autres approches sont proposées dans la littérature (détection immunologique, biologie moléculaire, haute pression, etc.), mais elles restent onéreuses ou complexes de mise en œuvre en industrie.

Chapitre 2: *Clostridium tyrobutyricum* : Sporulation, germination et métabolisme

I. Généralités

C. tyrobutyricum est une bactérie retrouvée principalement dans le sol. Elle est Gram positive, anaérobie stricte, sporulée. Il s'agit d'un micro-organisme péritriche, à forme de bâtonnet droit, de taille allant de 1,5 à 4,5 μm , se trouvant seul ou par paire. Cette bactérie est aussi retrouvée sous forme endosporulée subterminale ovale. Elle fermente différents carbohydrates comme le glucose ou le xylose et certains acides organiques comme le lactate produisant du butyrate, de l'acétate, du CO_2 et du H_2 . Elle a été découverte par van Beynum et Pette en 1935 et longtemps considérée comme une sous-espèce de *C. butyricum*. Il a fallu attendre quelques années et davantage d'études, sur la capacité à fermenter différents carbohydrates, pour montrer une large différence entre *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum*. Depuis, *C. tyrobutyricum* a été officiellement considérée comme une nouvelle espèce par sa capacité à germer et à consommer certains carbohydrates et le lactate en présence d'acétate (Bryant & Burkey, 1956; Roux & Bergère, 1977). De plus, plusieurs études phylogénétiques basées sur la séquence nucléotidique des gènes codant pour les ARNr 23S et 16S ont été réalisées dans le but de discerner les espèces de *Clostridium* appartenant au groupe des producteurs de butyrate. Les observations ont montré que *C. tyrobutyricum* était relativement plus proche des espèces de *C. kluyveri* et de *C. ljungdhalli* (Roelof Van Der Meer et al., 1993; Diallo et al., 2021). Elle a la particularité d'avoir seulement une phase acidogène se produisant lors de sa phase de croissance exponentielle alors que d'autres espèces appartenant au groupe des producteurs de butyrate déclenchent un changement métabolique leur permettant de produire des solvants.

Il a été mis en évidence chez *C. tyrobutyricum* deux groupes sérologiques principaux ; un groupe se caractérisant de l'autre par la présence d'un ou plusieurs antigènes thermostables spécifiques supplémentaires. Cette répartition sérologique est représentative de ce qui peut être trouvé dans l'environnement se résumant en moyenne à 70% appartenant au groupe A et 30% appartenant au groupe B (Bergère, 1985).

II. La sporulation

La sporulation est un phénomène physiologique à l'origine du passage de l'état de cellule végétative à l'état de spore chez une bactérie dite sporulée. Les genres principalement concernés par ce mécanisme sont *Bacillus* et *Clostridium*. Ce changement d'état se produit en plusieurs étapes pour passer de la cellule végétative à la spore. Ces différentes étapes successives sont les conséquences de l'enchaînement de différents mécanismes et régulations moléculaires composant la sporulation. Le mécanisme de sporulation et sa régulation sont bien connus chez le genre *Bacillus*, et principalement chez *Bacillus subtilis*, mais moins bien connus chez certaines espèces du genre *Clostridium* comme *C. acetobutylicum*, *C. difficile*, *C. perfringens* et *C. botulinum*, mettant en évidence des différences entre *Bacillus* et *Clostridium* ainsi qu'entre les espèces appartenant à un même genre.

La sporulation se déclenche principalement lorsque l'environnement devient pauvre en nutriment chez les bactéries. Pour *Clostridium*, la présence d'oxygène, une accumulation d'acides organiques comme le butyrate et acétate avec un pH bas déclencherait ce phénomène.

Cependant, il existe très peu de données sur la sporulation de *C. tyrobutyricum*. *C. acetobutylicum* étant une bactérie appartenant au même genre, proche phylogénétiquement et dont le mécanisme de sporulation est le mieux connu actuellement, elle a été choisie puis étudiée dans le but d'une comparaison bio-informatique des facteurs principaux intervenant durant sa sporulation avec ceux retrouvés dans le génome de *C. tyrobutyricum*. Ce choix a pour but de mettre en évidence le mécanisme dans sa globalité et ce qui peut être retrouvé chez cette espèce. L'ensemble de ces résultats sont détaillés dans la partie bio-informatique de ce rapport.

Aujourd'hui, il existe un schéma général des étapes de la sporulation chez *Clostridium* et de différentes apparences morphologiques que prend la cellule avant de devenir une spore (Figure 2). Les différentes étapes sont déclenchées par des facteurs de régulations comme Spo0A ainsi que différents facteurs sigmas se régulant entre eux. Ces facteurs sont retrouvés chez toutes les espèces du genre *Clostridium* et *Bacillus*.

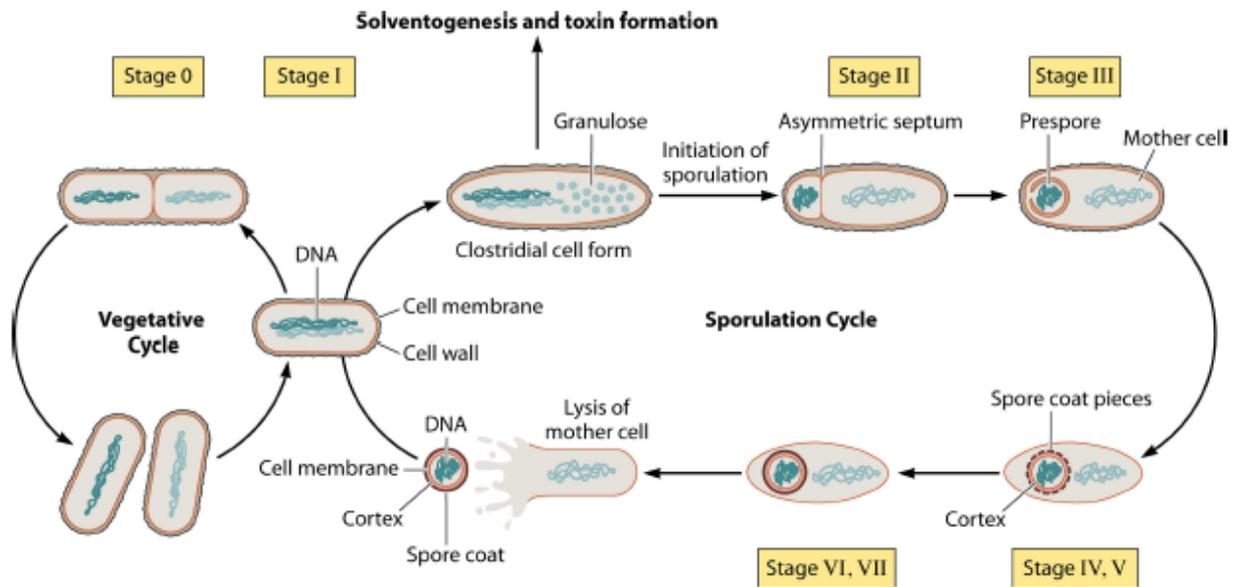


Figure 2 : Représentation des différentes morphologies de *Clostridium* au cours de chacune des étapes de la sporulation (Al-Hinai et al., 2015).

À l'étape d'initiation, la cellule végétative prend un aspect gonflé ressemblant à un cigare appelé « la forme Clostridiale ». Cette morphologie est due à une synthèse de vésicule granuleuse ou granulose, composée de différents polysaccharides comme l'amylopectine ou le glycogène, retrouvée chez *C. pasteurianum*, *C. butyricum* ou *C. botulinum*, et s'accumulant dans la cellule. À cette étape, la genèse de solvant ou de toxine, en fonction du type de *Clostridium*, se produit ainsi que la réplication de l'ADN. Les facteurs SigA, SigH, SigK et Spo0A régulent cette étape.

La seconde étape, régulée par les facteurs SigF et SigE, correspond à la division de la cellule en deux compartiments asymétriques, dite fission binaire asymétrique. En effet, cette séparation asymétrique qui se fait avec l'apparition du septum, paroi séparant les deux compartiments, délimite le futur compartiment dit pré-spore qui donnera l'endospore et un second appelé cellule mère qui permettra la maturation de la future endospore.

Au cours de la troisième étape, régulée par SigE, un phénomène de phagocytose se produit où le plus grand compartiment dit cellule mère absorbe le compartiment pré-spore. À cette étape, la sporulation est irréversible.

Lors de la quatrième étape, le cortex de la future spore se forme entre les deux membranes des cellules mères et de la pré-spore. Celui-ci se compose de peptidoglycane modifié ayant une petite réticulation entre les chaînes peptidiques.

Pour la cinquième étape, le manteau de la spore se forme. Celui-ci se compose de protéines riches en cystéine représentant la moitié de l'ensemble des protéines retrouvées dans une spore. Il se développe au-dessus du cortex.

L'étape suivante, nommée la maturation de la spore, permet aux différentes couches composant la spore de terminer son développement. Une enveloppe blanchâtre peut être observée autour de la pré-spore.

La dernière étape est la lyse de la cellule mère libérant ainsi la spore mature. Cette étape finale et les trois précédentes sont régulées par les facteurs SigG et SigK (Dürre, 2014; Al-Hinai et al., 2015). La Figure 3 récapitule les différents mécanismes et régulations durant la sporulation:

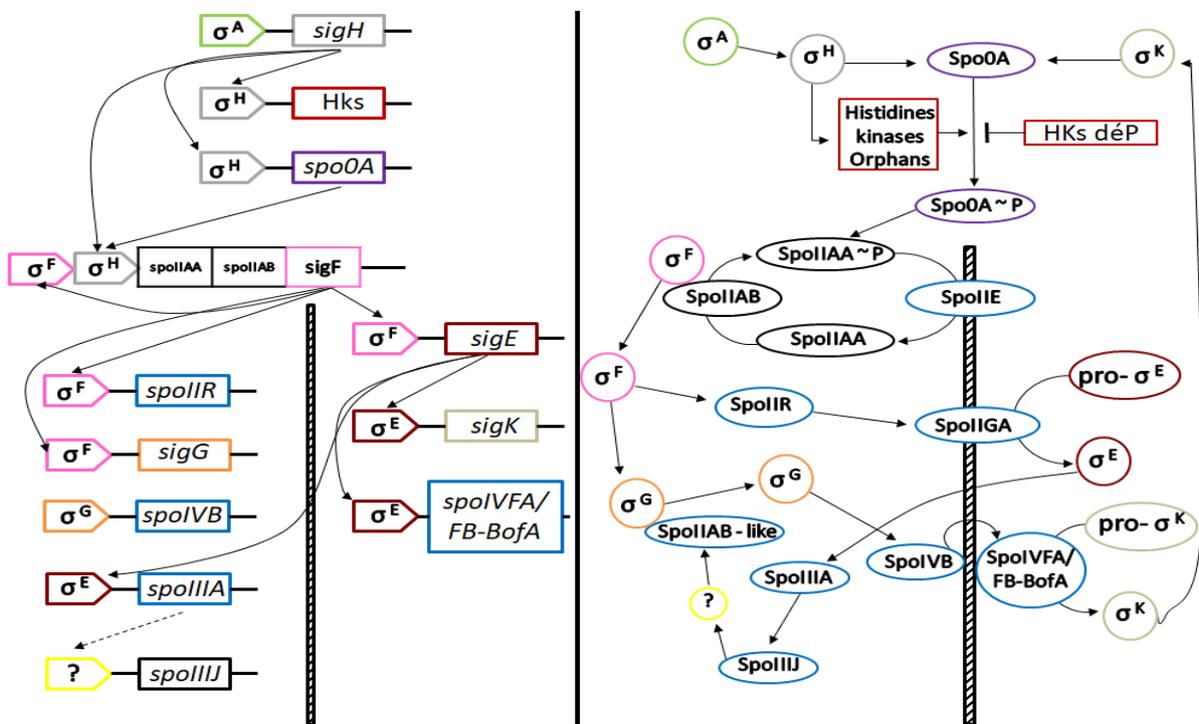


Figure 3 : (A) représentation de la cascade de régulation lors de la sporulation (B) mécanisme de la sporulation d'un point de vue moléculaire. Ces deux schémas sont retrouvés chez *C. acetobutylicum*.

Au cours de ces différentes étapes, *Clostridium* produit également de l'acide dipicolinique, qui se complexe avec du Ca^{2+} (Ca-DPA), permettant à la spore d'acquérir sa capacité à résister à des variations de température importante. À l'inverse de *Bacillus*, certaines espèces de *Clostridium* comme *C. acetobutylicum*, *C. beijerenckii*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, ont une absence des gènes *spoVFA/B* permettant de produire les molécules intermédiaires entrant dans

la formation du Ca-DPA. Par ailleurs, chez *C. perfringens*, il a été observé que la protéine EtfA et le Ca-DPA sont les produits de la molécule DHDPA. Or, EtfA joue un rôle important dans la bifurcation d'électron lors du passage du crotonyl-CoA au butyryl-CoA et du lactate au pyruvate.

Comme chez *Bacillus*, lors de la sporulation, des séquences codant pour des *small acid soluble spore protein* (SASP) jouent un rôle dans la protection de l'ADN contre les UV et l'oxydation en modifiant la conformation de l'ADN. Ces dernières sont aussi retrouvées dans les séquences des *Clostridium* comme chez *C. bifermentans* et *C. perfringens* (Dürre, 2014).

III. La germination

A l'inverse de la sporulation, la germination est le mécanisme retrouvé chez les bactéries sporulées permettant de passer de l'état de spore à un état de cellule végétative. Ce mécanisme n'est pas encore totalement résolu.

La germination des spores s'initie lorsque les conditions environnementales présentes sont favorables. Ces facteurs favorables sont considérés comme des germinants qui se divisent en deux catégories : les germinants dits nutritifs qui regroupent les molécules à faibles poids moléculaires comme des acides aminés, des monosaccharides, des nucléosides, des sels ou encore des acides organiques et les germinants dits non nutritifs qui regroupent les facteurs physiques comme un changement de température brusque, de pression osmotique, hydrostatique ou la présence de lysozyme. La germination se déclenche lorsque les récepteurs de germinants sont stimulés par des germinants reconnus spécifiquement.

Pour certaines spores, un germinant suffit, alors que pour d'autres, plusieurs germinants, similaires ou non, sont nécessaires pour déclencher le phénomène.

Actuellement, il existe trois types de schémas dans la littérature : ceux de *Bacillus subtilis*, *C. difficile* et *Clostridium perfringens* (Figure 4).

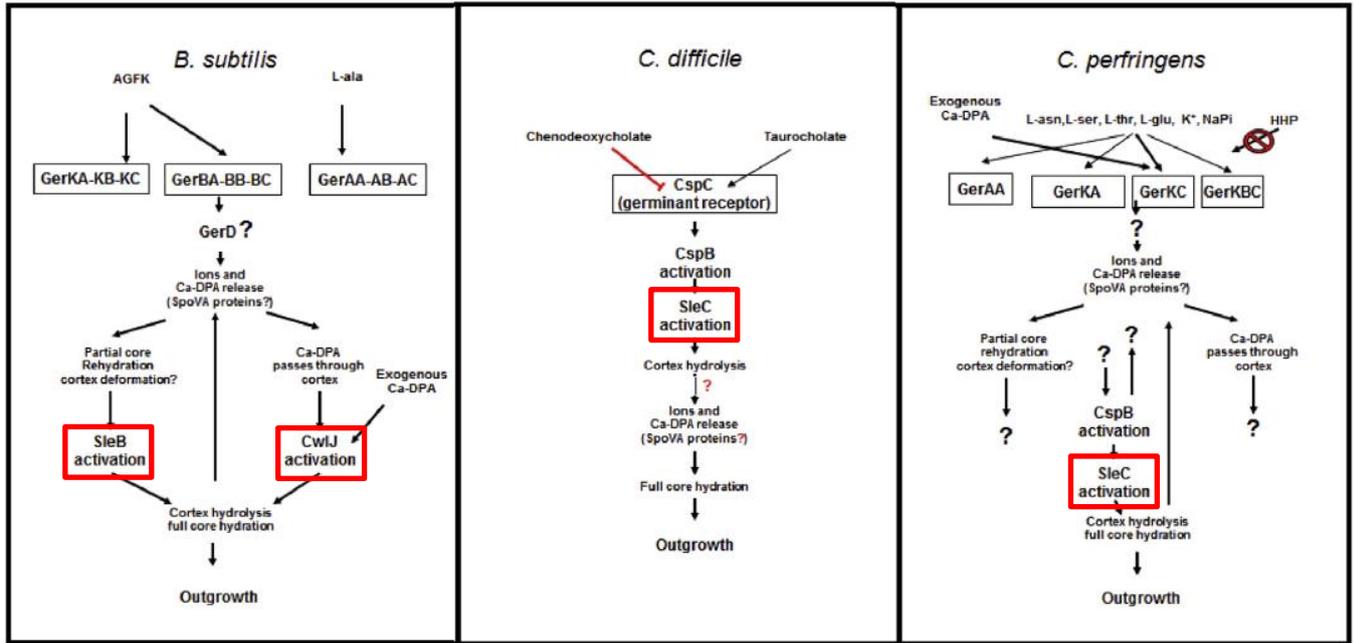


Figure 4 : Représentation des mécanismes de germination retrouvés chez *Bacillus subtilis*, *C. difficile* et *C. perfringens* ; AGFK: mélange de L-asparagine, fructose, glucose et KCl ; GerXX: différents types de récepteurs à germinant appartenant au Ger-type; en rouge: enzyme de lyse cortex (Olguín-Araneda et al., 2015).

Que ce soit pour *Bacillus* ou *Clostridium*, la germination se déroule en plusieurs étapes. L'activation se produit par le biais des récepteurs de germinants qui vont les capter, déclenchant l'étape suivante.

Il existe différents types de récepteurs de germinants : les Ger-types composés de trois familles, GerA, B et K. Ils sont traduits par le biais d'opérons tricistroniques. Ils sont retrouvés chez le genre *Bacillus* et se composent de trois sous unités : A, B et C (Figure 5). Ils sont également présents chez le genre *Clostridium* mais sont souvent constitués d'une seule sous unité ou deux.

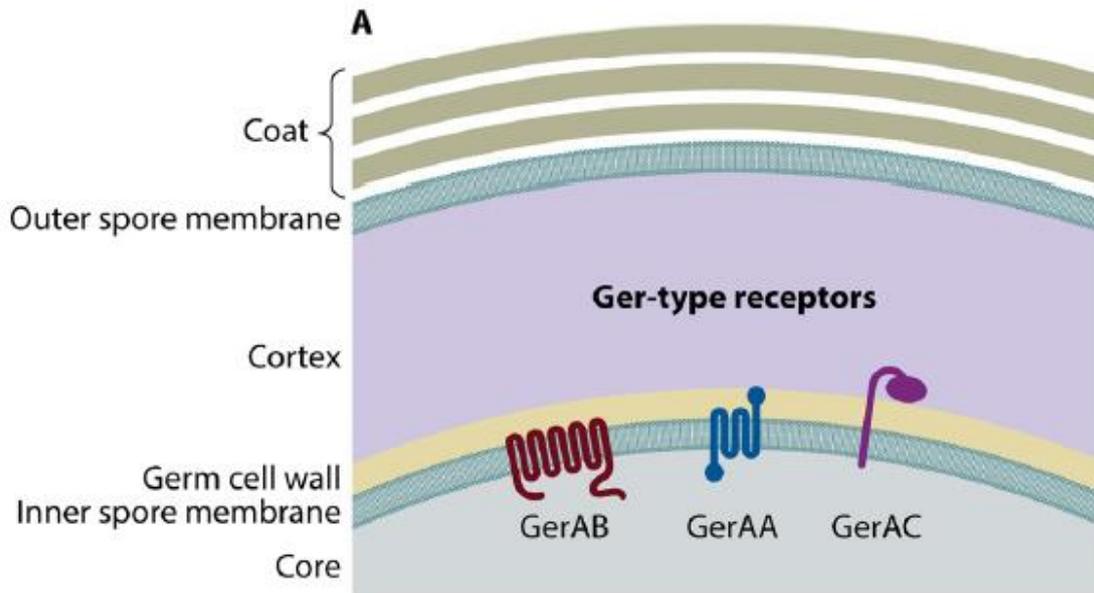


Figure 5 : Représentation des différentes couches d'une spore de *Bacillus subtilis* et des récepteurs Ger-type dans la membrane interne (Bhattacharjee et al., 2016).

Selon l'étude de Moir & Cooper (2015), la sous-unité A des récepteurs du Ger-type est une protéine membranaire de 53 kD se trouvant principalement sur la partie externe de la membrane interne. Elle se compose d'un domaine hydrophile N-terminale du côté du noyau, d'un domaine hydrophobe de quatre hélices α dans la membrane interne et d'un domaine hydrophile C-terminal du côté du cortex. Pour la sous-unité B, elle est composée de dix à douze hélices transmembranaires implantées dans la membrane interne. Cette sous-unité permettrait la liaison entre le germinant et le récepteur (Figure 6).

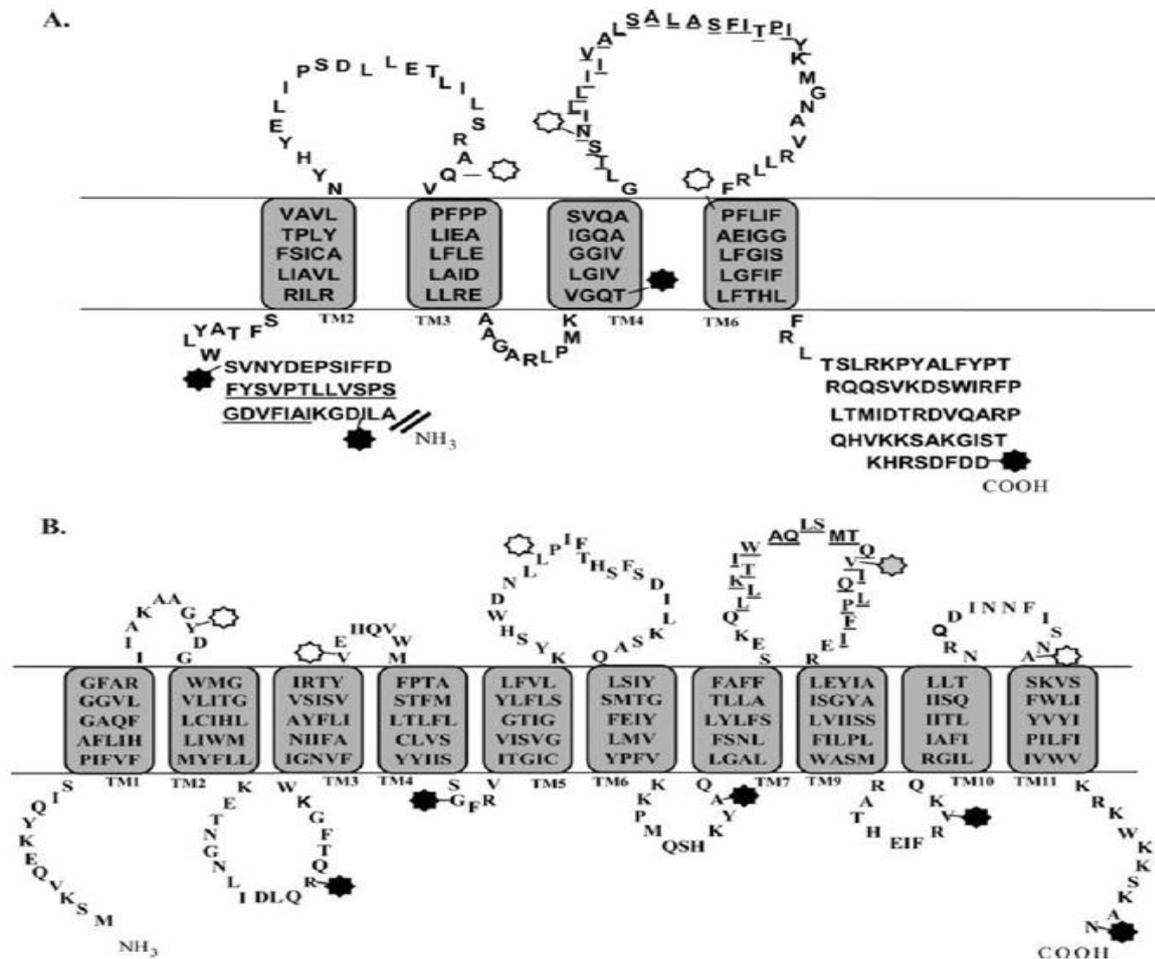


Figure 6 : Représentation de la configuration des sous-unités A et B des récepteurs du type Ger (Moir & Cooper, 2015).

Pour la dernière, la sous-unité C, elle se situe dans la membrane interne ; elle est composée de trois domaines distincts encore non identifiés. C'est une protéine principalement hydrophile sauf sa partie N-terminale qui est hydrophobe (Moir & Cooper, 2015).

L'étape suivante se caractérise par une cascade de réactions plus ou moins connues. Pour *Bacillus*, il semblerait que l'activation de ces récepteurs entraîne la transcription d'un gène codant pour la protéine GerP qui, par un enchaînement de réactions encore inconnues, stimule les transporteurs du complexe SpoAV, complexe regroupant sept sous-unités (A, B, C, D, Ea, Eb et F) protéiques, se trouvant dans la membrane interne (IM) de la spore. Ce complexe a pour rôle de libérer le Ca-DPA et des ions du noyau de la spore. Concernant *Clostridium*, ces mécanismes intermédiaires, entre l'activation des récepteurs et la libération de Ca-DPA et les ions, restent encore à être identifiés. De plus, une partie des sous-unités composant le complexe SpoAV n'est pas retrouvée chez *C. perfringens* et *C. difficile*. Au cours de cette étape, le Ca-

DPA sortant est remplacé par de l'eau, marquant le début de la réhydratation de la spore, qui perd ainsi ses capacités de résistances. Il n'y a pas encore d'activités métaboliques ou transcriptionnelles.

L'étape suivante débute par l'activation des enzymes responsables de la lyse du cortex (CLE). Ce cortex se compose de peptidoglycane spécifique, où une grande partie des N-acétylmuramique (NAMs) est convertie en muramique-Sigma-lactame, reconnue par les enzymes CLE. Chez *Bacillus*, ces protéines sont les enzymes SleB et CwJ, présentes initialement sous une forme inactive à l'intérieur de la membrane interne et à l'extérieur du cortex de la spore, respectivement. Elles s'activent lorsque le Ca-DPA sort du noyau et procèdent à la lyse du cortex pour accélérer l'étape de réhydratation. Pour *C. perfringens*, l'enzyme SleC joue le rôle de l'enzyme lysant le cortex. Cette dernière s'active lorsque le Ca-DPA relargué par le transporteur SpoAV, composé seulement des sous-unités C, D, Eb et F, déclenche une réaction en chaîne impliquant les protéines réceptrices du type Csp. Cette enzyme est elle aussi présente, initialement, dans la spore sous forme inactive avant germination.

En plus de la lyse du cortex, cette étape regroupe également la dégradation des SASPs fixées à l'ADN donnant une source non négligeable d'acides aminés, l'apparition des premières activités métaboliques, la vérification de l'état de l'ADN ainsi que sa réparation et modification de la membrane interne, où les protéines et lipides la composant deviennent mobiles (Figure 7).

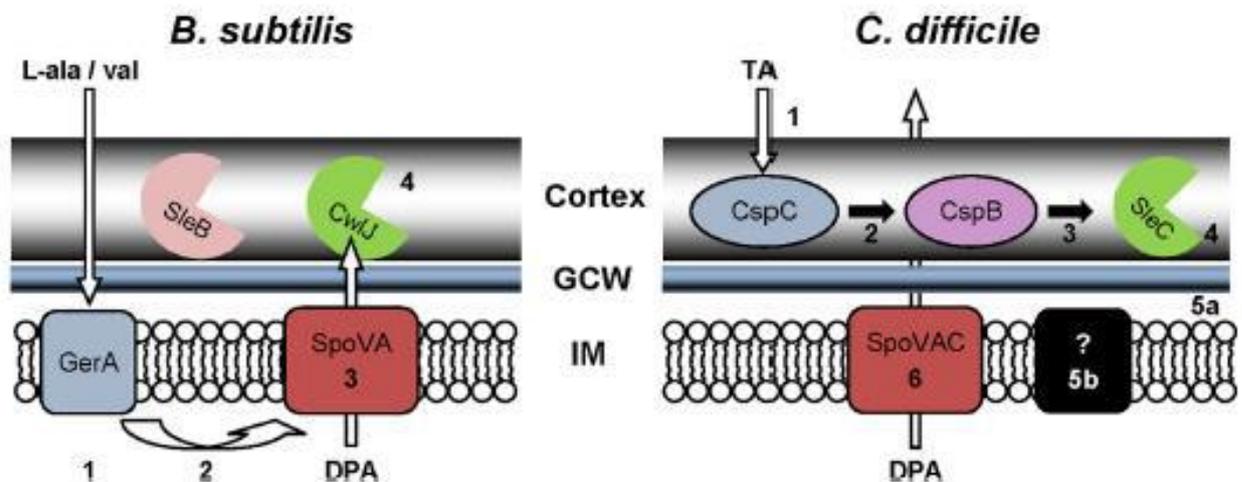


Figure 7 : Représentation des deux mécanismes activant les enzymes lysant le cortex chez *B. subtilis* et *C. difficile* (Francis et al., 2015).

Une fois l'ADN réparé et totalement libéré au cours de l'étape précédente, l'étape de croissance se caractérise par le relancement des voies cataboliques de synthèses lipidique et protéique ainsi que de la transcription des gènes correspondants impliqués dans la croissance cellulaire.

Le temps de germination peut varier de quelques minutes à quelques jours d'un genre et d'une espèce à l'autre. De plus, il existe aussi une certaine hétérogénéité de ce temps de germination au sein d'une population de spores issue d'une même espèce. Cette hétérogénéité serait en partie causée par le nombre variable de récepteurs de germinant d'une spore à l'autre et augmentée avec la présence d'un exosporium.

À la différence de la sporulation, il n'existe pas de schéma général de germination retrouvé chez *Clostridium* car certaines espèces appartenant au genre *Clostridium* répondent au même mécanisme retrouvé chez *Bacillus subtilis*, *C. perfringens* ou *C. difficile*.

Actuellement, il existe très peu d'informations sur le mécanisme de germination de *C. tyrobutyricum*. En revanche, plusieurs études se sont penchées sur les germinants physiques ou nutritifs propres à *C. tyrobutyricum*. Bergère et Touraille (1974) ont identifié l'acétate et l'ion ammonium comme initiateur de germination chez *C. tyrobutyricum*. De plus, ils ont démontré que l'acétyl-CoA est impliqué dans le mécanisme de la phase initiale de germination par les enzymes de la branche de l'acétate. Son rôle serait de réduire de la ferrédoxine via une ferrédoxine : NAD⁺ réductase nécessaire au fonctionnement de son métabolisme central comme observé chez *C. kluveri* et *C. butyricum*. L'ion NH₄⁺ servirait comme apport azoté pendant la germination (Touraille & Bergère, 1974).

Il a été démontré que le lactate couplé avec de l'alanine était également un initiateur de germination chez *C. tyrobutyricum*.

De plus, le pH et la température joueraient un rôle majeur dans l'initiation de la germination. Il est connu que la température change la conformation des récepteurs de germination chez les bactéries, impliquant une augmentation du taux de germination d'une population de spores. Ce phénomène a été observé chez *C. tyrobutyricum*. Un pH acide (proche de 4,6) serait plus propice à la germination chez *C. tyrobutyricum* en présence de lactate et d'alanine comme germinants nutritifs (Huchet et al., 1997; Bassi et al., 2009).

IV. La fermentation butyrique

La fermentation butyrique par *C. tyrobutyricum* est à l'origine du DGT apparaissant généralement durant les trente premiers jours d'affinage des fromages à pâte pressée cuite et non cuite. À partir du lactate, la bactérie produit du H₂ et du CO₂, à l'origine de l'aspect gonflé du fromage allant jusqu'au craquement de la croûte, et la production de butyrate donnant un goût rance au produit. Ainsi l'étude de cette voie métabolique est primordiale pour comprendre l'impact de ce dernier dans les fromages et l'effet du redox sur ce dernier.

A. Généralités

Clostridium est un genre regroupant une grande quantité d'espèces différentes incluant des pathogènes, des non-pathogènes. Afin de mieux catégoriser ces espèces, des clusters ont été formés. Une de ces catégories regroupe les espèces ayant la propriété de produire du butyrate comme principal produit de fermentation issue des sucres. Les principaux représentants de ce groupe sont *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. tyrobutyricum*, *C. pasteurianum*, *C. acetobutylicum*, *C. sporogenes*, *C. rubrum*, *C. lacto-acetophilum* and *C. kluyveri* (Cummins & Johnson, 1971). Depuis, deux sous-groupes ont été distingués avec les espèces acidogènes produisant du butyrate et de l'acétate comme produit final appelé fermentation butyrique et les espèces solventogènes qui après leur fermentation butyrique produisent de l'acétone, du butanol et l'éthanol (ABE) par réutilisation du butyrate et de l'acétate lors d'un changement métabolique appelé phase solventogène.

Dans le chapitre *Butyrate and Butanol-Acetone fermentation* de la seconde édition « Bacterial Metabolism » écrit par Gottschalk (1979), ce dernier expose un schéma allant du glucose au butyrate. Selon ce schéma, les dégagements gazeux de CO₂ et d'H₂ se réalisent entre le passage du pyruvate vers l'acétyl-CoA. Le CO₂ est produit via la pyruvate : ferredoxine oxydoréductase (Pfor) lors de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA avec production d'une molécule d'H₂ et deux molécules de ferrédoxines réduites. Ces ferrédoxines réduites sont par la suite réoxydées par une hydrogénase donnant la réaction suivante :



Dans cette voie, la conversion de l'acétyl-CoA en butyrate se ferait par l'intermédiaire de l'acétoacétyl-CoA, du 3-hydroxybutyryl-CoA, du crotonyl-CoA, du butyryl-CoA et du butyryl-P où le NADH₂, formé au cours de la glycolyse, serait consommé et une molécule d'ATP produite. Ce schéma se résume par l'équation bilan suivante :



Cependant, dans l'édition datant de 1986 du livre écrit par Gottschalk, la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase sont remplacées par une CoA-transférase impliquant le butyryl-CoA et une molécule d'acétate donnant une molécule d'acétyl-CoA et de butyrate. Ce changement de schéma a un impact important, car l'absence de ces deux enzymes réduirait le bilan énergétique de la cellule d'une molécule ATP. Cette modification souligne un manque de connaissances sur le fonctionnement de cette voie métabolique, ou bien une hétérogénéité de cette dernière entre les espèces de *Clostridium* appartenant au groupe butyrique.

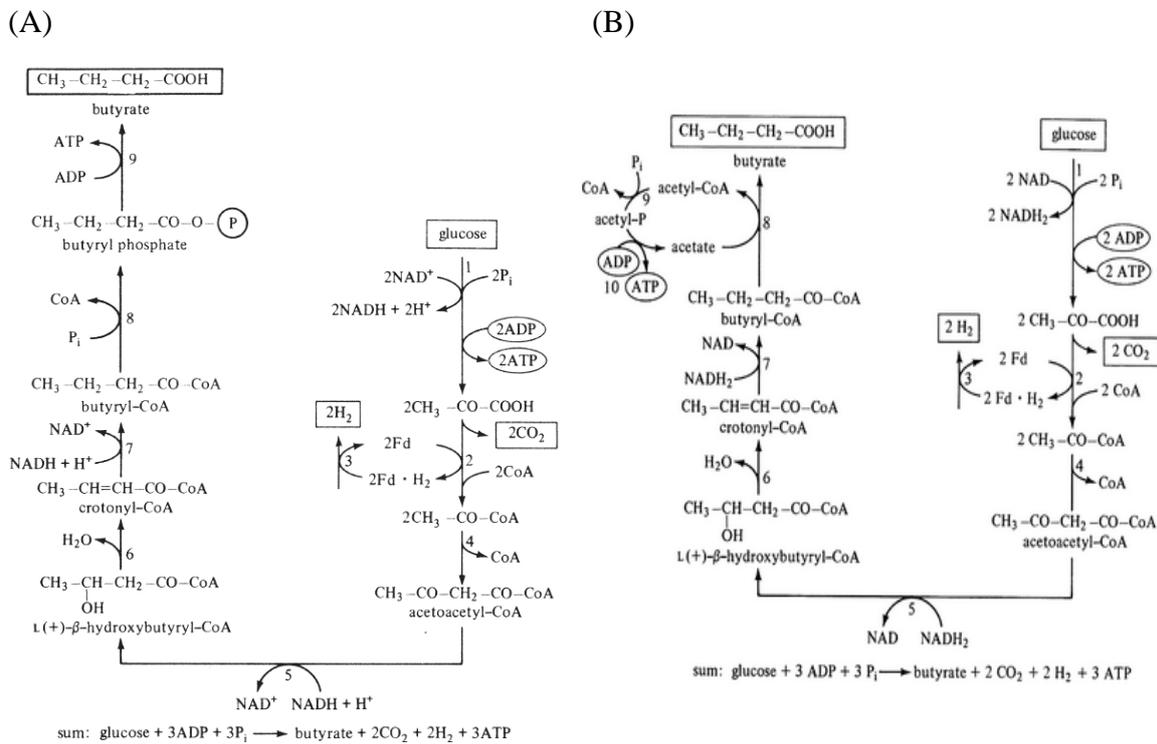


Figure 8 : Représentations de la voie métabolique de la fermentation butyrique vue par Gottschalk. (A) Edition 1979 (B) Edition 1986. 1 : système de phosphotransférase et la voie métabolique d'Embden-Meyerhof ; 2 : pyruvate :ferrédoxine oxydoréductase ; 3 : hydrogénase ; 4 : acétyl-CoA-acétyltransférase ; 5 : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; 6 : crotonase ; 7 : butyryl-CoA déshydrogénase ; 8 : CoA-transférase ; 9 : phosphotransacétylase ; 10 : acétate kinase (Gottschalk, 1979 ; 1986).

D'ailleurs, Gottschalk mentionne lui-même que le schéma qu'il propose ne correspond pas réellement à la réalité. En effet, selon les données métaboliques de la fermentation butyrique de Wood, retrouvées dans l'ouvrage de Gottschalk, l'acétate, représenté sur le schéma comme

seulement un intermédiaire de la voie (Figure 8), devrait aussi apparaître dans l'équation finale comme co-produit durant la fermentation butyrique.

D'un point de vue bilan redox, dans les deux configurations, les rapports $\text{NAD}^+/\text{NADH}_2$ et Ferrédoxine oxydée (Fd_{ox})/ Ferrédoxine réduite (Fd_{red}) du schéma s'équilibrent avec la production de 2 NADH_2 par la glycolyse et leur consommation pendant la conversion de l'acétyl-CoA en butyrate, et la production de 2 Fd_{red} par la Pfor utilisées par la suite par une hydrogénase, respectivement.

1. L'hétérogénéité de la fermentation butyrique : Exemple chez *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* et *C. kluyveri*

Depuis, ces interrogations sur la fermentation butyrique ont pu être comblées avec l'ensemble des études aux niveaux métaboliques et génétiques menées sur différentes espèces de *Clostridium* appartenant au groupe butyrique dont les plus étudiées sont *C. butyricum*, *C. kluyveri*, *C. beijerenckii*, *C. tyrobutyricum* et *C. acetobutylicum*. Après l'étape de conversion de la source carbonée, l'acétyl-CoA est le premier métabolite commun. Ce dernier se trouve à la bifurcation entre deux branches métaboliques, la branche de l'acétate et la branche du butyryl-CoA, formant la fermentation butyrique qui est le principal canal du métabolisme du carbone chez les *Clostridium* producteurs de butyrate. Ils partagent le même mécanisme, de l'acétyl-CoA à l'acétate et au butyryl-CoA (Bennett & Rudolph, 1995).

a) La branche de l'acétate

La formation de l'acétate se fait via l'intermédiaire de deux enzymes. À partir de l'acétyl-CoA, cette dernière est convertie en acétyl-P par le biais de la phosphotransacétylase (Pta) qui, à son tour, via une acétate kinase (Ack) donne de l'acétate en produisant une molécule d'ATP (Figure 9). Les gènes codant pour ces deux enzymes, *pta* et *ack*, sont retrouvés dans l'ensemble des génomes des espèces de *Clostridium* producteurs de butyrate (Lee et al., 2016).



Figure 9 : Branche de l'acétate dans la voie métabolique de la fermentation butyrique chez les *Clostridium* appartenant au groupe des producteurs de butyrate. Pta : Phosphotransacétylase / Ack : Acétate kinase.

Cette branche joue un rôle majeur dans la production de butyrate si une CoA-transférase est impliquée et pourrait également jouer un autre rôle majeur dans l'équilibre redox. Il a été démontré chez *Staphylococcus aureus* qu'une délétion de ces gènes engendrait une réduction significative du taux de croissance et de la viabilité bactérienne. Cet effet ne serait pas dû à une diminution de production d'ATP intracellulaire, mais à l'altération du redox intracellulaire soit du ratio $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}_2$ via la distribution du flux de carbone (Marshall et al., 2016).

b) La branche du butyrate

La production de butyryl-CoA à partir de l'acétyl-CoA implique plusieurs enzymes, dont une thiolase (Thl), une 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (Hdb), une crotonase (Crt) et une butyryl-CoA déshydrogénase (Bcd) avec une consommation de 2 NAD(P)H_2 et une production de H_2O . Les gènes codant pour les trois dernières enzymes forment un cluster avec deux autres gènes *etfA* et *etfB* codant pour le complexe Flavoprotéines à Transfert d'Electrons (ETF) AB (Figure 10). Ce cluster est retrouvé chez l'ensemble des espèces de *Clostridium* appartenant au groupe butyrique à l'exception de *C. kluveri* et *C. tyrobutyricum* où ces derniers comportent deux gènes en plus, *nfnA* et *nfnB*, codant pour un complexe NfnAB. Ce complexe a la particularité de produire du NADPH_2 à partir de ferrédoxine réduite et de NADH dont l'équation de la réaction (1) est détaillée ci-dessous :



A la différence des autres espèces comme *C. butyricum* ou encore *C. acetobutylicum* où l'enzyme Hbd codée par le gène *hbd* présent dans le cluster est NADH dépendante, celui chez *C. kluveri* se trouve être NADPH dépendante ce qui explique la présence du complexe NfnAB à l'origine de la réduction du NADPH_2 (Wang et al., 2010).

Il a également été démontré chez *C. kluyveri* que l'expression de ce cluster serait régulée par le promoteur *rex*. Ce promoteur a la particularité d'être régulé en fonction du ratio $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}_2$ intracellulaire. En résumé, lorsque le ratio est supérieur à 1, le NADH oxydé se fixe sur une molécule Rex qui vient à son tour se fixer sur la zone promotrice de l'ADN réprimant l'expression des gènes du cluster. Dans le cas contraire, lorsque le ratio est inférieur à 1, le NADH_2 se lie sur Rex changeant sa conformation afin de l'empêcher de se fixer sur la zone promotrice. Ce promoteur régulerait également les gènes codant pour l'hydrogénase, la butyrate : Acétyl CoA transférase, la thiolase et les gènes codants pour des activités NAD(P)H : ferrédoxine oxydoréductase (Hu et al., 2016).

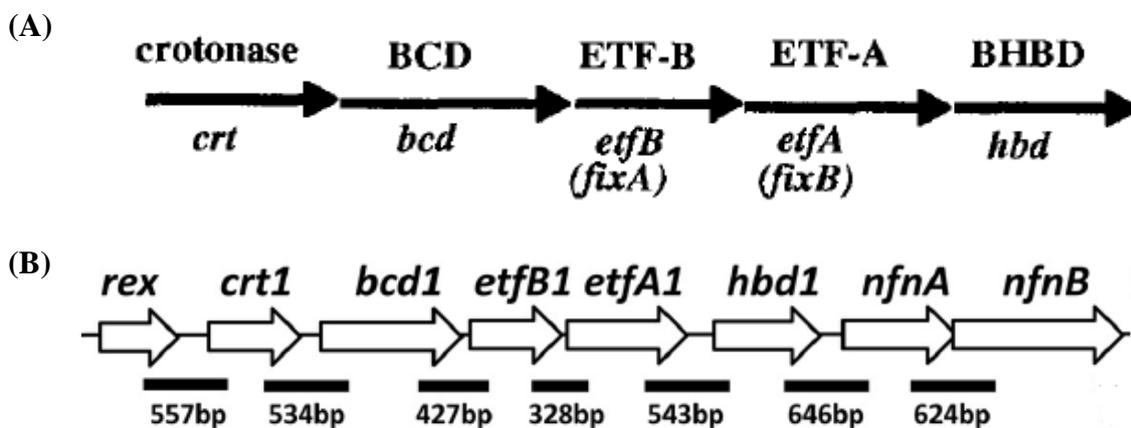


Figure 10 : Organisation de transcription des gènes codant pour les enzymes Crt, Bcd, Hbd et un complexe EtfAB retrouvés chez *C. acetobutylicum* (A) et *C. kluyveri* (B) (Bennett & Rudolph, 1995; Hu et al., 2016).

La fonction du complexe EtfAB a été mise en évidence chez *C. kluyveri*. Il est composé de deux sous-unités EtfA de 36 kDa et EtfB de 28 kDa. Les ETF sont définies comme étant des Flavine Adénine Dinucléotides (FAD) hétérodimériques contenant des protéines favorisant le transport des électrons entre une déshydrogénase et une ETF-quinone oxydoréductase. Plusieurs nouveaux mécanismes identiques ont été identifiés récemment chez différentes bactéries anaérobies. Ces derniers sont appelés « *Flavin-Based Electron Bifurcation* » (FBEB). La bifurcation d'électrons se caractérise par un flux de deux électrons se divisant vers deux accepteurs différents à un électron dont un avec un potentiel de réduction plus élevé et l'autre avec un potentiel de réduction inférieur à celui de la paire d'électrons donneurs (Buckel & Thauer, 2018).

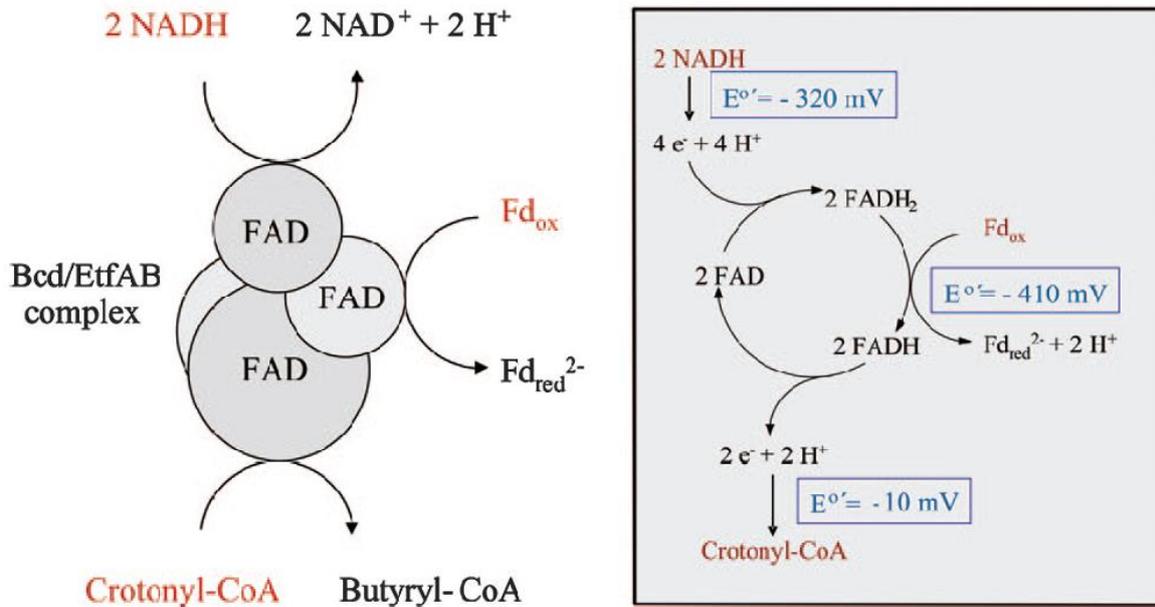


Figure 11 : Schéma du complexe de la butyryl-CoA déshydrogénase et Etf (Li et al., 2008).

Dans le cas de la formation du butyryl-CoA, ce complexe se lie à l'enzyme Bcd, formant le complexe Bcd/etfAB, afin de catalyser la réaction inverse (Figure 11). Ce dernier permet de coupler la réduction endergonique de la ferrédoxine par le NADH et la réduction exergonique du crotonyl-CoA en butyryl-CoA avec le NADH (2) (Li et al., 2008; Buckel & Thauer, 2018).



En ce qui concerne la conversion du butyryl-CoA en butyrate, différentes stratégies ont été identifiées entre les espèces. Par exemple chez *C. acetobutylicum*, la conversion du butyryl-CoA en butyrate est catalysée par les enzymes phosphotransbutyrylase (Ptb) et butyrate kinase (Buk) avec comme intermédiaire le butyryl-P et la production d'ATP. Les gènes codant pour ces enzymes, *ptb* et *buk* respectivement, forment un opéron (Yoo et al., 2017). Autre exemple concernant *C. kluyveri* et *C. tyrobutyricum*, aucun de ces deux gènes n'a été trouvé dans leur génome. Pour permettre la conversion du butyryl-CoA en butyrate, le gène *cat1* codant pour l'enzyme butyrate/acétate CoA-transférase a été identifié. Cette CoA-transférase transfère le CoA du butyryl-CoA à l'acétate pour donner de l'acétyl-CoA et du butyrate en produit final. Malgré une production d'un ATP en moins par rapport au mécanisme Ptb-Buk, ce mécanisme régénère davantage d'acétyl-CoA disponibles pour la production d'acétate et de butyrate (Seedorf et al., 2008; J. Lee et al., 2016). *C. butyricum* peut utiliser les deux mécanismes retrouvés chez *C. acetobutylicum* et *C. kluyveri* (Detman et al., 2019).

2. Le schéma métabolique de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum*

Plusieurs études portant sur la modification métabolique de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* ont été réalisées dans le but d'augmenter sa production en butyrate à partir de différents monosaccharides à pH 6 et à température optimale de 37°C. Ces dernières apportent aussi des informations sur le rôle des enzymes clés impliquées dans la voie métabolique.

Concernant la branche de l'acétate, sur glucose et xylose, la délétion de l'acétate kinase engendre une augmentation de la production de butyrate, une diminution du taux de croissance et une augmentation de la production d'H₂. Ces résultats suggèrent qu'avec la délétion de la branche de l'acétate, le flux du carbone est réorienté vers la branche du butyrate engendrant un déséquilibre du redox intracellulaire comme observé chez *S. aureus*. La délétion de cette branche ne permet pas de supprimer totalement l'acétate produit à partir du glucose, suggérant que cette dernière peut produire de l'acétate via une autre voie métabolique (Zhu et al., 2005; Du et al., 2015).

Par ailleurs, il a été démontré que *C. tyrobutyricum* était capable de générer de l'acétate via la voie métabolique impliquée dans la synthèse de la cystéine, elle-même impliquée dans celle de la voie des sulfates réduits qui permet de mobiliser le soufre nécessaire à la formation des métallos-clusters retrouvés dans les molécules de ferrédoxines.

La délétion des gènes codant pour les enzymes de cette branche n'a aucun impact sur l'activité enzymatique des enzymes impliquées dans la branche du butyrate.

Concernant la branche du butyrate, la délétion du gène codant pour la phosphotransbutyrylase n'a pas engendré de modification de la production de butyrate. Pourtant sur *C. acetobutylicum*, la délétion des gènes codant pour la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase induisait une baisse de la production du butyrate (Zhang et al., 2012).

Alors que l'ensemble des études se basaient sur un schéma de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* comme étant exactement similaire à celui de *C. butyricum* ou *C. acetobutylicum*, une étude s'est penchée sur la compréhension de cette dernière au niveau génétique, transcriptomique, et protéomique à partir d'une fermentation sur glucose (Lee et al., 2016).

Cette étude s'avère clé, car elle démontre que le schéma métabolique de la fermentation butyrique inspiré de celui chez *C. butyricum* et alloué à *C. tyrobutyricum* ne représente pas la

réalité. En effet, les analyses génomique et transcriptomique ont mis en évidence l'absence des gènes codant pour la phosphotransbutyrylase et la butyrate kinase. La formation du butyrate se ferait via une butyrate : acétyl CoA-transférase dont le gène est homologue à celui retrouvé chez *C. kluyveri*, à savoir *cat1*. De plus, le cluster de gènes codant pour la branche du butyrate regroupe également le complexe NfnAB retrouvé également chez *C. kluyveri*. Ces similitudes génétiques et fonctionnelles convergent vers les observations obtenues dans des études phylogénétiques sur l'ARN 16S des espèces de *Clostridium* montrant une homologie plus importante entre *C. tyrobutyricum* et *C. kluyveri* ou encore *C. ljundahllii* que de *C. butyricum*, *C. beijerenckii* ou encore *C. acetobutylicum*. D'autre part, il a été mis en évidence que les gènes codant pour le complexe RnF et une ATPase retrouvée également chez *C. kluyveri* étaient également présents chez *C. tyrobutyricum*. Actuellement, il existe très peu d'autres études de même genre pour corroborer les résultats obtenus par Lee et al. (2016) sur la souche type.

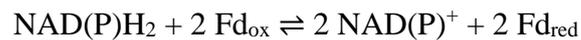
Les études de Suo et al., (2018a, 2018b, 2019), basées sur la modification génétique appliquant le nouveau schéma métabolique chez *C. tyrobutyricum* ont mis en évidence que les gènes codant pour la thiolase, la crotonase et la CoA-transférase jouent un rôle sur l'orientation de flux de carbones. De plus, ils ont démontré que les productions du butyrate, de l'acétate et des gaz étaient sensibles à l'équilibre redox intracellulaire.

Ces mêmes études ont démontré que la surexpression des gènes codant pour la thiolase, la crotonase et la CoA-transférase chez un mutant influençaient l'orientation des flux vers la branche du butyrate, confirmant l'intervention de la CoA-transférase par la conversion de butyryl-CoA en butyrate. Mais ces modifications génétiques n'ont pas permis d'augmenter la teneur en butyrate. De plus, la culture d'un mutant comprenant en plus la surexpression des gènes codant pour les enzymes de la pyruvate kinase et de la phosphofructokinase, allouant une teneur plus élevée en NAD(P)H₂ et ATP intracellulaire, a permis d'obtenir des teneurs en butyrate plus importantes. Ces observations montrent que des productions du butyrate, de l'acétate et des gaz via la voie métabolique de la fermentation butyrique, sont régulées par l'équilibre redox intracellulaire.

3. L'équilibre Redox intracellulaire : la NADH : Ferrédoxine oxydoréductase

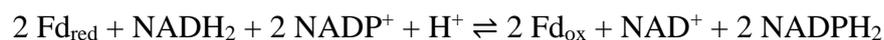
Le ratio NAD(P)⁺/NAD(P)H₂ joue un rôle crucial dans l'orientation des flux métaboliques chez les espèces de *Clostridium* productrices de butyrate. Le ratio des produits dépend du pool de NADH₂ qui peut être oxydé par le microorganisme en NAD⁺ avec la production d'H₂.

La production de NAD(P)H, venant de la dégradation de sources carbonées en acétyl-CoA, n'est pas suffisante pour permettre la réduction des produits carbonés libérés. Le métabolisme de la fermentation butyrique regroupe plusieurs réactions d'oxydoréduction impliquant de la ferrédoxine et du NAD(P)H. Des études ont démontré des activités NAD(P)H : ferrédoxine oxydoréductase (Nfor) chez les espèces de *Clostridium* productrices de butyrate dont l'équation réactionnelle est la suivante :



Ces activités fournissent les coenzymes nécessaires réduits pour équilibrer la balance redox intracellulaire. Il a été démontré qu'une quantité significative de NADH venant de ces activités est utilisée pour la biosynthèse du butyrate. Elles seraient dépendantes en fonction de la nature de la source carbonée. Par exemple, il a été démontré lors d'une fermentation sur glucose, la présence des activités NAD(P)H : ferrédoxine réductase ou encore ferrédoxine : NAD(P)⁺ réductase. Alors que sur une fermentation à partir de pyruvate, seule l'activité ferrédoxine : NAD(P)⁺ réductase était détectée (Petitdemange et al., 1976, 1979).

Aujourd'hui, les gènes potentiels codant pour ces activités ont pu être identifiés chez *C. kluyveri* et *C. tyrobutyricum*. Il s'agit de ceux codant pour les complexes NfnAB et Rhodobacter Nitrogen Fixation (RnF) (Wang et al., 2010; Lee et al., 2016). Ces complexes font partie des nouveaux mécanismes FBEB. NfnAB est une transhydrogénase à bifurcation d'électrons permettant de produire du NADPH₂ à partir de NADH₂ et de ferrédoxine (4).



Ce complexe se compose en deux sous unités NfnA et NfnB codées par les gènes *nfnA* et *nfnB* retrouvés dans le cluster de gènes codant pour les enzymes de la branche butyrique du métabolisme de la fermentation butyrique.

Le complexe RnF catalyse le transport d'électrons à force motrice d'ions de Na⁺/H⁺ à partir de NADH et de ferrédoxine (5).



Ce complexe se compose de 6 sous unités codées par les gènes *rnfA*, *rnfB*, *rnfC*, *rnfG*, *rnfE* et *rnfH*. Il est souvent couplé avec une ATPase permettant de produire de l'ATP.

Par contre, pour les espèces de *C. butyricum* ou encore *C. acetobutylicum*, les gènes codant pour leur activité Nfor n'ont pas encore été identifiés (Yoo et al., 2017 ; Zhou et al., 2020).

Pour résumer l'hétérogénéité de la voie métabolique de la fermentation butyrique, la Figure 12 regroupe l'ensemble des différents mécanismes qui peuvent être retrouvés chez les espèces appartenant au groupe butyrique.

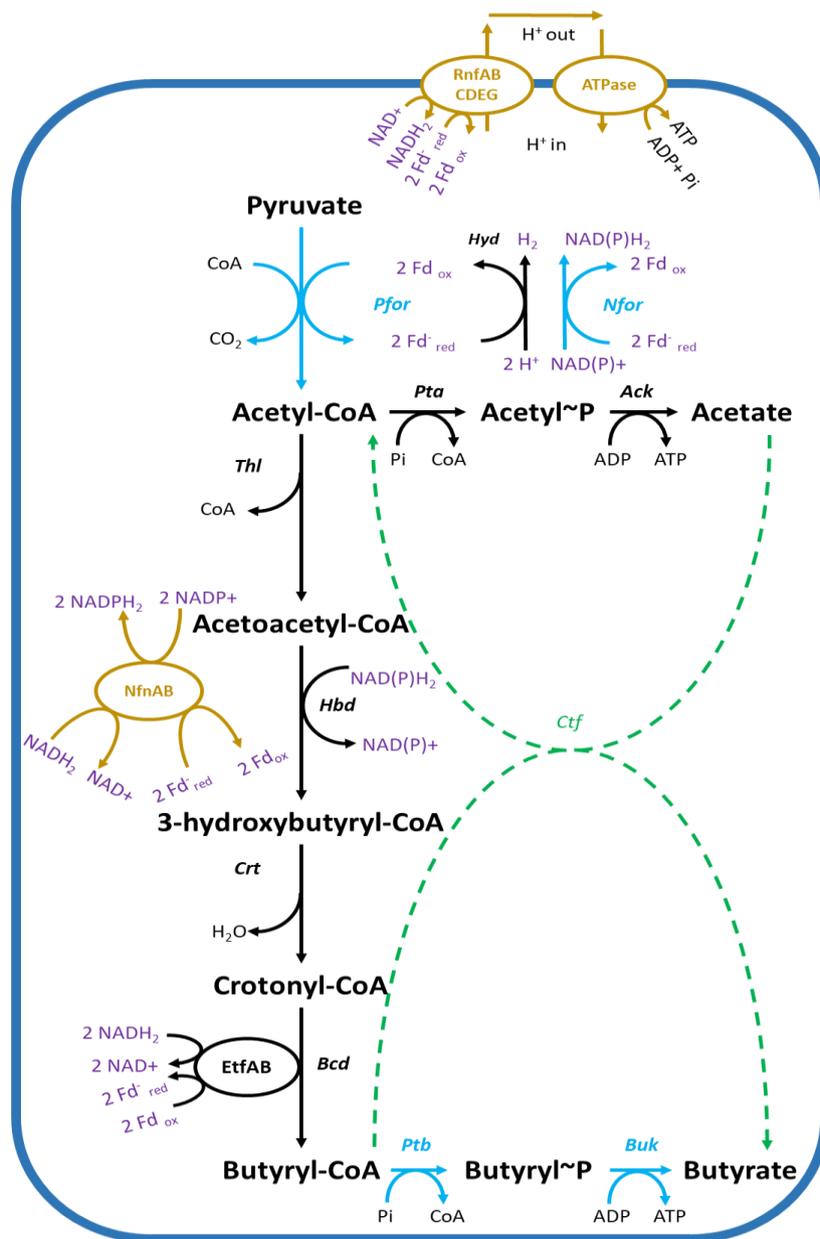


Figure 12 : Schéma général de la voie métabolique de la fermentation butyrique retrouvée chez *C. kluveri*, *C. acetobutylicum*, *C. butyricum* & *C. tyrobutyricum*. Flèches noires : enzymes communes à l'ensemble des *Clostridium* ; Flèches bleues : communs entre *C. butyricum* et *C. acetobutylicum* ; Flèches vertes : retrouvées chez *C. butyricum*, *C. kluveri* et *C. tyrobutyricum* ; Flèches jaunes : communes chez *C. kluveri* et *C. tyrobutyricum*, pfor : pyruvate : ferredoxine oxidoreductase ; Hyd : hydrogenase ; Nfor : NADH ferredoxine oxidoreductase ; Pta : Phosphoransacétylase ; Ack : Acétate kinase ; Thl : thiolase ; Hbd : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; Bcd : butyryl-CoA déshydrogénase ; Ctf : CoA-transférase ; Ptb : Phosphotransbutyrylase ; Buk : Butyrate kinase.

B. La fermentation butyrique à partir du lactate

Lors du DGT, le substrat majeur de la fermentation butyrique est le lactate. La lactate déshydrogénase (LDH) a été identifiée comme l'enzyme permettant la métabolisation du lactate par les *Clostridium* butyriques.

Il a été démontré chez *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum* que la fermentation butyrique ne pouvait se réaliser sans la présence d'acétate (Bryant & Burkey, 1956).

En 2000, McSweeney et son équipe sont parmi les premiers à proposer un schéma similaire à celui proposé dans le livre de Gottschalk (édition 1986) avec la CoA transférase, mais en impliquant le lactate comme autre source carbonée (Figure 13).

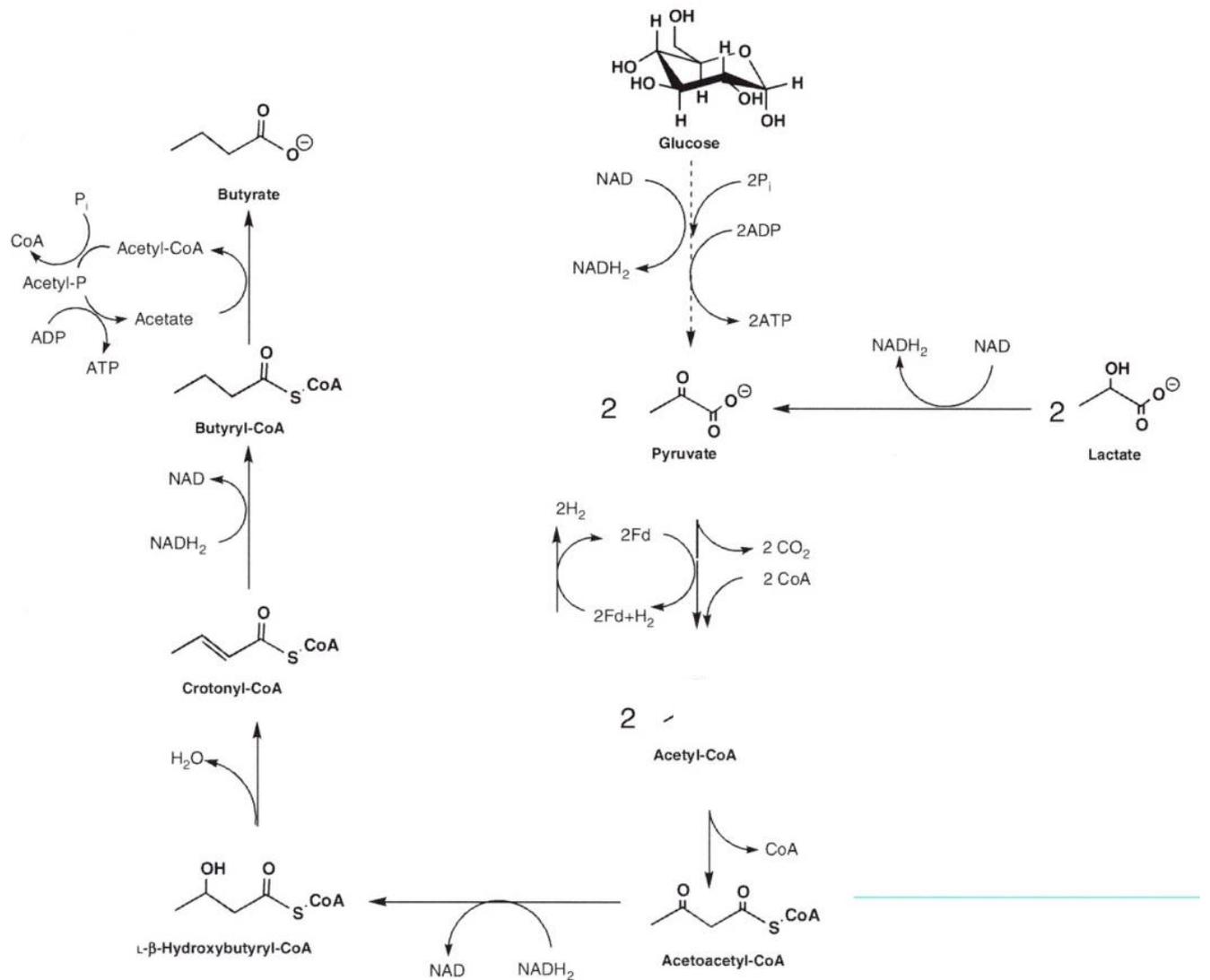


Figure 13 : Représentation de la voie métabolique de la fermentation butyrique avec deux substrats différents (McSweeney & Sousa, 2000).

Comme observé sur glucose, l'acétate est à nouveau considéré comme métabolite intermédiaire alors qu'il a été démontré chez *C. butyricum* et *C. tyrobutyricum* lors d'une fermentation sur lactate avec présence de l'acétate que ce dernier faisait partie des sources carbonées de la fermentation.

Kim and Gadd (2008) proposent un nouveau schéma de la fermentation butyrique incluant l'acétate comme source de carbone, avec le lactate et impliquant la Ptb et la Bk au lieu de la CoA-transférase (Figure 14).

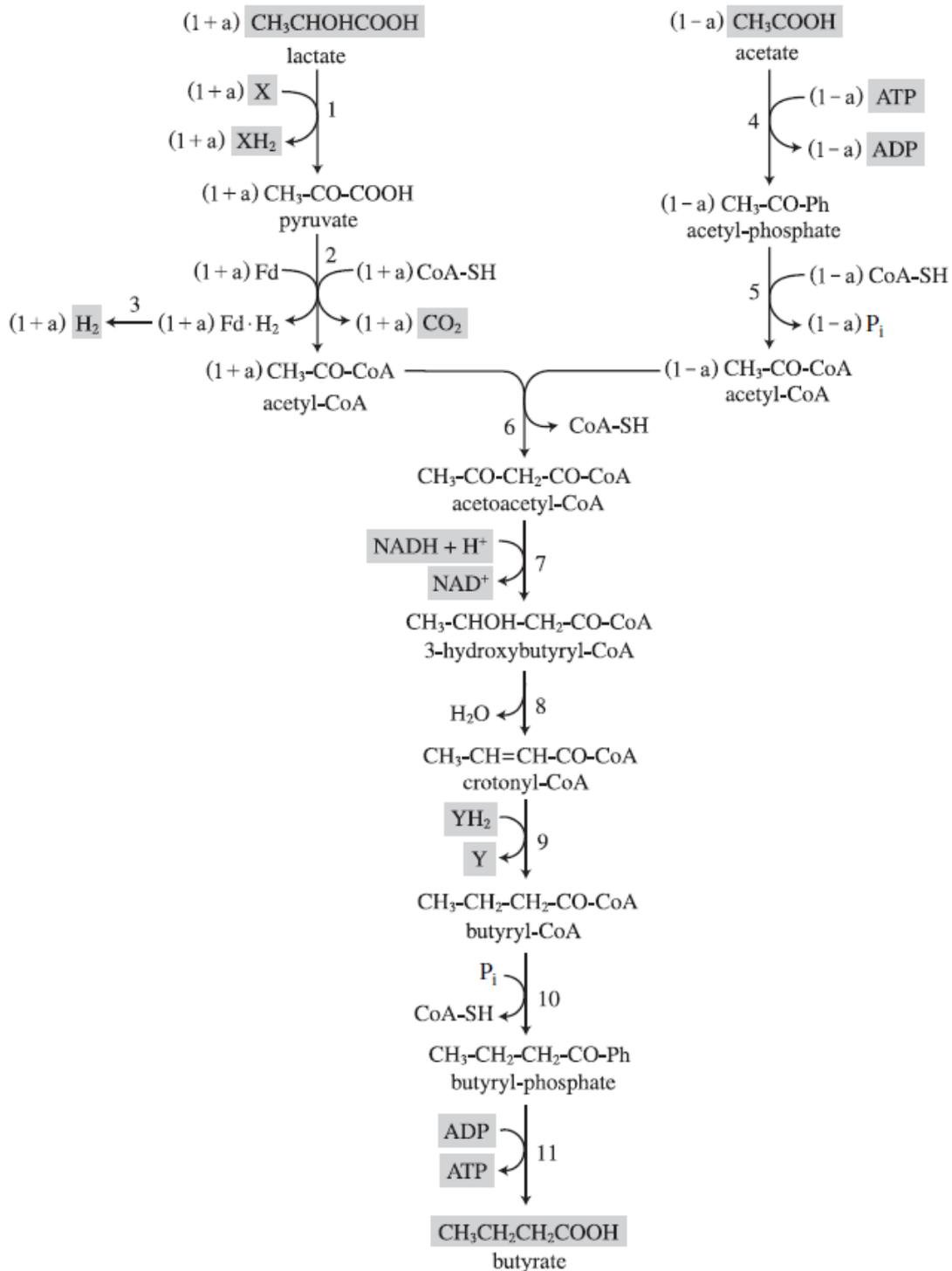


Figure 14 : Schéma métabolique de la fermentation butyrique à partir du lactate et de l'acétate. 1, lactate déshydrogénase ; 2, pyruvate:ferredoxin oxydoréductase ; 3, hydrogénasse ; 4, acétate kinase ; 5, phosphotransacetylase ; 6, Acyltransférerase (Thiolase) ; 7, 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; 8, crotonase ; 9, butyryl-CoA déshydrogénase ; 10, phosphotransbutyrylase & 11, butyrate kinase (Kim & Gadd, 2008).

D'un point de vue énergétique et équilibre redox intracellulaire, dans le cas d'une consommation du lactate et de l'acétate dans l'ordre d'un ratio 1:1, ce schéma métabolique ne permet aucun gain d'ATP et un déséquilibre entre les cofacteurs oxydés et réduits ; une impossibilité d'autant plus grande qu'il s'agit de la voie métabolique de source carbonée principale chez ces bactéries.

En revanche, un gain d'ATP est possible dans le cas où ce ratio serait supérieur à 1. Plus précisément, la consommation d'une molécule d'ATP via Ack serait compensée par la production d'ATP via la Buk. D'un point de vue équilibre redox, les électrons générés par l'oxydation du lactate engendreraient suffisamment de cofacteurs nécessaires à la branche du butyrate et de la ferrédoxine réduite venant de la Pfor utilisée pour produire de l'H₂.

Le gène codant pour lactate déshydrogénase NADH dépendante est présent dans le génome de tous les *Clostridium*. Cette enzyme intervient généralement lors d'une chute de pH. Cependant, cette enzyme ne permet pas l'oxydation du lactate. Plus précisément, le potentiel redox du couple lactate/pyruvate ($E^{0'} = -190$ mV), accepteur d'électrons, est trop élevé pour permettre la réaction avec seulement le couple NAD⁺/NADH₂ ($E^{0'} = -320$ mV), donneur d'électrons.

Néanmoins, une activité de lactate déshydrogénase NADH indépendant utilisant des flavoprotéines a pu être constatée chez *C. acetobutylicum* et *C. tyrobutyricum*. Cette enzyme, pouvant expliquer la réaction inverse de la LDH, a un pH optimum à 7,5 et est cinq fois plus active avec le D-lactate qu'avec le L-Lactate (Diez-Gonzalez et al., 1995, 1997).

Le mécanisme d'une réaction similaire a pu être identifié, pour la première fois, chez *Acetobacterium woodii*. L'étude de Weghoff et al., (2015) met en évidence un complexe cytoplasmique composé d'une lactate déshydrogénase et de EtfAB avec des flavoprotéines chez *A. woodii* permettant la réaction suivante :



Son modèle ressemblerait à celui de la Figure 15.

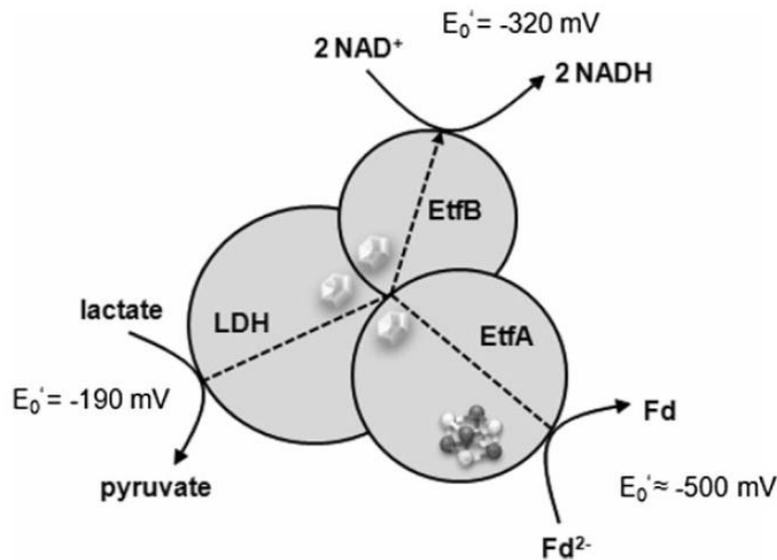


Figure 15 : Modèle proposé de la bifurcation d'électrons au niveau complexe lactate déshydrogénase/ EtfAB (Weghoff et al., 2015).

Ce complexe se compose des gènes *lctD* (LDH), *lctC* (EtfA) et *lctB* (EtfB) dont la configuration sur le génome d'*A. woodii* est en **Figure 16** : Différents gènes impliqués dans le complexe LDH/EtfAB chez *A. woodii*, *C. botulinum Ba4* et *C. ljungdahlii DSM 13528* (Weghoff et al., 2015).. De plus, il est décrit dans cet article que ce mécanisme était aussi retrouvé chez certaines espèces du genre *Clostridium* (Figure 16).

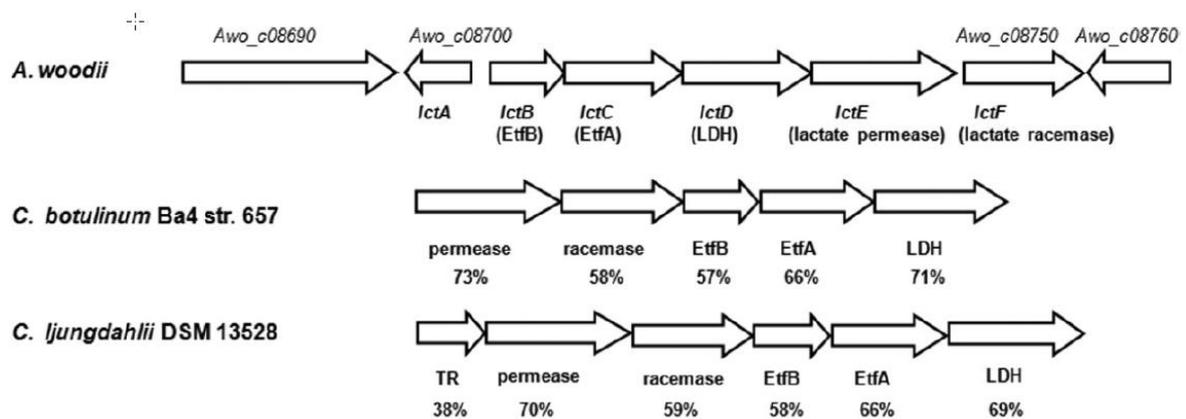


Figure 16 : Différents gènes impliqués dans le complexe LDH/EtfAB chez *A. woodii*, *C. botulinum Ba4* et *C. ljungdahlii DSM 13528* (Weghoff et al., 2015).

Plus récemment, ce mécanisme a été identifié chez *C. butyricum* (Detman et al., 2019). À l'heure actuelle, le mécanisme métabolique utilisé par *C. tyrobutyricum* n'a pas encore été

identifié pour expliquer sa capacité à réaliser l'oxydation du lactate. Aucun schéma métabolique de la fermentation butyrique à partir du lactate n'existe dans la littérature pour cette espèce.

En résumé, *C. tyrobutyricum* est une espèce anaérobie stricte, sporulée dont les mécanismes propres de sporulation et de germination, pouvant être impliqués dans le DGT, sont peu connus. Il semblerait que chez les espèces de *Clostridium*, il existe un schéma général commun. En revanche, concernant le mécanisme de germination, il existe trois schémas différents pouvant être identifiés chez les espèces de *Clostridium*. Malgré l'identification de certains germinants chez *C. tyrobutyricum*, nous ne connaissons pas encore quel type de mécanisme de germination cette espèce utiliserait.

Concernant la voie métabolique de la fermentation butyrique chez les espèces de *Clostridium* sur glucose, il existe un schéma général avec les branches de l'acétate et du butyrate avec des différences métaboliques d'une espèce à l'autre. Concernant la compréhension de celle chez *C. tyrobutyricum*, son fonctionnement a été clarifié seulement récemment grâce aux travaux de Lee et al., (2016). Par contre, le mécanisme impliqué dans la consommation du lactate par *C. tyrobutyricum* lors du DGT reste encore à éclaircir. Aujourd'hui, uniquement les mécanismes d'oxydation du lactate chez *C. acetobutylicum* ou encore *A. woodii* sont connus dans la littérature.

Chapitre 3: Potentiel d'oxydoréduction

I. Théorie

Le potentiel d'oxydoréduction (ORP), est une grandeur thermodynamique correspondant à la capacité d'un environnement à accepter ou à donner des électrons. Un potentiel redox négatif indique un environnement réduit alors qu'un ORP positif, un environnement oxydé (Larsen et al., 2015).

Le potentiel d'oxydoréduction est exprimé en Volts (V) ou millivolts (mV), donné par l'équation de Nernst associant un E_h à un couple redox (Ox/Red) :

$$E_h = E_0 + 2.3 \frac{RT}{nF} \text{Log} \frac{[Ox]}{[Red]}$$

- E_0 : Potentiel d'oxydoréduction du couple redox (mV) dans des conditions standards (P = 1 atm, T = 298 K, pH = 0, [Ox] = [Red] = mol.L⁻¹) ;
- R : Constante des gaz parfaits (8.31 J.K⁻¹.mol⁻¹) ;
- T : Température absolue (K) ;
- n : Nombre d'électrons mis en jeu ;
- F : Constante de Faraday (96500 C.mol⁻¹) ;
- [Ox] et [Red] : Concentration des formes oxydées et réduites de l'espèce (mol.L⁻¹).

Elle permet d'établir la relation entre le potentiel redox et les activités d'oxydoréduction de différentes espèces chimiques présentent dans la réaction pour des conditions différentes à celles standards.

Les réactions d'oxydoréduction se déroulent dans différentes matrices qu'elles soient liquides ou solides, et pouvant être soumises à des conditions impliquant une activité protonique (variation de pH). Ainsi, l'activité redox propre aux protons et la participation des protons dans de nombreuses réactions redox sont des éléments qui sont pris en compte dans l'équation de Nernst suivante :

$$E_h = E_0 - 2.3 \frac{mRT}{nF} + \frac{2.3RT}{nF} \text{Log} \frac{[Ox]}{[Red]}$$

Afin de s'affranchir de l'influence du pH sur l'activité redox, Leisner et Mirna (1959) ont établi une équation permettant de normaliser par le calcul une mesure E_h à pH X à une valeur E_{h7} à pH7. Cette relation prend en compte le coefficient de Nernst permettant d'obtenir une valeur de E_h indépendant au pH.

$$E_{h7} = E_h - [(7 - pHx) \times \alpha]$$

- E_{h7} : Valeur du E_h corrigée à pH 7 ;
- pH : pH de la mesure ;
- α : Coefficient déterminé expérimentalement (mV/unité pH). Ce coefficient est propre à chaque milieu.

Ce coefficient α est dépendant du milieu biologique et doit être déterminé expérimentalement. Pour ce faire, sa valeur correspond au coefficient E_h/pH de déviation du système biologique étudié.

A. Mesure du E_h

1. Sonde

Le E_h est exprimé par rapport à une électrode de référence mettant en œuvre le couple H^+/H_2 . La mesure implique deux demi-piles, l'une mettant en œuvre le couple de référence et l'autre le système dont on souhaite mesurer le potentiel. Chaque demi-pile est composée d'un soluté et d'une électrode. Les solutés sont reliés entre eux par un pont salin ; quant aux électrodes, elles le sont par un circuit électrique avec un voltmètre.

L'électrode de référence à hydrogène est une électrode à gaz qui ne permet pas son utilisation pour des raisons pratiques, techniques et de sécurité du manipulateur. Cependant, le couple redox H^+/H_2 , étant la référence même des couples redox, garde un intérêt théorique important dont la valeur du potentiel redox est son issue. Dans le domaine de l'agroalimentaire, les électrodes de référence utilisées sont similaires à celles employées pour les mesures de pH. Elles sont composées d'Argent/Chlorure et/ou Calomel. Ces électrodes de référence ont un potentiel redox constant au cours des mesures avec une tolérance de +/- 5mV. Il est basé sur le couple redox et de l'électrolyte dont les concentrations sont constantes. Ayant un demi-potentiel supérieur à celui du couple H^+/H_2 , le E_h mesuré par ces électrodes devra donc être toujours corrigé par rapport à la valeur de l'électrode à hydrogène. Afin de calculer la valeur du E_h , le

potentiel standard de l'électrode de référence (E_r) est rajouté à la valeur du potentiel mesuré (E_m).

$$E_h = E_m + E_r$$

- E_h : Potentiel redox par rapport à l'électrode à hydrogène ;
- E_m : Potentiel redox mesuré par rapport à l'électrode de référence ;
- E_r : Potentiel redox standard de l'électrode de référence.

Ce potentiel E_r est fonction de la température, du type d'électrode de référence utilisée, de la nature et de la concentration de la solution de remplissage (Galster, 1991, 2000). Son potentiel standard (E_r) peut être calculé via l'équation suivante où T est la température en °C (pour Ag/AgCl (3M KCl)) :

$$E_r(mV) = 207 + 0,8 \times (25 - T)$$

Cette équation nous permet de voir qu' E_r vaut 207 mV à 25°C et qu'il varie de 0,8 mV par degré (pour l'électrode au Calomel (KCl saturé), E_r vaut 244 mV à 25°C et varie de 0,7 mV par degré).

À la différence des électrodes de mesure, l'électrode de référence est limitée dans le temps. Ce vieillissement, impliquant des mesures de potentiels redox erronées, s'explique par un changement de concentration saline de l'électrolyte et/ou par une contamination de composés redox extérieurs venant altérer le potentiel standard.

L'électrode de mesure se comporte comme un accepteur ou un donneur d'électrons. Le métal de l'électrode est constitué le plus souvent de platine ou d'or et peut-être de formes différentes (pointe, disque, anneau). Ces deux métaux présentent des potentiels standards suffisamment élevés pour être inertes dans les milieux biologiques (Cachon & De Coninck, 2012).

Selon Abraham et al. (2007) et Topcu et al. (2008), les microélectrodes sont recommandées pour les systèmes hétérogènes et permettent de mettre en évidence des gradients E_h dans des matrices fromagères telles que le Camembert ou le Cheddar. Grâce à la mesure par capteur comme pour le pH, la mesure de E_h répond aux attentes des utilisateurs vis-à-vis des appareils de mesure en agroalimentaire. La rapidité de mesure, sa simplicité d'utilisation, un moindre coût par analyse, le fait qu'il y ait peu ou pas de préparation d'échantillon et que les résultats des mesures sur site sont cohérents avec les méthodes de référence, en font un intérêt pour les mondes académiques et industriels.

2. Sels de tétrazolium

Les sels de tétrazolium sont les outils les plus utilisés en biologie cellulaire comme indicateur de l'activité cellulaire (indicateur de viabilité, marquage histochimique) chez les eucaryotes et procaryotes. Il existe plusieurs types de sels de tétrazolium : ceux composés d'un cycle tétrazole (fermé par un azote quaternaire) nommés les sels mono-tétrazolium et ceux avec deux cycles tétrazoles pour les sels di-tétrazolium liés par des groupes aromatiques de type phényl. Il existe une multitude de sels de tétrazolium qui varient par la nature de leurs groupements aromatiques liés sur les positions 1, 2, 3, 4 de la structure centrale.

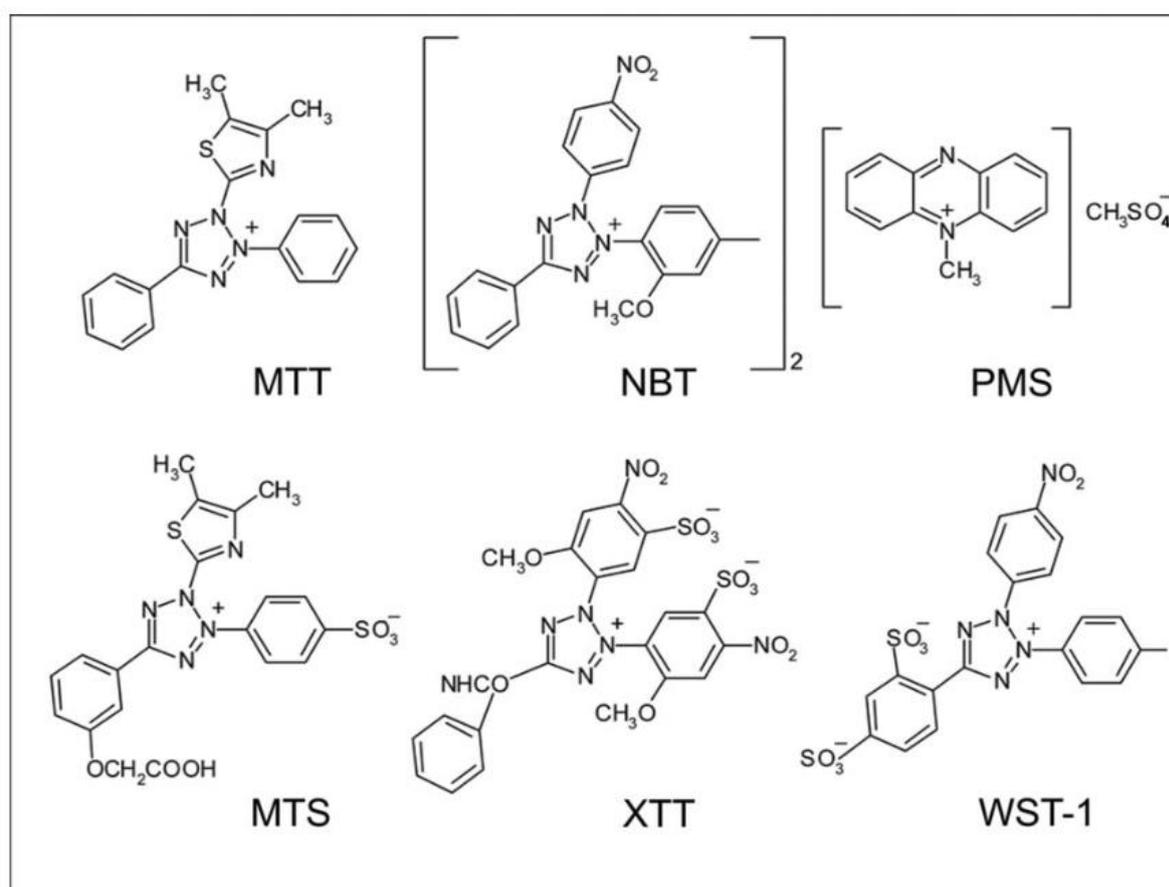


Figure 17 : Structure chimique de différents sels de tétrazolium (Berridge et al., 2005). MTT : Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide; NBT : Nitro blue Tetrazolium Chloride ; PMS: phenazinium methylsulfate ; MTS : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium ; XTT : sodium (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide ; WST : Water Soluble Tetrazolium

Leur réduction irréversible s'effectue en présence de protons H^+ . Elle provoque une ouverture du cycle tétrazole conduisant à la formation d'une molécule de formazan. Ils interagissent comme des accepteurs d'électron artificiels dans des réactions impliquant des déshydrogénases et peuvent réagir avec des cofacteurs réduits comme le NAD(P)H.

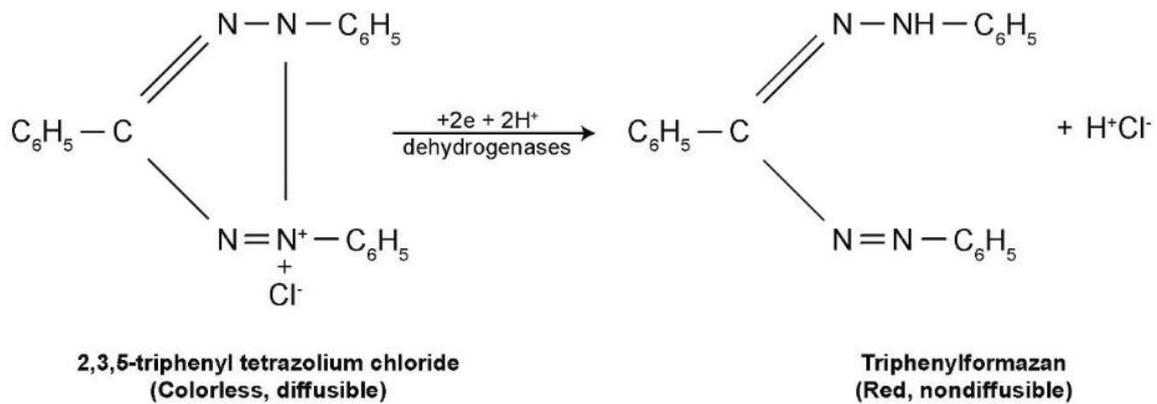


Figure 18 : Réduction d'un sel de tétrazolium en sa forme formazan : exemple du chlorure de triphényltétrazolium (TTC) (França-Neto & Krzyzanowski, 2019).

Les di-tétrazolium comme le NBT et le TNBT une fois réduits donnent des formazans de couleur entre le bleu et le noir qui se fixent aux protéines des tissus, répondant ainsi aux besoins de l'histochimie. Les mono-tétrazolium comme MTT, CTC ou WST quant à eux renferment deux catégories de tétrazolium :

- Les sels de tétrazolium qui forment des formazans hydrophobes possèdent une charge positive facilitant le passage de la molécule à travers la membrane plasmique des cellules viables via le potentiel membranaire (Berridge et al., 2005).
- Les sels de tétrazolium, qui forment des formazans hydrophiles, possèdent une charge négative empêchant le passage de la molécule à travers la membrane plasmique des cellules viables via le potentiel membranaire. Leur réduction se fera principalement autour de la membrane extracellulaire, soit via des transporteurs d'électrons membranaires (Berridge et al., 2005).

Le TTC est le premier à avoir été synthétisé et a été la base pour la synthèse d'autres sels comme le 5-Cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) et le MTT, les plus utilisés pour les cellules eucaryotes et les bactéries. Ces sels de tétrazolium sont utilisés comme indicateurs de viabilité

en spectrométrie (MTT, WST, etc.) et en fluorimétrie (CTC). La structure centrale des sels de tétrazolium est entourée de 3 groupes aromatiques. La réduction du tétrazolium incolore donne un formazan coloré par l'ouverture du tétrazole quaternaire.

En microbiologie, les deux catégories de sels de tétrazolium (formazan insoluble et formazan hydrosoluble) sont utilisées soit directement dans les milieux nutritifs de cultures, soit dans les milieux non nutritifs. La réduction des sels de tétrazolium chez les bactéries dépend de la particularité du sel de tétrazolium utilisé, de la capacité à le réduire par les bactéries durant leur phase de croissance, de leur métabolisme et des conditions de croissance. Les mono-tétrazoliums sont employés pour une mesure de résistance aux antimicrobiens, de moyen de discrimination entre les bactéries aérobies et anaérobies en milieu liquide ou sous forme de colonie, pour la mesure de la prolifération ou encore pour discriminer les bactéries en fonction de leur capacité à réduire le milieu (Jonsson, 1990; Roehm et al., 1991; Bhupathiraju et al., 1999; Michelon et al., 2013; Aguiar et al., 2017).

II. Évolution du E_h dans les produits laitiers fermentés

Le lait est un milieu liquide complexe regroupant une multitude de composés oxydoréducteurs. Le E_h du lait à 25 °C à l'équilibre avec l'air ambiant se situe généralement dans une plage de +250 à +350 mV à pH 6,6-6,7 en raison de la présence d'oxygène et de molécules naturellement présentes dans le lait telles que : les composés phénoliques, l'acide ascorbique, la riboflavine, certains métaux et les groupements thiols (Abraham et al., 2007 ; Michelon et al., 2010). Au cours de la préparation du lait avant transformation, le E_h est influencé la présence d'enzymes oxydantes ou réductrices (Fox & Kelly, 2006b, 2006a), les traitements thermiques, comme l'upérisation à haute température ou la pasteurisation. En effet, ces traitements induisent des réactions de Maillard oxydantes ou réductrices du lait impliquant des protéines ou acides aminés avec des sucres (Calligaris et al., 2004 ; Choudhary et al., 2017) et chassent l'oxygène dissous modifiant donc le E_h .

Après transformation du lait, les fromages affinés ont une valeur E_h négative (Topcu et al., 2008; Caldeo & McSweeney, 2012; Fox et al., 2015). Différentes études ont montré qu'au cours de la fabrication fromagère, les valeurs de E_h diminuent pour atteindre des valeurs négatives, comme -300 mV dans le camembert et -120 mV dans le fromage cheddar (Abraham et al., 2007). L'évolution du potentiel redox dépend du procédé de fabrication fromagère mis en œuvre et des bactéries lactiques utilisées. Les travaux de Caldeo & Mc Sweeney (2012) ont pu mettre en évidence ces différences de E_h entre différentes technologies fromagères (Figure 19).

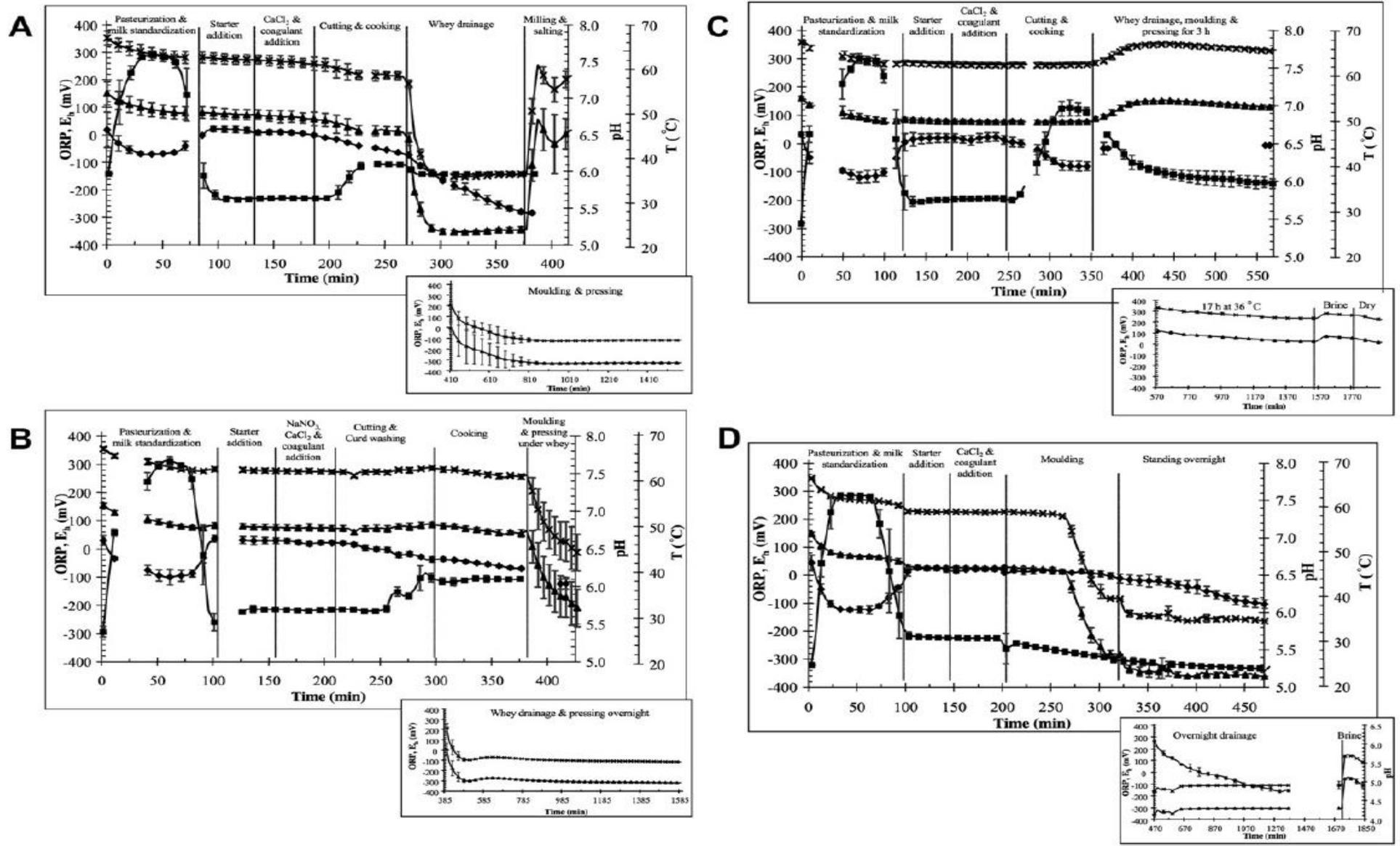


Figure 19 : Cinétique du E_h , du pH et de la $T\text{ }^\circ\text{C}$ au cours de la fabrication en b cher (5L) de différents types de fromages (A) Cheddar, (B) Gouda, (C) Emmental & (D) Camembert. (Triangles : E_h (mV) ; Losanges : pH ; Carrés : température ($T\text{ }^\circ\text{C}$) (Caldeo & McSweeney, 2012).

Green & Manning (1982) ont observé une diminution du redox dans le fromage due aux bactéries lactiques. Un fromage de type Cheddar fabriqué avec uniquement de la δ -gluconolactone pour acidifier avait un E_h de + 315 mV alors que dans le Cheddar fabriqué avec des bactéries lactiques (lactocoques) atteignait un E_h de -150 mV à -200 mV. Abraham (2007) a montré que lors des phases d'emprésurage, de brassage, de découpe du coagulum et de délactosage, le milieu reste oxydant du fait de taux persistants d'oxygène dissous entre 20 % et 60 %, puis devient progressivement réduit pendant l'étape de pressage lorsqu'aucun oxygène n'est incorporé. Cela permet ainsi aux bactéries lactiques d'exprimer leur activité réductrice.

III. Différentes méthodes pour moduler le potentiel redox dans les matrices laitières

A. L'impact de l'activité réductrice microbienne sur le E_h

La croissance bactérienne, dans une matrice alimentaire ou un milieu chimiquement défini, entraîne une modification du E_h . Les voies métaboliques bactériennes sont formées d'enchaînement de réactions dont certaines sont des réactions d'oxydoréduction utilisant différentes sources de donneurs et d'accepteurs d'électrons. L'initiation de la croissance des bactéries est souvent caractérisée par diminution du E_h , qui est la résultante de l'activité métabolique utilisant les composés oxydants dans un premier temps, comme la consommation d' O_2 dissous, et produisant des composés réduits.

1. Les bactéries lactiques

Cachon et al. (2002) et Brasca et al. (2007) ont mis en évidence les capacités réductrices de certaines espèces de bactéries lactiques permettant de diminuer le E_h initialement oxydant du lait en une valeur réductrice (-200 à -300 mV). De ce fait, il devient possible de différencier l'activité réductrice de ces bactéries par le biais de paramètres provenant de leur cinétique de réduction. Pour cela, Cachon et al. (2002) ont proposé les paramètres tels que la vitesse maximale de réduction ($V_{r,max}$) obtenue à partir de la dérivation de la cinétique de réduction et le temps nécessaire pour l'atteindre ($T_{r,max}$), ainsi que la valeur atteinte à ce temps ($E_{hr,max}$) (Figure 20).

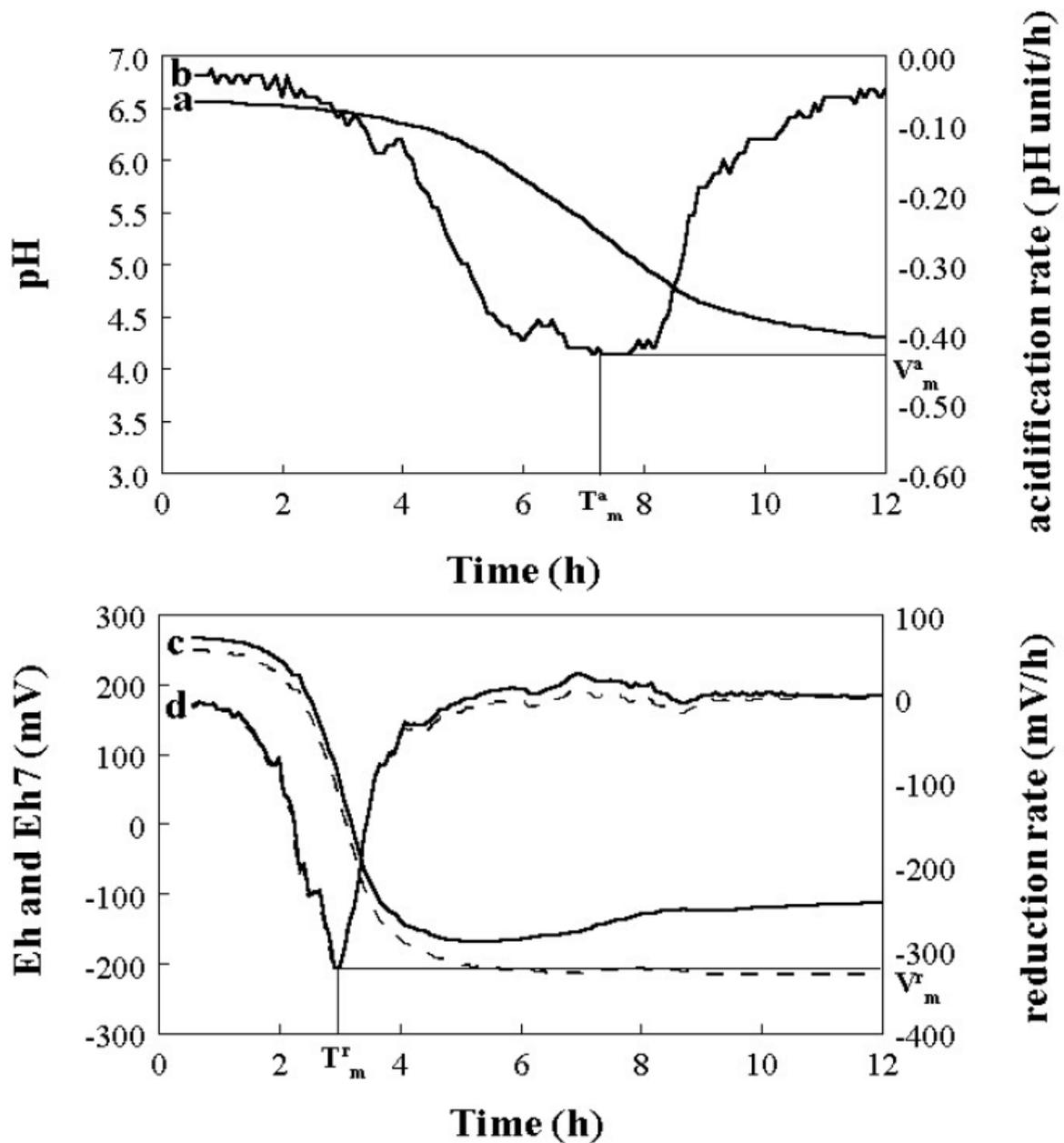


Figure 20 : Cinétiques de E_h et pH et leurs dérivées d'une culture de *Lactococcus lactis* dans du lait. (V_{am} : Vitesse d'acidification maximale ($U_{pH} \cdot h^{-1}$); T_{am} : temps pour atteindre la vitesse maximale d'acidification (h); V_{rm} : Vitesse de réduction maximale ($mV \cdot h^{-1}$); T_{rm} : Temps pour atteindre la vitesse maximale de réduction (h)) (Cachon et al., 2002).

Brasca et al., (2007) ont proposé les paramètres du Δ max qui est la différence entre deux points de la cinétique de réduction, la valeur E_h la plus faible $E_{h\ min}$, ainsi que le temps où ce $E_{h\ min}$ est atteint (T_{min}) (Figure 21).

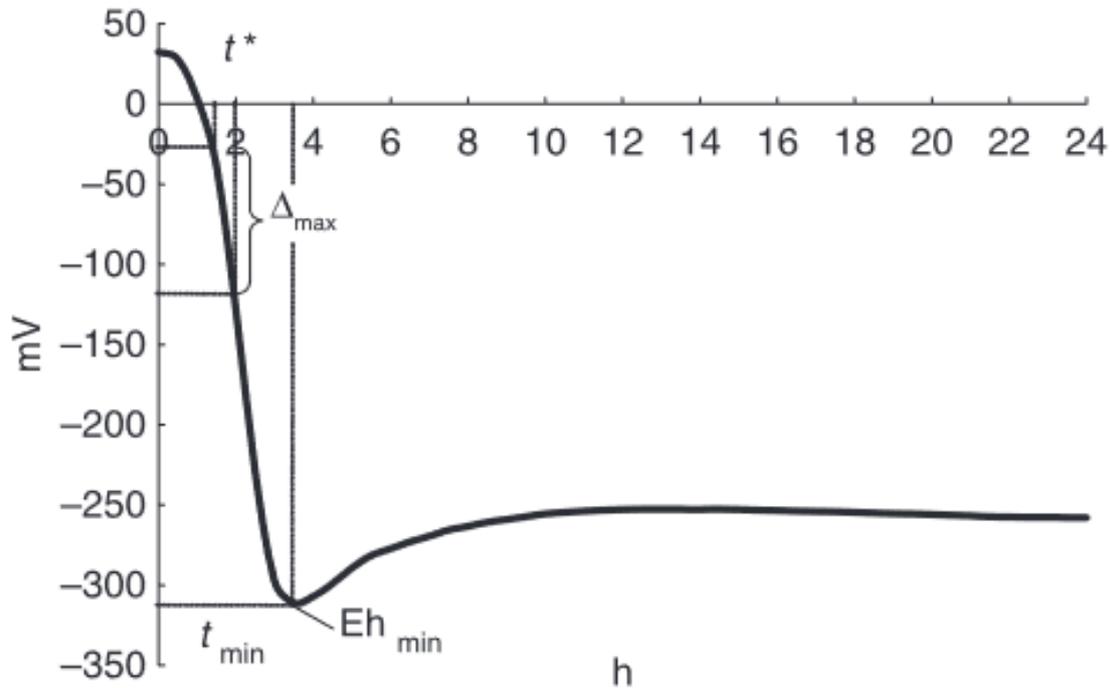


Figure 21 : Exemple de cinétique de réduction dans du lait écrémé. Δ_{\max} : Différence entre deux mesures maximales (mV) ; t^* : le temps à Δ_{\max} (h) ; $E_{h \min}$: Valeur E_h minimale de la cinétique (mV) ; t_{\min} : le temps à la valeur E_h minimale (h) (Brasca et al., 2007).

De plus, l'étude de Brasca et al. (2007) sur différentes espèces de bactéries lactiques a permis de donner un bon aperçu sur leurs activités réductrices. La Figure 22 représente les cinétiques de différentes espèces de bactéries lactiques en condition aérobie dans un milieu liquide de lait reconstitué. *Lactobacillus helveticus* est incapable de réduire le lait jusqu'à une valeur négative, tandis que *Lactococcus lactis* fait partie des bactéries les plus réductrices avec les valeurs négatives obtenues en fin de cinétique. Quant à *Enterococcus faecalis*, l'espèce se caractérise par une activité réductrice rapide.

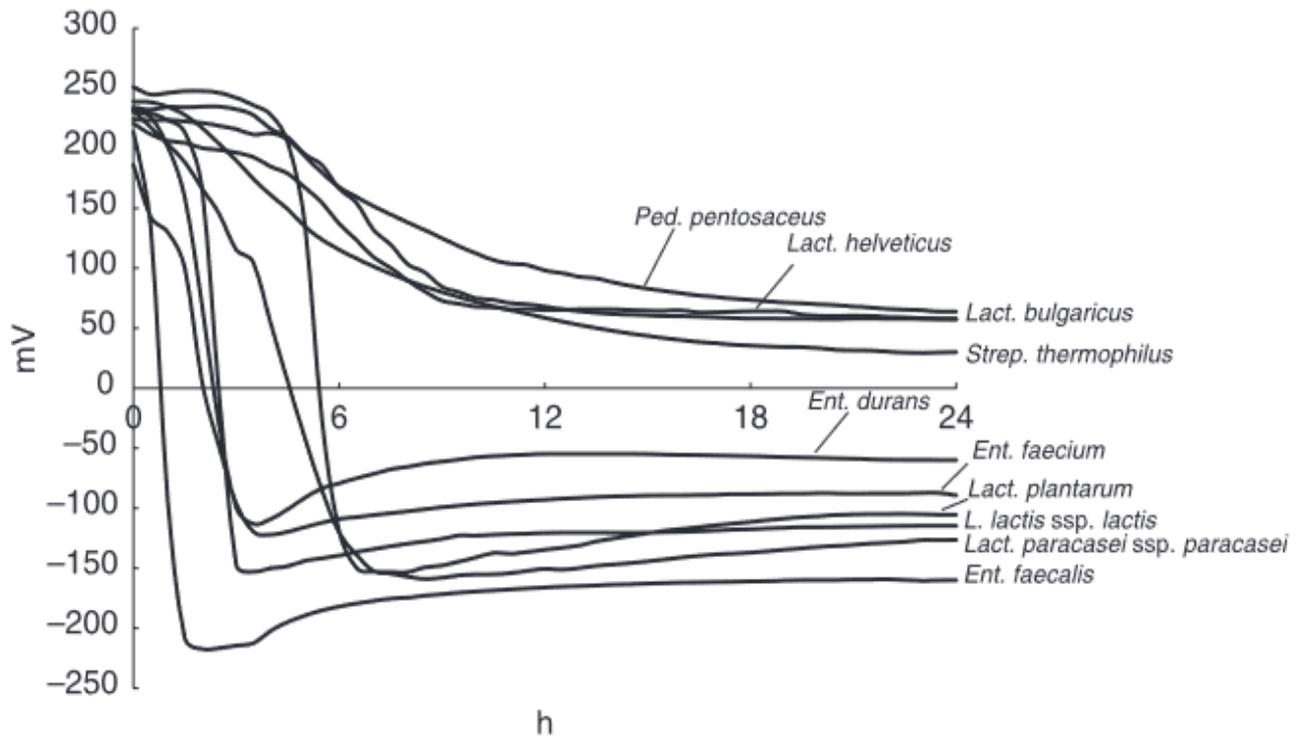


Figure 22 : Cinétiques de potentiel d'oxydoréduction chez différentes espèces de bactéries lactiques dans du lait écrémé (Brasca et al., 2007).

Streptococcus thermophilus et *Lactobacillus bulgaricus* comme *L. helveticus* font partie des espèces ne pouvant pas réduire le milieu.

Cependant, les souches d'une même espèce peuvent présenter des exceptions. Il a été observé qu'il pouvait y avoir une différence de 130 mV entre des souches de *S. thermophilus* sur le paramètre du $E_{h\ min}$ (Brasca et al., 2007). Une observation similaire a été constatée chez *L. lactis* avec une différence de 51 mV sur le paramètre de $E_{hr\ max}$ entre deux souches (Cachon et al., 2002). Des procédures similaires utilisant différents paramètres d'activité ont été proposées par l'équipe de Morandi et al. (2016) en milieu liquide, et par Michelon et al. (2010) pour le criblage des bactéries lactiques en milieu solide.

Les mécanismes impliqués dans l'activité réductrice de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ont été proposés, incluant des mécanismes de réduction des composés oxydants dans le milieu, tels que l'oxygène, et des mécanismes responsables de la stabilisation de l' E_h réducteur en milieu anaérobie (Michelon et al., 2010; Tachon et al., 2010; Michelon et al., 2013) et sont représentés dans la Figure 23.

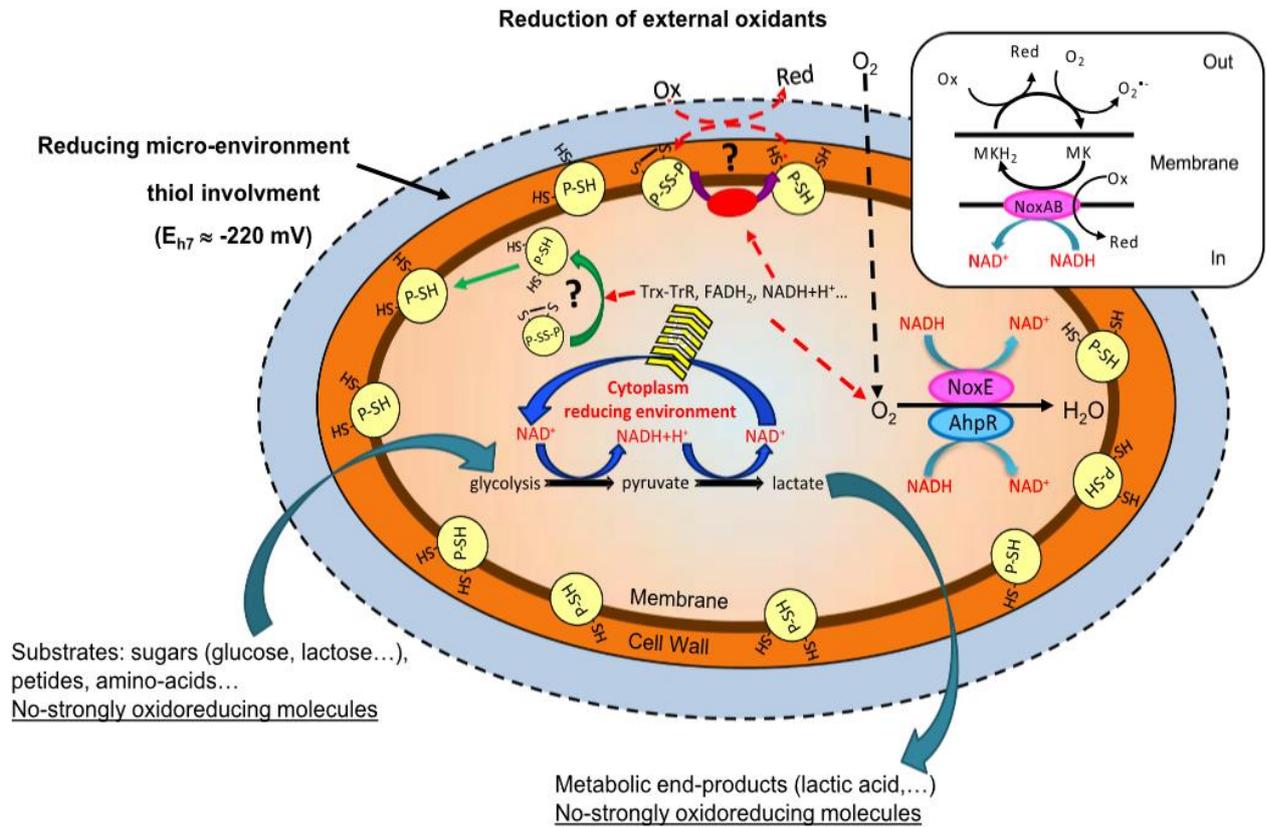


Figure 23 : Schéma résumant les fonctions cellulaires impliquées dans l'activité réductrice des *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. P-SH: Thiols; P-SSP: thiols oxydés; Trx-TrxR: système thioredoxin-thioredoxine réductase; NoxAB: NADH déshydrogénase membranaire composée de deux sous-unités, NoxA et NoxB ; NoxE : NADH oxydase ; AhpR : le complexe Alkyl hydroperoxide réductase ; Ox : molécule oxydée ; Red : molécule réduite ; MK : Menaquinone ; MKH₂ : menaquinol ; ? : hypothèse (Roussel et al., 2022).

Les ménaquinones couplées aux NADH déshydrogénases, NoxA et NoxB, et à la NADH oxydase, NoxE, sont impliquées dans la réduction en milieu aérobie (Tachon et al., 2010). Les protéines de l'enveloppe cellulaire exposant les groupements thiols exofaciaux pourraient être à l'origine de l' E_h réducteur mesuré en milieu anaérobie (Michelon et al., 2010).

Ces différences intra et inter espèces montrent tout l'intérêt et la nécessité de la sélection des souches de bactéries lactiques comme ferment en fonction de leur activité réductrice. Cette sélection permettrait de mieux maîtriser la caractéristique d'oxydoréduction des produits fermentés laitiers (Aubert et al., 2002).

2. Les bactéries d'altération

Comme pour les bactéries lactiques, les espèces de bactéries indigènes d'altération du lait peuvent aussi influencer la valeur E_h pendant l'étape de sa transformation, comme les espèces de *Clostridium*. En effet, les travaux de Langeveld et Galesloot (1971) ont démontré que le potentiel redox du fromage Gouda et Edam pouvait atteindre des valeurs E_h d'environ -120 mV durant l'affinage, alors qu'en cas de contamination par *Clostridium*, leur valeur E_h diminuait jusqu'à atteindre une valeur d'environ -300 mV. Cette chute de potentiel serait due à la capacité réductrice des espèces de *Clostridium* liée à leur germination par la libération des cystéines venant de la dégradation de leur exosporium et de leur capacité à production d'hydrogène via leur activité métabolique (Langeveld & Galesloot, 1971; Topcu et al., 2008; Janganan et al., 2016). Ce phénomène de réduction lors de la germination a également été constaté chez d'autres espèces sporulées. Ashok et Bauer (2020) ont démontré chez *Rhodospirillum centenum* (bactérie sporulée à Gram négative), qu'au cours des premières étapes de germination, les gènes (NADH déshydrogénase) impliqués dans la génération d'un potentiel membranaire pour la production d'ATP étaient surexprimés et seraient à l'origine de cette chute du potentiel redox. À l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur le E_h des fromages à pâte pressée, mais compte tenu des résultats décrits ci-dessus, et que la majorité des espèces bactériennes fréquemment isolées dans les fromages affinés (Bassi et al., 2015) sont caractérisées par une faible capacité de réduction (Brasca et al., 2007), il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une valeur E_h proche de -300 mV puissent être corrélée à la croissance des espèces de *Clostridium*.

B. Molécules à fort potentiel d'oxydoréduction

Alors que la qualité sensorielle, la durée de conservation et la fonctionnalité des produits alimentaires impliquent plusieurs mécanismes d'oxydoréduction, peu de molécules redox sont autorisées dans l'industrie agroalimentaire. Soto et al. (2019) ont utilisé de l'acide ascorbique, de la cystéine ou du tocophérol pour abaisser le E_h pendant la fermentation du lait. Dans le procédé de panification, de l'acide ascorbique a également été ajouté pour augmenter le volume du pain, améliorant la structure de la mie par action sur l'équilibre entre les ponts disulfures des résidus de cystéine dans les protéines de gluten (Grosch & Wieser, 1999).

C. Électro- réduction et température

Les traitements thermiques favorisent également l'élimination de l'oxygène dissous (dont la solubilité diminue lorsque la température augmente) et la formation de groupes soufrés réducteurs (Greenbank & Wright, 1951; Ledon & Ibarra, 2009).

L'électro-réduction est un traitement par électrolyse qui consiste à réduire une solution aqueuse (lait, eau...). Cette méthode permet d'abaisser le E_h en diminuant la concentration en oxygène dissous et augmentant la production d'hydrogène dans le lait (Bolduc et al., 2006), mais le procédé nécessite une optimisation, car l' E_h réducteur obtenu par électro-réduction n'est pas stable dans le temps. Après 4 jours de conservation, le E_h est à nouveau positif (Schreyer et al., 2008).

D. Gaz

Une méthode fiable et facile d'application pour faire varier l'environnement redox d'un milieu est la modification de la composition gazeuse comme l'oxygène, l'azote ou l'hydrogène (Ouvry et al., 2002)

En milieu biologique, l'une des molécules les plus oxydantes est l'oxygène dissous ($E_0' = +815$ mV). Par conséquent, l'élimination de ce taux d'oxygène dissous peut être l'approche la plus simple pour moduler le E_h d'un milieu biologique. La teneur en oxygène dissous peut être diminuée en utilisant le vide ou en injectant un gaz neutre comme l'azote ou un gaz réducteur comme l'hydrogène peut également être injecté dans le milieu par bullage ou dans l'espace de tête du produit. L'avantage majeur de ces gaz est qu'ils sont inodores, incolores, sans goût et non toxiques après ingestion. De plus, ils sont autorisés comme auxiliaires technologiques dans l'industrie alimentaire, convenant ainsi à une démarche respectueuse de l'environnement dans un esprit de "clean label". Cachon et al. (2002a; 2002b) ont proposé une méthode de réduction de E_h utilisant un flux d'un mélange d'azote et d'hydrogène (à 96% et 4%). Un E_h de -286 mV a ainsi été atteint dans le lait, contre +220 mV obtenus avec de l'azote pur.

E. Impact de la modulation du E_h sur les produits laitiers et les microorganismes

1. Amélioration rhéologique et organoleptique

En raison des réactions citées précédemment, le fromage affiné est essentiellement un système anaérobie dans lequel seules des bactéries anaérobies facultatives ou obligatoires peuvent se développer. Le potentiel redox peut être un paramètre important pour les micro-organismes qui peuvent se développer dans le fromage (Fox, 2004).

Green et Manning (1982) et Kristoffersen (1985) ont montré qu'un redox négatif est indispensable au bon développement de l'arôme caractéristique de certains produits laitiers fermentés comme le fromage, notamment via la production de composés thiols. Kieronczyk et

al. (2006) ont montré également qu'un E_h positif favorisait la production d'aldéhydes et de composés soufrés volatils responsables d'arômes malté, floral, fruité, amande et chou, tandis qu'un E_h négatif favorisait la production d'acides carboxyliques tels que les acides isovalérique, phénylacétique et méthylpropionique. Ledon et Ibarra (2009) ont amélioré les propriétés sensorielles en améliorant la production d'acides gras volatils et en affinant le fromage sous atmosphère réductrice. Plus récemment, Caldeo et al. (2016) et Bulat et Topcu (2020) ont montré que le potentiel redox influençait le développement de composés aromatiques volatils dans le fromage type Cheddar et le fromage blanc, respectivement, et ont confirmé qu'un potentiel redox réducteur est essentiel pour le développement de composés soufrés. De plus, un E_h négatif est supposé contribuer à la stabilité de l'arôme (Beresford et al., 2001). Ces résultats montrent l'influence du E_h sur les voies métaboliques chez les bactéries lactiques et par conséquent, l'intérêt de le moduler pour modifier le profil aromatique des matrices laitières.

L' E_h impacte non seulement le profil aromatique, mais également les propriétés rhéologiques et nutritionnelles des matrices laitières. Martin et al. (2010) ont montré l'impact de la modulation du E_h de la matrice sur les propriétés rhéologiques au cours de la fabrication du yaourt. Des conditions réductrices donnaient des yaourts ayant une viscosité apparente plus faible et ayant moins d'exsudation de lactosérum, favorisée par une meilleure agrégation des protéines.

Concernant la qualité nutritionnelle des aliments, elle est un facteur important de nos jours pour les consommateurs. Un environnement réducteur permet de préserver certains éléments nutritionnels comme les vitamines (Bolduc et al., 2006). Ainsi, le E_h , comme le pH, semble être un paramètre important pour l'industrie laitière pour améliorer ou créer de nouveaux produits laitiers.

2. Impact du E_h sur la réponse génétique et sur la réorientation des flux métaboliques chez les microorganismes

Pour leur croissance, les bactéries utilisent des substrats carbonés ou azotés nécessaires à leur production d'énergie. La métabolisation de ces substrats implique de nombreuses réactions redox et différents cofacteurs permettant de produire de l'ATP, des métabolites nécessaires à la croissance, des produits finaux. Au cours du catabolisme, ces cofacteurs impliqués, comme le NAD, NADP, le FAD ou encore la ferrédoxine (Fd), sont réduits et nécessitent d'être réoxydés afin de maintenir un équilibre redox intracellulaire. Cette réoxydation de ces cofacteurs réduits

est assurée via le transfert des électrons vers des accepteurs finaux comme des métabolites carbonés, s'il s'agit d'un métabolisme fermentaire, ou exogène comme l'O₂ s'il s'agit d'un métabolisme respiratoire. Dû à la nécessité d'échanger des électrons au cours des réactions redox intracellulaire ou extracellulaire, les variations de E_h extracellulaire peuvent impacter l'équilibre redox intracellulaire et par conséquent, l'activité métabolique qui en dépend (Hansen, 2018 ; Liu et al., 2019).

Ces impacts ont fait l'objet de plusieurs études montrant que le changement de potentiel redox d'un environnement influe sur l'expression de certains gènes et sur l'orientation des flux métaboliques des bactéries (Liu et al., 2013). Cela a été démontré chez les bactéries lactiques et également chez des bactéries appartenant au genre *Clostridium* (van Dijk et al., 2000; Martin et al., 2011; Paiano et al., 2019).

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, Kieronczyk et al. (2006) ont montré une nette influence de E_h sur le catabolisme des acides aminés (phénylalanine, leucine, méthionine) chez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. La production d'aldéhydes et de composés soufrés volatils est favorisée par des conditions oxydantes et résulte principalement de l'oxydation chimique des α-cétoacides produits par la transamination des acides aminés.

Plus récemment, l'analyse transcriptomique chez *L. lactis* au cours d'une acidification du lait avec différentes conditions redox a mis en évidence l'impact d'une augmentation du E_h sur les réponses génétiques ; en particulier sur les gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés et du pyruvate, ce qui affecteraient la libération de composés aromatiques plus tard dans la fermentation et, par conséquent, impactant la qualité du fromage (Larsen et al., 2016).

Récemment, il a été montré qu'un E_h négatif, induit par l'activité réductrice des bactéries lactiques, avait permis d'influencer la régulation des gènes de virulence des agents pathogènes en les empêchant de produire leurs entérotoxines (Nouaille et al., 2014; Nogueira Viçosa et al., 2019).

Il a également été mis en évidence des modifications du métabolisme, impliquant une réorientation de flux métaboliques, combinée à des modifications de la biochimie cellulaire en fonction de l'état redox du milieu environnant chez *Escherichia coli* (Riondet et al., 2000) avec une diminution de la production de lactate et de CO₂ et une augmentation de la production de formate lorsque l'E_h extracellulaire augmentait, ou encore chez *Clostridium thermosuccinogenes* où un E_h négatif favorisait la production de molécules réduites comme le

succinate, l'acétate, le formate et l'éthanol au détriment du lactate à partir du glucose (Sridhar & Eiteman, 1999, 2001).

En résumé de chapitre, le potentiel d'oxydoréduction est une grandeur thermodynamique correspondant à la capacité d'un environnement à accepter ou à donner des électrons. Il peut être mesuré à l'aide d'une sonde et de son interface ou bien à partir de molécules comme les sels de tétrazolium. Le potentiel redox est impliqué dans la qualité des produits laitiers à plusieurs niveaux. De nombreux paramètres physicochimiques et microbiologiques sont impliqués dans l'évolution du E_h au cours de la production laitière. Il joue également un rôle important dans le développement des microflore d'intérêt, d'altération et des pathogènes. Plus précisément, il agit simultanément sur leur métabolisme, leur structure, voire l'expression de leurs gènes.

Par conséquent, le contrôle du paramètre E_h est d'une grande importance afin de contrôler et améliorer la qualité des produits laitiers. Il existe différentes approches pour moduler le E_h dont celle d'ajout de molécules oxydoréductrices, celle utilisant une approche électro-chimique, celles utilisant des gaz neutres ou réducteurs et celles utilisant des bactéries lactiques plus ou moins réductrices. Plusieurs des mécanismes impliqués dans l'activité réductrice des bactéries lactiques ont été identifiés, incluant des mécanismes de réduction des composés oxydants dans le milieu et des mécanismes responsables de la stabilisation de l' E_h réducteur en milieu anaérobie. Ainsi, la sélection des levains lactiques en fonction de leur capacité à moduler le E_h dans les produits laitiers apparaît comme l'une des principales approches pour contrôler l'évolution du E_h au cours de la fabrication de produits laitiers.

IV. Objectifs de la thèse

Le projet ANR Food-Redox (2012-2015) a montré qu'une nouvelle voie de recherche était envisageable ; elle concerne l'impact de l'activité réductrice de la microflore technologique (microflore lactique) sur la fermentation butyrique par *Clostridium* sp. Ainsi, il a été montré un impact de la microflore réductrice sur la consommation des lactates, la production de butyrate, et le DGT (résultats Food-Redox présentés par E. Beuvier et S. Gavoye en 2015, au Centre

national interprofessionnel de l'économie laitière, représentant l'interprofession laitière nationale). Ces résultats restent cependant à approfondir. L'activité réductrice est l'aptitude d'une flore microbienne à abaisser le potentiel d'oxydoréduction (E_h) du milieu. Parmi les différentes microflore lactiques utilisées en technologie fromagère, on distingue des microflore très réductrices et des microflore peu réductrices, indépendamment de leur potentiel acidifiant (Cachon et al., 2002; Brasca et al., 2007).

Deux niveaux d'impact de l'activité réductrice sont envisagés, et par conséquent deux questions de recherche sont proposées :

- Quel est l'impact de l'activité réductrice de la microflore lactique sur la germination des spores et/ou sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium* (effet indépendant et effet d'interaction avec d'autres paramètres physicochimiques) ;
- Quel est l'impact de l'activité réductrice de la microflore lactique sur la distribution des flux métaboliques lors de la fermentation butyrique par *Clostridium* et ses conséquences sur la diminution de la production de gaz ;

Pour y répondre, trois étapes se sont succédées dans la thèse :

A. Sélection de la souche de *Clostridium tyrobutyricum* et des microflore lactiques réductrices

Le but de cette première étape était de sélectionner la souche de *C. tyrobutyricum* de l'étude, représentative de l'accident en fromagerie, mais aussi susceptible par sa caractérisation notamment d'un point de vue génomique de progresser au niveau cognitif. Puis, de sélectionner différentes bactéries lactiques étant capables de réduire la matrice fromagère et pouvant être utilisées dans la technologie fromagère. Parmi les critères de sélection des bactéries lactiques, il y a :

- Les conditions de test, le plus proche possible des conditions d'utilisation (rampes de température reproduisant le processus de fabrication fromager) ;
- Citrates négatives ;
- Faible acidification en lien avec une protéolyse lente ;
- Sécrétant aucune bactériocine inhibitrice de *C. tyrobutyricum* ;
- Ayant des cinétiques de réduction différentes.

De plus, une piste intéressante est de développer une technique de criblage des bactéries lactiques en fonction de leur cinétique de réduction par spectrométrie et complétant la méthode de criblage colorimétrique déjà existante, en se basant sur la capacité de réduction des bactéries lactiques, mise au point par Michelon et al. (2013).

B. Étude de l'impact du potentiel de réduction des bactéries lactiques sur le défaut de gonflement tardif en fabrication pilote

Cette seconde phase du projet devait permettre, en fromagerie pilote, de comparer des fabrications classiques à des fabrications utilisant des ferments à potentiel réducteur susceptibles d'inhiber les mécanismes de DGT des fromages. Le fromage type Emmental a été choisi pour cette étude. Un suivi des cinétiques pH, température et E_h a été réalisé au cours de la fabrication en cuve ainsi que pendant les 20 premiers jours d'affinage. Un suivi microbiologique des différentes espèces de bactéries lactiques et de *Clostridium tyrobutyricum* a été réalisé ainsi qu'une analyse physico-chimique comme le taux de NaCl et la matière sèche des fromages. Des scanners ont été réalisés à différents moments de l'affinage pour observer le développement des ouvertures dans le fromage.

C. Étude à l'échelle laboratoire des effets de l'environnement redox sur *Clostridium* sp.

Les milieux de culture ont été définis dans le même esprit, afin de faciliter les suivis de la germination, de la croissance, et les dosages biochimiques (extraction et dosage des métabolites, etc.).

Il s'agissait également de sélectionner une méthode permettant la production de spores pour les expériences de cinétiques de germination et la croissance des cellules végétatives, dans un contexte où les méthodes sont nombreuses et encore discutées dans la littérature. (Setlow, 2019).

La stratégie d'étude des effets redox sur la germination et la croissance a été élaborée en considérant les barrières les plus représentatives (température, substrats, pH, acides organiques) à associer aux effets redox, et comment ces derniers ont été mis en œuvre (utilisation de molécules, de gaz). Par exemple, Huchet et al. 1997 font état d'une stéréosélectivité de l'utilisation de l'acide lactique par *Clostridium tyrobutyricum* (sachant que les microflores

lactiques choisies dans l'étape 2 pourront produire un des deux isomères ou un mélange des deux).

L'utilisation de l'environnement redox pour contrôler les procédés fermentaires est de plus en plus considérée dans la littérature. Dans cette thèse, les effets redox sur le métabolisme de *Clostridium* ont été étudiés par une approche d'analyse de la distribution des flux métaboliques, qui consiste en la mise en œuvre de cultures continues en fermenteur et l'analyse des données de fermentation par calcul matriciel (Cheng et al., 2013). Cette approche complète les études de croissance, car elle permet de caractériser les états énergétiques et métaboliques en fonction des conditions redox (calcul des rendements ATP et bilans d'oxydoréduction).

Les résultats les plus caractéristiques des études de la germination des spores, de la croissance des cellules végétatives, et de la distribution des flux métaboliques, ont été étayés par des approches biochimiques (dosage des métabolites). Il devenait ainsi possible d'apporter de nouveaux éléments de connaissance sur la réponse de *Clostridium* à l'environnement redox.

Matériels et méthodes

I. Généralité

II. Souches bactériennes

Le Tableau 2, ci-dessous, regroupe l'ensemble des souches utilisées durant les travaux de thèse ainsi que leur provenance :

Tableau 2 : Espèces bactériennes.

Espèces	Souches	Collections
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	2237	CIRM-BIA ⁵
<i>Lactobacillus helveticus</i>	15009	ATCC ³
	F10 1 4	ECLAIR ⁴
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	20081	DSMZ ²
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	6400	LMG ¹
	F9 5 60	ECLAIR ⁴
	F10 7 64	ECLAIR ⁴
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	334	ATCC ³
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	2F21	ECLAIR ⁴
<i>Lactococcus lactis</i>	4F33	ECLAIR ⁴
	8F8	ECLAIR ⁴
	1S6	ECLAIR ⁴
<i>Streptococcus thermophilus</i>	20	CIRM-BIA ⁵
	FTS2	URTAL ⁴
<i>Lactobacillus gasseri</i>	20243	DSMZ ²
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	14917	ATCC ³
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	20016	DSMZ ²
<i>Levilactobacillus brevis</i>	11992	LMG ¹

¹ Laboratory of Microbiology, Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Sciences of Ghent University, Belgique

² German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Allemagne

³ American Type Culture Collection, USA

⁴ Unité de recherche en Technologie et Analyses Laitières (URTAL) - INRAE, France

⁵ Centre international de ressources microbiennes- INRAE, France

A. Stockage des souches

Les souches ont été stockées et conservées par congélation sous forme de cryotubes à - 80 °C dans du milieu approprié pour le développement, supplémenté avec 20 % de glycérol préalablement stérilisé.

B. Pré-cultures et ensemencement en fermenteur continu

À partir d'un cryotube de *Clostridium tyrobutyricum*, un étalement était réalisé sur RCM (Biokar, France) puis incubé en jarre anaérobie avec un anaérocult (Anaérocult A, Merck, France) à 37 °C pendant 72 heures. Les précultures étaient réalisées avec un ensemencement d'une colonie, recueillie sur boîte de Petri, dans des flacons Schott de 100 mL contenant 70 mL de RCM puis incubées pendant 48 heures en jarres avec un anaérocult.

Une seconde préculture était ensemencée à 1 % à partir de la première dans du milieu RCMLA puis incubée en jarre anaérobie avec un anaérocult à 37 °C. Le milieu RCMLA a été utilisé pour la seconde préculture (Tableau 3).

Tableau 3 : Composition du milieu RCMLA.

Composants	Milieu	
	RCMLA	Fournisseurs
Extrait de levure	3 g	VWR, France
Extrait de viande	10 g	VWR, France
Tryptone	10 g	VWR, France
Acétate de Sodium	3 g	VWR, France
NaCl	5 g	VWR, France
DL-Lactate de sodium 60% en solution aqueuse	23,4 mL	VWR, France
Volume final	1 L	

RCMLA : Milieu RCM avec Lactate Acétate et sans Cystéine hydrochloride, ni Glucose.

Le pH était ajusté à la valeur de l'expérimentation. Un suivi de turbidité à une absorbance de 750 nm était effectué tout au long de la seconde préculture jusqu'à l'obtention des valeurs de DO_{750nm} d'environ 1,3 correspondant à la phase exponentielle de croissance de la bactérie. Une fois la valeur désirée obtenue, un ensemencement à 1% était réalisé en fermenteur.

C. Production et purification de spores de *Clostridium tyrobutyricum*

À partir d'un cryotube de *C. tyrobutyricum*, un étalement sur boîte de Petri RCM est réalisé puis incubé à 37 °C en jarre anaérobie avec un anaérocult (Merck Anaérocult A) pendant 48 heures. Puis 200 mL de RCM modifié (RCMG) sontensemencés avec 1 colonie et incubés à 37 °C pendant 4 jours, puis à température ambiante pendant 10 jours. La composition du milieu RCMG est détaillée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Composition du milieu RCMG.

Composants	Milieu	
	RCMG	Fournisseurs
Extrait de levure	3 g	VWR, France
Extrait de viande	10 g	VWR, France
Tryptone	10 g	VWR, France
NaCl	5 g	Prolabo, France
Glucose	5 g	VWR, France
Cystéine hydrochlorure	0,05 g	Sigma Aldrich, France
Volume final	1 L	-

Des observations au microscope sont ensuite réalisées afin d'évaluer la fraction de la population sporulée de celle totale. Une fois 80-90 % de spores atteintes, le volume total de la culture est réparti en 30 mL dans plusieurs tubes à centrifugation. Les tubes sont centrifugés à 10000 g à une température de 4 °C pendant 10 minutes. Les surnageants sont éliminés et les culots re-suspendus dans 30 mL d'eau osmosée stérile à 4 °C. Les étapes de centrifugation et de resuspension sont répétées encore 2 fois. Les tubes sont ensuite stockés à 4-8 °C.

La purification a été réalisée comme expliqué dans la publication de Setlow (2019). Brièvement, les suspensions dans les tubes au frais sont centrifugées à 10000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Les surnageants sont ensuite éliminés. Les débris cellulaires et autres impuretés se trouvant en surface des culots dû à leur densité sont éliminés par un lavage en surface avec 1 mL d'eau osmosée stérile à 4 °C. Les culots sont ensuite re-suspendus dans 30 mL d'eau osmosée et les tubes sont à nouveau stockés à 4-8 °C. L'étape est répétée hebdomadairement jusqu'à qu'il n'y ait plus de suspension cotonneuse.

D. Matériels d'acquisition, calibration vérification et nettoyage des sondes E_h et de pH

Les expériences concernant l'impact du E_h et pH sur les spores de *Clostridium tyrobutyricum*, dans l'étude des cinétiques de réduction et d'acidification des bactéries lactiques et les suivis de cinétiques en cave d'affinages fromagères ont été réalisées à l'aide de sondes multiparamètres pH / E_h / T°C autoclavable (InPro3250I/SG/120/PT100, Mettler Toledo SARL, France). Les données étaient collectées en temps réel via une interface multicanaux (Prototype INRAE, France) avec le logiciel iCinac© (INRAE, France). Des sondes multiparamètres autoclavables pH / E_h / T°C (InPro3250/SG/120, Mettler Toledo SARL, France) ont été utilisées pour les suivis de cinétiques en cuve et sous presse en fabrication fromagère. Les données ont été enregistrées en temps réel via une interface multivoie et son logiciel (ABSCISS, France). Avant chaque expérience, le pH des sondes triparamètres était calibré à l'aide de solution tampon à pH 4 et pH 7. Concernant la vérification de la partie E_h des électrodes, la pastille de platine était polie à l'aide d'une poudre d'alumine (oxyde d'aluminium, Prolabo, France) afin d'éliminer l'oxydation à sa surface et ainsi de la restaurer. Les électrodes (au minimum trois par contrôle) étaient ensuite placées dans de l'eau du robinet et leur mesure comparée entre elle. Les mesures obtenues devaient être incluses dans l'intervalle de confiance calculé à 20 mV (soit 95% de niveau de confiance) pour garantir une mesure cohérente (Cachon et De Coninck, 2012). Après chaque fin d'expérience, les sondes étaient nettoyées à l'aide d'une solution de Pepsine/ HCl (VWR, France) puis stockées dans une solution 3 M de KCl (Sigma-Aldrich, France).

E. Calcul du E_h et E_{h7}

Les valeurs E_h ont été obtenues via l'équation $E_h = E_m + E_r$ ou E_m représentent les valeurs collectées en temps réel via les interfaces et E_r le potentiel standard de l'électrode de référence Ag/AgCl d'une valeur de 204 mV. Dans le but de pouvoir comparer plusieurs conditions et différentes souches entre elles sur les valeurs E_h , l'impact du pH a été corrigé par une normalisation à pH 7 pour obtenir des valeurs E_{h7} . Le E_{h7} a été calculé en appliquant l'équation de Leistner et Mirna (1959), $E_{h7} = (E_h - \alpha (7 - \text{pH}))$. Le facteur de corrélation entre pH et E_h , nommé α , a été déterminé dans les différents milieux avant expérimentation (Tableau 5).

Tableau 5 : Moyenne des coefficients α obtenue à partir des différents milieux expérimentaux.

Milieux	Coefficients α (mV/Unité pH)
RCMLA	42,53
Lait lactel BIO écrémé	33,19
Lait fabrication	32,11

F. Préparation d'aliquotes « prêts à l'emploi » de bactéries lactiques pour des ensemencements sur gélose ou en liquide

Pour le criblage des bactéries lactiques réductrices, par les méthodes ABRA, ORCA et PORA, les concentrations initiales étaient de 6 log UCF.mL⁻¹. Ainsi, comme décrit par Michelon et al. (2013), pour chaque espèce de bactérie lactique, une préculture était réalisée à partir d'une colonie, prélevée sur boîte de Petri, resuspendue dans 10 mL de milieu M17 (Difco, France) pour les lactocoques, ou MRS (Difco, France) pour les lactobacilles mésophiles ou thermophiles. Les tubes de lactocoques étaient incubés 24 heures à 30 °C et ceux des lactobacilles mésophiles et thermophiles pendant 24 à 48 heures à 37 °C et 42 °C, respectivement. Une culture,ensemencée à 1% à partir de la préculture, était réalisée puis incubée dans les mêmes conditions jusqu'à atteindre une densité optique (DO) d'environ 1 à 600 nm correspondant à une concentration d'environ 8 log UFC.mL⁻¹ pour chaque espèce de bactéries lactiques. Pour déterminer cette concentration bactérienne à DO_{600nm} de 1, des suivis de croissance ont été préalablement effectués (Tableau 6).

Tableau 6 : Corrélation entre le suivi de DO_{600nm} et les concentrations bactériennes. Equation : Equation obtenue avec le suivi de croissance bactérienne DO_{600nm} en fonction des UFC.mL⁻¹ ; R² : R² de l'équation ; Théorique : UCF.mL⁻¹ calculé à partir des équations pour DO = 1 ; Mesures expérimentales : Dénombrement à DO = 1.

Souches	Equations	R ²	DO _{600nm} = 1	
			Théorique (UFC.mL ⁻¹)	Mesures expérimentales (UFC.mL ⁻¹)
<i>L. lactis</i> IS6	$9.10^7x+2.10^7$	0,952	$1,10.10^8$	$1,73 \pm 1,42.10^8$
<i>L. lactis</i> 2F21	$3.10^8x+1.10^7$	0,983	$3,10.10^8$	$4,17 \pm 0,89.10^8$
<i>L. helveticus</i> 15009	$2.10^8x+2.10^7$	0,967	$2,20.10^8$	$3,20 \pm 0,99.10^8$
<i>L. rhamnosus</i> 6400	$4.10^8x+3.10^8$	0,919	$4,30.10^8$	$1,70 \pm 0,41.10^8$
<i>L. paracasei</i> 334	$6.10^8x+3.10^7$	0,971	$6,30.10^8$	$9,67 \pm 7,86.10^7$
<i>L. plantarum</i> 14917	$3.10^8x+2.10^7$	0,947	$3,20.10^8$	$2,35 \pm 0,21.10^8$
<i>L. reuteri</i> 20016	$2.10^8x+6.10^6$	0,976	$2,06.10^8$	$2,35 \pm 0,44.10^8$
<i>L. delbrucki</i> ssp <i>bulgaricus</i> 20081	$3.10^8x+1.10^8$	0,905	$4,00.10^8$	$1,63 \pm 0,31.10^8$
<i>S. thermophilus</i> FTS2	$6.10^7\ln(x) + 2.10^8$	0,983	$2,00.10^8$	$2,04 \pm 0,17.10^8$

Les suivis de DO à 600nm ont été réalisés avec le spectromètre NanoDrop (ThermoFisher, France) relié au logiciel NanoDrop2000 (ThermoFisher, France). À 1 de DO_{600nm}, les cultures étaient lavées 3 fois dans du PBS 1X à pH 7 (Merck Sigma Aldrich, France) et par centrifugation à 4000 g (Eppendorf 5810 R, France) pendant 15 min à T °C ambiante puis resuspendu dans un mélange de glycérol 20% (VWR, France) et du PBS. Les suspensions étaient aliquotées dans des volumes de 1 mL, puis stockées au congélateur à -20 °C.

G. Analyse des acides organiques

Les acides organiques ont été analysés par HPLC (système HPLC, Diomex (Thermo Fischer, France) - Photodiode Array Detector Ultimate 3000 DAD, et colonne 300 x 7,8 mm Aminex HPX-87H avec colonne de garde). Les conditions HPLC pour la détermination des acides organiques étaient les suivantes : température de la colonne de 30 °C ; débit, 0,6 mL.min⁻¹ ; volume injecté = 20 µL ; phase mobile, solution aqueuse d'acide sulfurique (9 mM).

H. Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats ont été réalisées à partir du logiciel Minitab (Minitab 19, 2020. PA State College, Minitab Inc).

III. Étude de l'impact de bactéries réductrices sur le développement de *C. tyrobutyricum* en fromagerie

A. Sélection des bactéries lactiques réductrices

1. Méthode de criblage ORCA

Pour la préparation des milieux gélosés du criblage selon Michelin et al. (2013), 1 volume de solution d'agar à 4,8 % p/v en surfusion (VWR, France) après un autoclavage de 15 min à 120 °C est mélangé à 3 volumes de lait Lactel bio UHT écrémé. Pour la supplémentation avec les différents sels de tétrazolium ; le tétrazolium violet (TV), le chlorure de triphényltétrazolium (TTC), le bleu de tétrazolium (BT) (Merck, Sigma Aldrich, France), la préparation est réalisée de la manière suivante : des solutions-mères à 2 g. L⁻¹ sont préparées dans de l'eau osmosée puis recouvertes d'aluminium pour préserver la solution de la lumière 24 heures avant utilisation. Ces solutions sont stérilisées par filtration à l'aide d'un filtre 0,2 µm (Clearline, Dutscher, France), puis ajoutées aux milieux gélosés en surfusion à 55 °C pour une concentration finale de 0,02 g. L⁻¹. L'agar en surfusion, le lait UHT et le sel tétrazolium sont mélangés à une température de 55 °C puis agités avant d'être coulés dans les boîtes de Petri. Les boîtes de Petri contenant les sels de tétrazolium sont ensuite stockées à 4 °C à l'obscurité. Pour la supplémentation de bromocrésol pourpre, elle est réalisée de la même manière que celle avec les sels de tétrazolium avec une concentration finale de 0,015 g.L⁻¹.

Cinq µL d'une dilution au 1/100^{ème} des tubes de bactéries lactiques prêts à l'emploi sont déposés 4 fois sur 2 jeux de 3 boîtes de Petri comprenant chacun un sel de tétrazolium, une boîte avec le bromocrésol pourpre (Merck, Sigma Aldrich, France) et une boîte de MRS ou M17 en fonction de l'espèce. Un jeu de boîtesensemencées est incubé dans une étuve à l'air libre tandis que le second est incubé sous une atmosphère N₂ dans une chambre anaérobie (Bactron 300, Blanclabo, Suisse) à la température optimale pour la croissance de la souche pendant 24 à 48 heures. Les couleurs violette, rouge ou bleue indiquent respectivement la réduction des sels de tétrazolium TV, TTC et BT en formazan. Le virement de pourpre au jaune du bromocrésol indique une acidification du milieu et donc indirectement une activité métabolique tandis que les colonies sur milieu optimal permettent de confirmer la viabilité de la suspension bactérienne

utilisée. Le score de capacité de réduction des bactéries est calculé selon l'équation binaire suivante :

$$x * 2^5 (\text{BT air}) + x * 2^4 (\text{BT N}_2) + x * 2^3 (\text{TTC air}) + x * 2^2 (\text{TTC N}_2) + x * 2^1 (\text{TV air}) + x * 2^0 (\text{TV N}_2)$$

Où x est remplacé par 1 dans le cas de l'apparition du formazan ou 0 lorsqu'il y a aucune réduction constatée. Plus le score est élevé, plus la capacité à réduire de la bactérie lactique est importante.

2. Criblage Citrate positif ou négatif

Les bactéries lactiques citrate positif ou négatif ont été différenciées selon la méthode proposée par Nickels et Leesment (1964) sur milieu KCA (Calcium Citrate Agar). À partir d'une préculture de 24 à 48 heures, incubée à température optimale, les boîtes de Petri KCA étaientensemencées avec 5 μL . Les boîtes étaient incubées à température optimale avec une première lecture à 48 heures et la seconde au bout de 5 – 6 jours. Les boîtes comptant des colonies roses ou rouges entourées d'un halo étaient considérées comme bactérie lactique citrate positive.

3. Criblage de production de bactériocine

Pour détecter toute production de bactériocine des bactéries lactiques contre *C. tyrobutyricum*, nous avons utilisé une méthode de superposition de gélose. 5 gouttes de 10 μL de la culture en phase exponentielle de la souche lactique sont déposées sur gélose M17 ou MRS (selon l'espèce lactique), puis la boîte est incubée en condition optimale pendant une nuit. Puis 5 mL de gélose de RCM en surfusion avec 0,75 % d'agar (55 °C), mélangés avec 5 log UFC. mL^{-1} de spores de *C. tyrobutyricum*, sont coulés sur les boîtesensemencées avec les bactéries lactiques. Les boîtes sont incubées à nouveau à 37°C pendant 1 à 3 jours puis les zones d'inhibition sont mesurées.

4. Screening de la capacité acidifiante des lactocoques

La méthode permettant de différencier des souches de lactocoques en fonction de la vitesse de coagulation du lait a été réalisée sur milieu FSDA (Fast – Slow Differential Agar) selon le protocole de Huggins et Sandine (1984).

5. Mesure de l'activité de réduction dans le lait par la méthode PORA

Des flacons Schott modifiés de 200 mL ont été stérilisés par autoclavage à 120 °C/ 15 minutes. Ces derniers ont été par la suite remplis avec 100 mL de lait UHT Lactel Bio écrémé. Une fois l'étalonnage/vérification des sondes triparamètres sur interface iCinac© réalisés (Cf II.D), les

sondes ont été stérilisées à l'éthanol puis rincées à l'eau osmosée stérile 3 fois et séchées à l'aide de tissus stérilisés à 120 °C pendant 15 minutes. Les sondes sont ensuite introduites dans les flacons Schott et les milieuxensemencés à 1% avec une suspension bactérienne « prête à l'emploi » (Cf II.F) pour obtenir une concentration initiale de 6 log UFC.mL⁻¹. Les flacons sont ensuite incubés en bain-marie à la température optimale de croissance pendant 16 heures ou avec un cycle de température lors d'une fabrication d'un fromage à pâte pressée type Emmental (Tableau 7), puis le logiciel de suivi cinétique des paramètres de E_m, pH et température, est lancé.

Tableau 7 : Cycle de température lors d'une fabrication de fromage type Emmental.

Etape de fabrication type Emmental	Température de fabrication (°C)	Temps (Heure)
Maturation, au dé lactosage	32	1:38
Chauffage montée en T°C	53	0:25
Chauffage maintien en T°C	53	0:25
Moulage refroidissement	51,5	0:10
Moulage	48	0:10
Pressage	48	2:00
Pressage	39	4:00
Pressage	30	9:00
Pressage	25	6:12

Les résultats des cinétiques de paramètres E_m et pH sont ensuite récupérés et analysés. Les valeurs E_m sont converties en E_h puis E_{h7} (Cf :II.E) puis des descripteurs sont dégagés des cinétiques de pH, E_h pour comparer les différentes espèces de bactéries lactiques en fonction de leur activité réductrice, comme la V_rmax (mV.h⁻¹) (Vitesse de réduction maximale ; valeur obtenue à partir de la dérivée de la cinétique de réduction) et t_rmax (h) (temps à laquelle la vitesse maximale a été atteinte) pour le E_{h7} et similairement V_amax (upH.h⁻¹) et t_amax (h) pour le pH.

6. Élaboration de la méthode de criblage ABRA

Pour l'élaboration de cette méthode, deux approches ont été envisagées : une approche par fluorescence en milieu gélosé et une seconde par absorbance en milieu liquide.

a) Approche par fluorescence

Pour la préparation des milieux gélosés, 1 volume de solution d'agar à 4,8 % p/v en surfusion (VWR, France) après un autoclave de 15 min à 120 °C est mélangé à 3 volumes de lait Lactel bio UHT écrémé. Pour la supplémentation avec le sel de tétrazolium soit le 5-Cyano-2,3-ditolyl tétrazolium chloride (CTC) (Merck, Sigma Aldrich, France), la préparation est réalisée de la manière suivante : une solution mère à 2 g.L⁻¹ est préparée dans de l'eau osmosée puis recouverte d'aluminium pour préserver la solution de la lumière 24 heures avant utilisation. Cette solution est stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre 0,2 µm, (Clearline, Dutscher, France) puis ajoutée aux milieux gélosés en surfusion à 55 °C pour une concentration finale de 0,02 g. L⁻¹. L'agar en surfusion, le lait UHT et le sel tétrazolium sont mélangés à une température de 55 °C puis agités avant d'être coulés dans des plaques noires 96 puits stériles à fond plat (Greiner, Merck, France). Pour la supplémentation de bromocrésol pourpre, elle est réalisée de la même manière que celle avec le sel de tétrazolium avec une concentration finale de 0,015 g.L⁻¹ puis coulée dans les plaques 96 puits. Les plaques sont ensuite stockées à 4 °C à l'obscurité. Cinq µL d'une dilution au 1/100^{ème} des tubes de bactéries lactiques « prêts à l'emploi » (concentration finale : 6 log UFC. mL⁻¹) sont déposés dans chacun des puits. La fluorescence des plaques a été suivie à l'aide d'un lecteur de plaque SynergyMX (Thermofischer, France) et le logiciel Gen 5, avec une excitation à 430 nm et une absorbance à 630 nm pendant 16 heures à température optimale pour la culture bactérienne (30 °C pour les lactocoques, 37 °C pour les lactobacilles mésophiles et 42 °C pour les bactéries lactiques thermophiles).

b) Approche par absorbance

(1) Elaboration du milieu de criblage

L'objectif était d'élaborer un milieu de criblage qui regroupe les caractéristiques du lait tout en permettant de réaliser des lectures par absorbance. Ainsi, différentes formulations de milieux ont été testées (Tableau 8).

Tableau 8 : Formules des différents milieux de criblage pour ABRA.

Milieux (pour 100 mL)	SL'	SL	SELL'	SELL	Fournisseurs
Solution de lactose (96 g.L⁻¹)	25 mL	25 mL	25 mL	25 mL	VWR, France
Glycéro phosphate de sodium	∅	1,9 g	∅	1,9 g	VWR, France
Extrait de levure	∅	∅	0,25 g	0,25 g	VWR, France
Eau osmosé	74,5 mL	74,5 mL	74,5 mL	74,5 mL	-
TTC (4 g.L⁻¹)	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	Sigma Aldrich, Merck, France

Les milieux ont été stérilisés à 120 °C/ 15 min par autoclave sans les solutions de lactose et de TTC qui ont été stérilisées séparément par autoclavage ou filtration à 0,2 µm, respectivement, puis ajustées à pH 6,6. Le milieu permettant une croissance pour toutes les espèces de bactéries lactiques étudiées et une réduction du TTC, a été retenu puis supplémenté avec différentes concentrations de lait Lactel bio UHT écrémé. Différentes concentrations ont été testées ; 0,1%, 1 %, 2%. La concentration permettant la meilleure croissance des bactéries lactiques, une réduction du sel de tétrazolium, et une lecture par absorbance a été retenue. Par la suite, elle a été supplémentée avec 0,2 g.L⁻¹ de water soluble tétrazolium 8 (WST8) (Interchim, France), qui une fois réduit donne un formazan soluble dans l'eau à l'instar du TTC.

(2) Cinétique d'absorbance

Dans des plaques 96 puits transparentes à fond plat (Greiner 96, Dutscher, France), des ensemencements à 1% à partir des tubes de bactéries lactiques « prêts à l'emploi » dans un volume final de 200 µL de milieu de criblage avec WST8 ont été réalisés. Des ensemencements similaires ont été effectués dans le milieu de criblage sans WST8. Les cinétiques d'absorbance à 460 nm ont été obtenues avec le lecteur de plaque SynergyMx couplé au logiciel Gen 5 à température optimale pour les espèces bactériennes, et cela, pendant 16 heures. Concernant le traitement des cinétiques, pour chaque point, les valeurs sur milieu de criblage sans WST8 ont été soustraites à celles avec WST8 afin de s'affranchir de l'impact de la turbidité des croissances bactériennes. À partir de cette cinétique, des paramètres descripteurs sont dégagés pour

comparer les souches de mêmes espèces de bactéries lactiques en fonction de leur activité réductrice comme le V_{absmax} (Abs.h^{-1}) (Vitesse d'absorbance maximale ; valeur obtenue à partir de la dérivée de la cinétique) et t_{absmax} (h) (temps à laquelle la vitesse maximale a été atteinte).

B. Fabrications fromagères

1. Plan expérimental des fabrications

Une fabrication se résume à un maximum de 4 cuves comportant chacune une modalité différente. Au total, 6 fabrications ont été réalisées ; ci-dessous le Tableau 9 détaillant le plan expérimental :

Tableau 9 : Plan expérimental détaillé des fabrications fromagères. (Lc : Lactocoques ; Lb : Lactobacille; R : réduit Rapidement ; L : réduit Lentement ; Témoin positif : fabrication sans bactérie réductrice ; Témoin négatif : fabrication sans bactérie lactique réductrice sélectionnée, ni de spores de *C. tyrobutyricum*).

Nombre de fabrication	Numéro des Cuves	Souche <i>Clostridium</i>	Modalités	N° fromage
1	1	CIRM BIA 2237	Lc R	1
	2		Lc L	2
	3		Lc R + Lb R	3
	4		Témoin positif	4
2	1		Témoin positif	5
	2		Lc R + Lb L	6
	3		Lc R	7
	4		Lc L	8
3	1		Lc R + Lb R	9
	2		Témoin positif	10
	3		Lc R + Lb L	11
	4		Lc R	12
4	1		Lc L	13
	2		Lc R + Lb R	14
	3		Témoin positif	15
	4		Lc R + Lb L	16
5	1	∅	Témoin négatif	19
	2	∅	Témoin négatif	18
	4	CIRM BIA 2237	Témoin positif	17
6	3	∅	Témoin négatif	20
	1	CIRM BIA 2237	Témoin positif	21

Ce plan expérimental a été élaboré dans le but de randomiser les différentes modalités en fonction des semaines de fabrication et du type de lait. D'un point de vue statistique, cette configuration nous permet de lisser les effets du lait et l'effet de semaine, et ainsi d'exploiter au mieux les résultats qui seront obtenus au cours des différentes fabrications.

2. Technologie fromagère

Les fabrications des fromages type Emmental ont été réalisées à partir de lait de vache récupéré auprès de l'ENILBIO de Poligny. Pour chaque fabrication, le diagramme de la Figure 24 : Diagramme de fabrication type Emmental (MG : Matière grasse ; MP : Matière protéique) a été respecté, avec un décalage dans le temps de 30 minutes entre chaque cuve (Annexe 3).

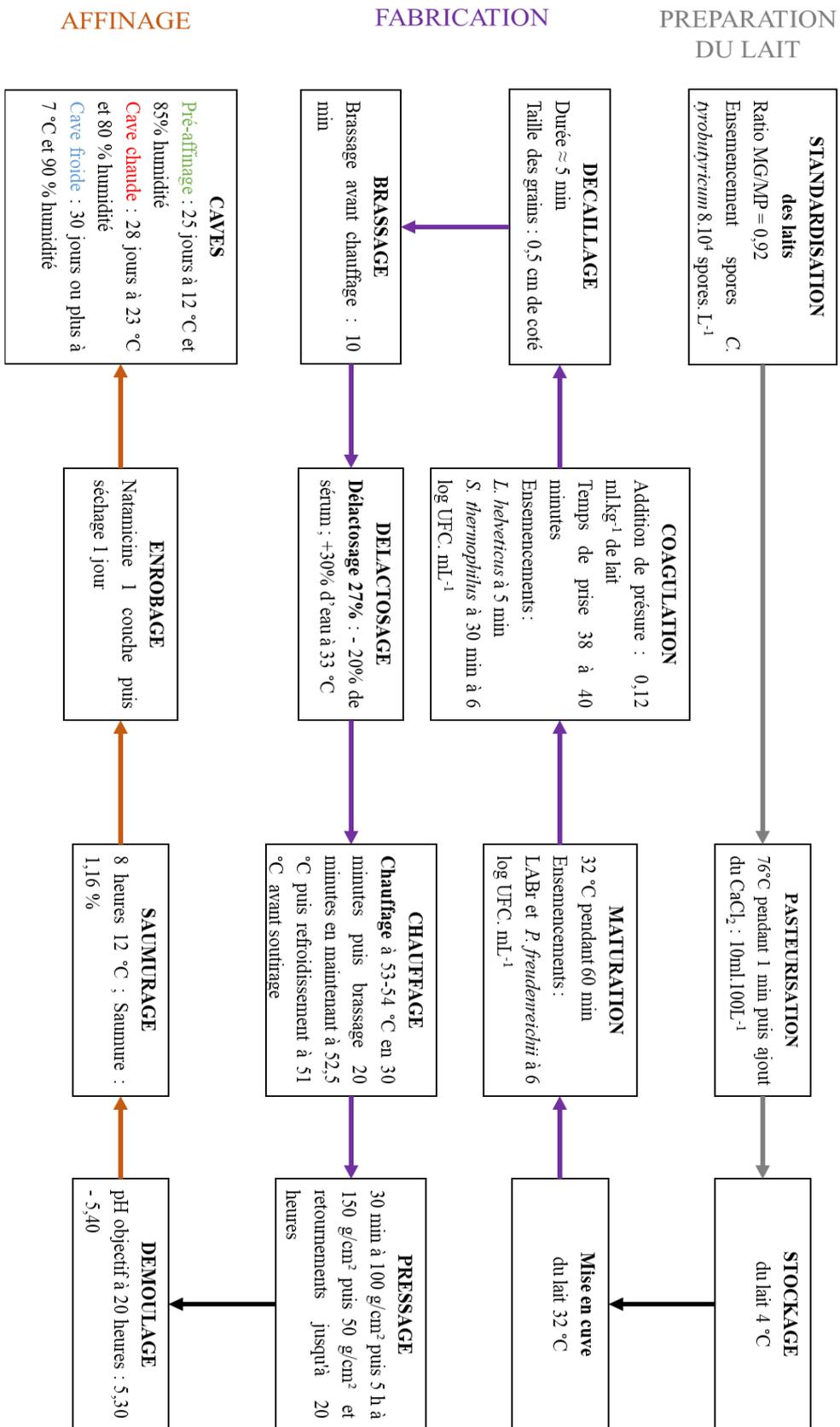


Figure 24 : Diagramme de fabrication type Emmental (MG : Matière grasse ; MP : Matière protéique).

Après standardisation du lait, les spores de *C. tyrobutyricum* étaient ajoutées pour obtenir une concentration finale de 8.10^4 spores.L⁻¹ de lait. Du chlorure de calcium a été ajouté à 0,01 %. Chaque cuve contenait 40 kg de lait. Les levains utilisés pour les fabrications sont les suivants :

- *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (EYES 2 LYO, Dupont Danisco, France) ;
- *Streptococcus thermophilus* (TA 60 LYO, Dupont Danisco, France) ;
- *Lactobacillus helveticus* (LHB-02, Chr. Hansen, France).

Les levains, les lactocoques, et les lactobacilles réducteurs sélectionnés ont étéensemencés à 10^6 UFC.mL⁻¹ en fonction des besoins de l'expérience. Quant à l'étape d'affinage, les fromages ont été cerclés puis affinés dans des sacs ouverts pour éviter toutes contaminations croisées et recouverts d'une couche de natamycine.

a) Préparation des bactéries lactiques réductrices comme levains pour fabrication fromagère

À partir d'un cryotube, une préculture est réalisée dans 5 mL de milieu optimal, puis incubée à 30 °C toute la nuit (M17 pour lactocoques et MRS pour lactobacilles hétérofermentaires facultatifs). Une seconde préculture est effectuée en ensemençant à 2% 5 mL de milieu optimal avec la première préculture. La seconde préculture est incubée pendant 8,5 heures à 30 °C. Une culture dans du milieu optimal à un volume approprié au besoin du fromager est réalisé avec un ensemencement à 2% de la seconde préculture. La culture est incubée pendant 8,5 heures à 30 °C puis bloquée au froid à 4 °C. Puis un dénombrement est réalisé la veille de la fabrication pour déterminer la concentration bactérienne et ainsi permettre au fromager d'ajouter le levain à la concentration désirée, dans notre cas, $6 \log$ UFC.mL⁻¹ pour l'ensemble des bactéries lactiques réductrices.

3. Suivis analytiques

a) Plan général des analyses au cours de chaque fabrication

Pour chacune des fabrications, un suivi cinétique E_h/ pH/ T a été réalisé ainsi que des suivis analytiques : microbiologie, physico-chimique et scanner (Tableau 10).

Tableau 10 : Plan des analyses réalisées au cours des fabrication et affinage des fromages type Emmental.

Stade	Analyses réalisées
Lait Brut	Microbiologie : <i>Clostridia</i> (Totaux) et Germes totaux, Coliformes
Lait pasteurisé	Microbiologie : Germes totaux, Coliformes, <i>Clostridia</i> (Totaux)
Lait avant emprésurage	Microbiologie : Streptocoques thermophiles, Lactobacilles thermophiles & hétérofermentaires facultatifs, Lactocoques, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Clostridia</i> (cellule végétative/spore)
Fromage J+1	Fromagerie : Scanner (*) Microbiologie : Streptocoques thermophiles, Lactobacilles thermophiles & hétérofermentaires facultatifs, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , Lactocoques, <i>Clostridia</i> (cellule végétative/spore) Analyses Physicochimiques : Lactate, acétate, butyrate, propionate, citrate
Fromage J+13	Fromagerie : Scanner Microbiologie : Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Clostridia</i> (cellule végétative/spore) Analyses Physicochimiques : Lactate, acétate, butyrate, propionate
Fromage J+24	Fromagerie : Scanner Microbiologie : Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Clostridia</i> (cellule végétative/spore) Analyses Physicochimiques : Lactate, acétate, butyrate, propionate
Fromage J+31	Fromagerie : Scanner Microbiologie : Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> , <i>Clostridia</i> (cellule végétative/spore) Analyses Physicochimiques : Lactate, acétate, butyrate, propionate
Fromage J+55	Fromagerie : Scanner Microbiologie : Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs, <i>Clostridia</i> (cellule végétative/spore) Analyses Physicochimiques : Lactate, acétate, butyrate, propionate
Fromage J+72	Analyses Physicochimiques : Taux de NaCl, MG et ES

(*) Le scanner a été effectué pendant l'étape de saumurage. Le lendemain tôt, pendant l'étape de l'enrobage de la seconde face des fromages, les sondes étaient nettoyées et recalibrées puis

introduites dans les fromages pour le début du préaffinage, engendrant une coupure du suivi T °C/ E_h/ pH pendant l'étape de saumurage + 8 - 12 heures.

b) Techniques de prélèvements sur fromages

Les prélèvements sur fromage ont été réalisés en appliquant les réglementations de l'ISO 707 : 2008. À partir de sondes pour fromage stériles ($\varnothing = 25\text{mm}$ soit environ 31 g de fromage), pour chaque jour d'analyse, deux prélèvements ont été réalisés, de manière symétriquement opposée, et avec une inclinaison à 60° de la surface du fromage (Annexe 2). Chaque trou de sonde a été comblé en laissant la sonde de prélèvement recouverte de colle alimentaire tout au long de la période d'affinage (Figure 25). Des sondes en PVC biseauté, stérilisées à l'éthanol lors des prélèvements, ont été fabriquées préalablement pour en obtenir suffisamment tout au long des fabrications et de permettre également de réaliser des scanners des fromages.



Figure 25 : Fromages type Emmental avec les sondes en PCV au cours de l'affinage.

c) Cinétiques de E_h/ pH O₂ et température

Des suivis de cinétiques E_h/ pH / T °C à l'aide de sondes tri paramètres ont été réalisés au cours de la fabrication et jusqu'à J+20 jours d'affinage. De plus, en cuve, un suivi de l'O₂ dissous a été réalisé avec une sonde optique InPro6860i/12/120/mA (Mettler toledo, France) jusqu'à fin de pressage. L'étalonnage des sondes O₂ sur deux points a été effectué en 2 étapes. La première permettait de réaliser le zéro à l'aide d'une solution de Na₂SO₃ à 10 g.L⁻¹ et la seconde à l'air libre.

Au cours des fabrications, les sondes triparamètres avec l'interface ABSCISS (Cf II.D) ont été utilisées pour obtenir les cinétiques de réduction, d'acidification et de température jusqu'à l'étape de démoulage. Pour permettre de continuer le suivi de l'évolution de ces paramètres à l'étape de pressage, les moules ont été perforés. Au démoulage et jusqu'à la fin du saumurage, les sondes triparamètres ont été remplacées par celles avec l'interface iCinac© pour les cinétiques de réduction, d'acidification et de température au cours des 20 premiers jours d'affinages. Un prétrou de sonde fromagère, incliné vers le bas et situé dans les 5 premiers centimètres de la hauteur des fromages, a été réalisé aux premiers jours d'affinage pour introduire les sondes triparamètres. Pendant l'étape de préfabrication, un échantillon du lait a été prélevé puis utilisé pour déterminer le coefficient α via une acidification à l'acide lactique de ce dernier.

d) Analyse des acides organiques

Au cours de l'affinage, des dosages par HPLC (Cf II.G) du propionate, de l'acétate, du lactate, du citrate et du butyrate ont été effectués lors de l'affinage à J+1, J+12, J+24, J+31 et J+55. Après décongélation à 4 °C, les sondes de fromages ont été mises à température ambiante, puis préparées de la manière suivante :

- J+1, J+12 et J+24 : retrait des croûtes inférieures et supérieures (environ 5 mm), pelage de tout le tour de la sonde sur environ 1 mm.
- J+30 et J+55 : seules les croûtes sont enlevées en raison des ouvertures importantes

Une fois parées, les sondes de fromages ont été coupées en rondelles, broyées et pesées pour obtenir exactement 2 g. Dix mL d'acide sulfurique 50 mM (VWR, France) sont ajoutés et les tubes incubés en bain-marie 40 °C pendant 15 minutes. Les échantillons sont homogénéisés à l'aide d'un Ultra-Turrax, 1 minute à vitesse max (24000 t/min), puis centrifugés à 4 °C, 30 minutes, 3200 g (Eppendorf 5810 R, Sigma Aldrich, France) et placés dans un bain de glace fondante pour permettre le retrait de la matière grasse en surface. Deux mL de surnageant clairs sont prélevés, centrifugés à 2800g pendant 5 minutes à 20 °C puis filtrés à l'aide d'un filtre seringue PVDF 0,2 μ m avant injection.

e) Analyses microbiologiques

Au cours de la fabrication du lait avant pasteurisation et après pasteurisation des échantillons ont été prélevés pour déterminer la teneur en coliformes, de la flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR), de spores de *Clostridium* butyrique. Pour les coliformes, le milieu Violet Red Bilar Agar (Difco, France) a été utilisé, pour la FMAR, le milieu PCA (Plate count agar,

VWR, France) et pour les spores, le milieu RCM modifié avec du rouge neutre selon la méthode proposée par Jonsson (1990). Quant aux levains, des dénombrements ont été réalisés sur milieu de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco, France) pour les lactobacilles mésophiles et thermophiles (incubation pendant 72 heures à 37 °C et à 42 °C, respectivement), sur M17 pour les lactocoques et les streptocoques thermophiles (incubation pendant 24 heures à 30 °C et 48 heures à 42 °C, respectivement).

Au cours de l'affinage, les croûtes des sondes des fromages J+1, J+12, J+24, J+31 et J+55 ont été supprimées, et les sondes parées en petits morceaux. Ces morceaux sont dilués à 10% dans du CTS (trisodium citrate, VWR, France) à 2% puis broyés au stomacher® pendant 2 fois 5 minutes avec 30 secondes de pause pour obtenir une suspension bactérienne du fromage. À partir du jus de l'échantillon, des dénombrements microbiens sont réalisés sur milieu FHL (Facultative Heterofermentative Lactocilli) pour les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (incubation en anaérobiose à 37 °C avec Anaérocult A (Merck, France) pendant 3 jours), (Demarigny et al., 1996) ; sur milieu RCM modifié avec du rouge neutre (Sigma Aldrich, Merck, France) pour *C. tyrobutyricum* (incubation en anaérobiose à 37 °C avec anaérocult A (Merck, France) pendant 48 heures) (Jonsson, 1990) ; et, selon Drinan et Cogan (1992), sur milieu Sodium Lactate Agar Cloxacillin (SLAC) pour les bactéries propioniques (incubation en anaérobiose (Anaerocult A, Merck, France) à 30 °C avec une lecture à 4 jours, puis à 7 jours).

Les dilutions ont été réalisées à l'aide d'eau peptonée (WVR, France) et l'ensemencement des boîtes de Petri à l'aide du WASP Spiral Plater (Microbiology, international, USA) combiné avec une pompe VS 602 (Microbiology, international, USA).

f) Analyses physico-chimiques

Pour déterminer l'extrait sec du fromage, une dessiccation d'un échantillon par étuvage à 102°C durant une durée de 20 h a été réalisée. La quantification de la masse d'eau évaporée est obtenue par pesée de l'échantillon de fromage avant et après dessiccation selon la norme FIL : 4A, 1982.

La teneur en matière grasse (MG) dans les fromages a été obtenue en utilisant la norme AFNOR NF B .35-350 ; 1998 et la méthode butyrométrique proposée par Heiss (1961). Elles consistent en la dissolution d'une masse de fromage en milieu acide et à chaud afin de libérer la phase grasse dont la quantité sera mesurée après séparation des phases par centrifugation.

IV. Étude de l'impact du E_h sur *C. tyrobutyricum* en laboratoire

A. Effet du E_h sur la germination

1. Méthode de culture et modulation du E_h du milieu

Des suivis de cinétique de E_h , pH et T ont été réalisés dans des flacons Schott de 200 ml modifiés (Figure 26).

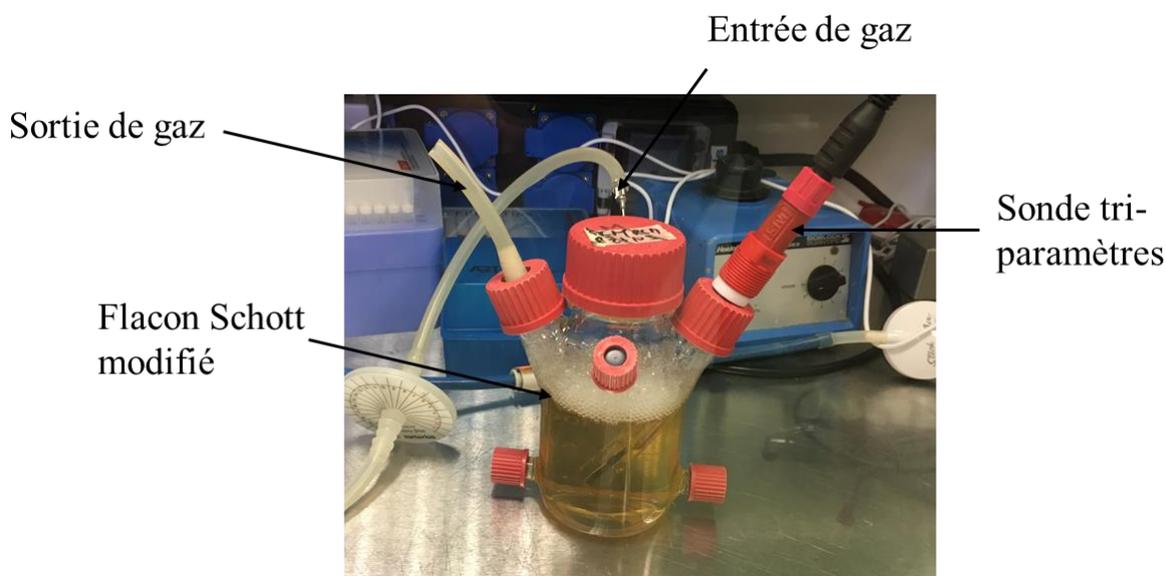


Figure 26 : Montage type des flacons Schott utilisés pour étudier l'impact du E_h sur la germination chez *C. tyrobutyricum*.

Les flacons Schott comportant le milieu RCMLA ajusté aux pH 6,6 ou 5,3 étaient stérilisés à 120 °C/ 15 minutes par autoclavage. Les sondes triparamètres étaient étalonnées, vérifiées (Cf II.D) puis stérilisées à l'éthanol à 70 % puis rincées à l'eau osmosée stérile 3 fois et séchées à l'aide de tissus stérilisés à 120 °C pendant 15 minutes. Les sondes étaient ensuite introduites dans les flacons Schott, puis les flacons dans une chambre anaérobie (Bactron 300, BlancLabo, Suisse) conditionnée avec du N_2 (AirProduct, France) ou un mélange N_2/H_2 (AirProduct, France) avec une proportion de 96 % pour 4%, respectivement. L'enceinte anaérobie était maintenue à 37 °C à l'aide d'un Airtherm ATX (World Precision Instruments, Inc, USA). L'utilisation de ces deux gaz a permis d'obtenir différentes valeurs de E_h dans le milieu de culture par le biais d'une étape de bullage (6 heures) à l'aide d'une pompe injectant le gaz présent dans l'enceinte. La chambre anaérobie comprenait également une sonde oxygène (OLCT 60, Oldham, France) reliée à une centrale de détection Oldham MX15 (Oldham, France) pour détecter toutes contaminations de l'atmosphère par l' O_2 . Une fois les valeurs E_h désirées atteintes, le bullage était arrêté et les flacons ensemencés à 1 % avec des suspensions de spores

de *C. tyrobutyricum* de concentration initiale de 5 log UFC. mL⁻¹. L'acquisition des données des cinétiques de réduction et acidification a été réalisée à l'aide de l'interface iCinac©. Le temps de latence (t_{Lat} en heure) avant germination a été déterminé à partir du point correspondant à la valeur E_{h7} avec une différence de 20 mV avec celle au temps 0 heure. Un plan factoriel a pu être réalisé avec les différentes combinaisons E_{h7} et pH puis une surface de réponse a été obtenue à partir d'une matrice binaire réalisée avec le logiciel Excel.

2. Suivi de croissance et analyse des acides organiques

Un suivi de la croissance bactérienne a été réalisé par spectrométrie à 600 nm (Nanodrop 2000, Nanodrop, Thermofisher, France) tout au long des expériences ainsi que des suivis de la consommation du lactate, acétate et de la production de butyrate.

Les concentrations de lactate, acétate et butyrate ont été obtenues par HPLC (Cf II.G). Pour obtenir les échantillons, 15 mL de culture ont été prélevés puis filtrés à l'aide d'un filtre à 0,2 μ m (millipore, Merck, France). Les surnageants ont été par la suite congelés à -20 °C avant analyse. Avant analyse, les échantillons de surnageant ont été décongelés dans un bain-marie à 22 °C pendant 15 min (température finale 22 °C), puis homogénéisés et immédiatement filtrés à l'aide d'un filtre 0,2 μ m (Clear line, Dutscher, France). Cinq mL environ étaient aspirés dans une seringue en polyéthylène, munie ensuite d'un filtre seringue en PVDF (Polyfluorure de vinylidène) de porosité 0,2 μ m et de diamètre 13 mm (Agilent ref. 5190-5261). Les 5 premières gouttes étaient éliminées, puis 2 piluliers HPLC munis de réducteur étaient remplis jusqu'à la dernière graduation. Les piluliers étaient mis sur l'injecteur à 10 °C 30 min minimum avant injection.

B. Effet du E_h sur l'orientation des flux métaboliques

1. Séquençage du génome de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237

C. tyrobutyricum a été cultivé dans du milieu RCM (Biokar, France) à 37 °C en chambre anaérobie. L'isolement et le séquençage de l'ADN génomique ont été réalisés par Genoscreen, France. L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du kit Qiagen Genra Puregene et l'ADN a été quantifié par fluorescence à l'aide du kit Qubit dsDNA BR (double-stranded DNA 36 Broad-Range). Les bibliothèques de séquençage ont été préparées avec le kit de préparation d'échantillons Illumina Nextera XT 37 et séquencées à l'aide d'une plateforme de

séquençage Illumina HiSeq 2 × 100 bp. L'analyse de la qualité des données brutes a été réalisée avec FastQC v0.11.5 et l'élimination des séquences contenant des nucléotides indéterminés ou de petites tailles (<60 pb) ou un score Phred inférieur à 30 a été réalisée avec Prinseq v0.20.4 (16). L'assemblage de novo qui se compose de 93 scaffold, a été réalisé à l'aide de SPAdes v3.10.1 (tailles k-mer de 21, 33,55 et 77). L'assemblage a été vérifié en calculant l'indice Reads Mapped Back to Contigs (RMBC) à l'aide de BOWTIE v2.1.0 avec des paramètres standard et en évaluant la profondeur du séquençage des scaffolds à l'aide de SAMtools v1.5. Les scaffolds avec une valeur inférieure à 200 pb ont été retirés. L'annotation a été effectuée à l'aide de Prokka v1.11 avec les bases de données HMM et UniProt en prédisant les cadres de lecture ouverts (ORF) et HMMER v3.1b2 avec la base de données EggNog v4.5 pour une annotation supplémentaire des ORF.

2. Recherche bio-informatique

Pour les mécanismes de germination, de sporulation et du métabolisme de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum*, les comparaisons des séquences nucléiques ou protéiques ont été réalisées à partir du logiciel en ligne Blast sur le site NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Johnson et al., 2008) et des databases Genbank (Benson et al., 2012), Kyoto Encyclopedia of Genes And Genomes (KEGG) (Kanehisa et al., 2017) et Uniprot (The UniProt Consortium, 2019). L'interprétation des résultats obtenus à partir des « query cover » a suivi la démarche détaillée dans la Figure 46.

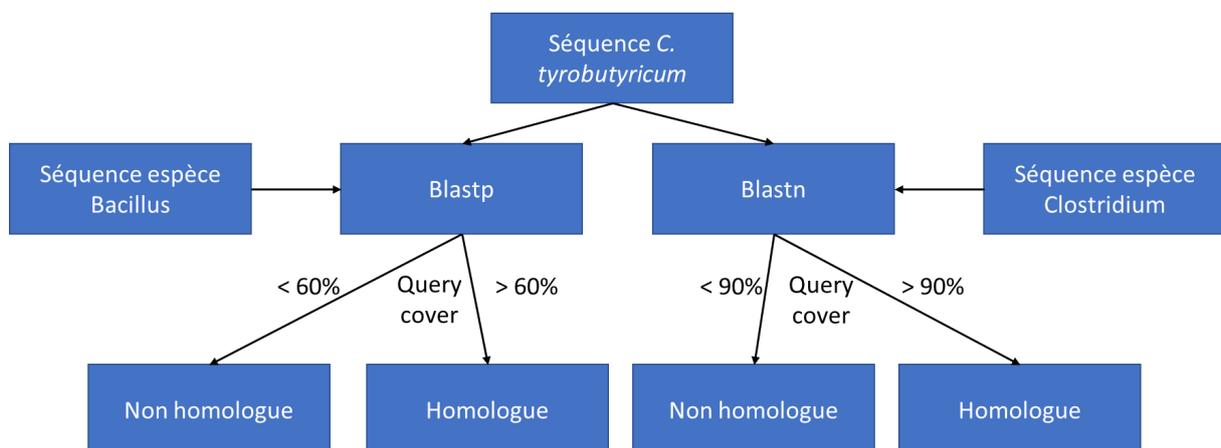


Figure 27 : Arbre de décision en fonction des résultats obtenus en bio-informatiques. Blastp : comparaison entre différentes séquences protéiques ; Blastn : comparaison entre différentes séquences nucléiques.

Concernant l'identification du mécanisme impliqué dans l'oxydation du lactate chez *C. tyrobutyricum*, les séquences des protéines EtfA et EtfB ont été recherchées dans la séquence

du génome des espèces suivantes : *Acetobacterium woodii* DSM1030 (RefSeq : NC_016894), *Clostridium kluyveri* DSM555 (RefSeq : NC_009706.1), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (RefSeq : NC_003030.1), *Clostridium butyricum* KNU-L09 (RefSeq : NZ_CP013252.1), *Clostridium beijerenckii* DSM791 (RefSeq : NZ_CP073653.1), *Clostridium tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 (RefSeq : NZ_CP038158.1) et *Eubacterium limosum* (RefSeq : NZ_CP019962.1).

Une base de données personnalisée de protéines EtfA et EtfB des espèces énumérées ci-dessus a été réalisée à l'aide de la base de données NCBI, en recherchant tous les gènes de *etf* A ou B de transfert d'électrons à partir des séquences génomiques. Pour ETFA: A.woodii_dsm-1030_etfa (awo_rs04415), A.woodii_dsm-1030_etfa (awo_rs08105), C.butyricum_knu-109_etfa (ATN24_08885), C.butyricum_knu-109_etfa (atn24_030), C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfA (EZN00_RS08620), C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfA (EZN00_RS10800), C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfA (EZN00_RS10865), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfA (CKR_RS02265), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfA (CKR_RS16650), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS01655), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS01720), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS10410), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS14700), C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfA (CA_RS13965), E.limosum_ATCC-8486_EtfA (B2M23_RS01165), E.limosum_ATCC-8486_EtfA (B2M23_RS12010), E.limosum_ATCC-8486_EtfA (B2M23_RS16675), C.ljungdahlii_DSM-13528_EtfA (CLJU_RS10595). Pour ETFB: A.woodii_DSM-1030_ETFB (AWO_RS04410), A.WOODII_DSM-1030_ETFB (AWO_RS08100), C.BUTYRICUM_KNU-L09_ETFB (ATN24_08880), C.BUTYRICUM_KNU-L09_ETFB (ATN24_03025), tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfB (EZN00_RS08615), C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfB (EZN00_RS10795), C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfB (EZN00_RS10860), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfB (CKR_RS02260), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfB (CKR_RS16645), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_RS01650), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_RS01715), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_RS10405), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_14705), C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfB (CA_RS13035), C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfB (CA_RS13970), E.limosum_ATCC-8486_EtfB (B2M23_RS01170), E.limosum_ATCC-8486_EtfB (B2M23_RS12005), E.limosum_ATCC-8486_EtfB (B2M23_RS16670), C.ljungdahlii_DSM-13528_EtfB (CLJU_RS10600).

Les séquences de protéines EtfA et EtfB sélectionnées formant un complexe Etf dans chaque génome ont été compilées par l'addition des deux séquences donnant des séquences de protéines complexes Etf. Les protéines du complexe Etf ont été nommées en fonction des gènes voisins avec lesquels elles ont été trouvées et listées ci-dessous : A.woodii_DSM-1030_EtfAB_GlcD_LctP, A.woodii_DSM-1030_EtfAB_Acyl-CoA, C.butyricum_KNU-L09_EtfAB_GlcD_LctP, C.butyricum_KNU-L09_EtfAB_GlcD, C.butyricum_KNU-L09_EtfAB_GlcD, C.butyricum_KNU-L09_EtfAB_GlcD, L09_EtfAB_Hbd, C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfAB_GlcD_LctP, C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfAB_Hbd, C.tyrobutyricum_CirmBIA-2237_EtfAB_GlcD, C.kluyveri_NBRC-12016_EtfAB_Hbd, C.kluyveri_NBRC-12016_EtfAB_GlcD, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_GlcD, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_Hbd, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_Acyl-CoA, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_GlcD_LctP, C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfAB_GlcD, C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfAB_Hbd, E.limosum_ATCC-8486_EtfAB_Acyl-CoA, E.limosum_ATCC-8486_EtfAB_GlcD, E.limosum_ATCC-8486_EtfAB_GlcD_LctP, C. ljungdahlii _DSM-13528_EtfAB_GlcD_LctP.

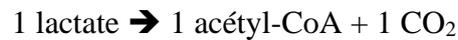
Les complexes Etf ont été soumis à une analyse phylogénétique : les ensembles des séquences protéiques ont été alignés à l'aide de ClustalW avec des paramètres par défaut (Cost matrix: ID, Gap open cost: 8, Gap extend cost: 0.1). Puis, un arbre phylogénétique a été construit avec les paramètres suivants : Modèle de distance génétique (Genetic Distance Model) : Jukes-Cantor, Tree build Method: UPGMA (J. Lee et al., 2016; Kanehisa et al., 2017), Resampling Method: bootstrap, Number of replicates: 1000, Support Threshold: 30% à partir du logiciel Geneious v2022.0.2.

C. Fermentations continues et modulation du E_h par les gaz

1. Construction de la matrice des flux

Pour l'analyse des flux métaboliques (MFA), la matrice des flux de la voie métabolique d'oxydation du lactate chez la souche *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 a été développée à partir de l'identification du complexe EtfAB et des étapes d'analyse phylogénétique et complétée par des informations sur les voies métaboliques recueillies à partir d'autres études rapportées dans la littérature ainsi que la base de données KEGG (Lee et al. 2016 ; Kanehisa et al. 2017). La matrice de stœchiométrie de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 a été construite

avec les équations métaboliques suivantes impliquant 11 réactions et 7 métabolites intracellulaires :



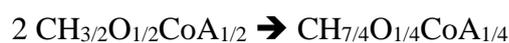
La construction du modèle et l'analyse *in silico* ont été réalisées selon Tsai et Lee (1988) et Orth et al. (2010) et appliquées sur <https://smart-biotech.online/research/mfa/Clostridium.tyrobutyricum.lactate>. À partir de l'état d'équilibre, les flux métaboliques (v) sont contraints par la stœchiométrie (S) de la matrice donnant l'équation suivante :

$$S.v = 0$$

Les flux métaboliques ont été obtenus à partir des concentrations mesurées (r) de consommation de lactate et d'acétate, production de butyrate et de l'estimation du CO_2 produit, donnant le système matriciel suivant, où x_i sont les flux intracellulaires :

$$\begin{pmatrix} r_{\text{lactate}} \\ r_{\text{acétyl-CoA}} \\ r_{\text{acétate}} \\ r_{\text{butyryl-CoA}} \\ r_{\text{butyrate}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & -2 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ x_3 \\ x_4 \end{pmatrix}$$

Une matrice de carbone a été construite en divisant les nombres d'atomes par le nombre de C du substrat. Cela donne le panel d'équations métaboliques suivantes :



et la matrice de carbone correspondante, ci-dessous :

$$\begin{pmatrix} r_{lactate} \\ r_{CO2} \\ r_{ac\acute{e}tyl-CoA} \\ r_{ac\acute{e}tate} \\ r_{butyryl-CoA} \\ r_{butyrate} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1/3 & 0 & 0 & 0 \\ 2/3 & -1 & -1 & 1/3 \\ 0 & 1 & 0 & -1/3 \\ 0 & 0 & 1 & -2/3 \\ 0 & 0 & 0 & 2/3 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} x1 \\ x2 \\ x3 \\ x4 \end{pmatrix}$$

2. Équation des équilibres redox, recouvrement des cofacteurs et bilan ATP

Une MFA implique également la possibilité de calculer des rendements en ATP et d'estimer les paramètres de l'homéostasie redox (balance redox des cofacteurs et balance redox des métabolites, les deux étant impliquées dans la balance redox cellulaire).

Le rendement en ATP (Y_{ATP} , g.mol⁻¹) a été calculé par le rapport de la biomasse (g [poids sec].L⁻¹) produite à partir de l'ATP (mol.L⁻¹) produit. Pour le recouvrement des cofacteurs, le ratio NADH et le ratio de ferrédoxine (Fd) ont été calculés séparément et compilés ensemble, donnant les équations suivantes :

$$\frac{\sum NAD +}{\sum NADH} \times 100$$

$$\frac{\sum Fd_{ox}}{\sum Fd_{red}} \times 100$$

$$\frac{\sum Fd_{ox} + \sum NAD +}{\sum Fd_{red} + \sum NADH} \times 100$$

Tous ces rapports ont été calculés sur la base des flux intracellulaires.

L'équilibre redox a été calculé à partir de l'état d'oxydation des substrats et des produits (lactate, 0 ; acétate, 0 ; dioxyde de carbone, +2 ; hydrogène, -1 ; et butyrate, -2) (Riondet et al. 2000). La somme de l'état d'oxydation des produits doit être égale à la somme de l'état d'oxydation des substrats ; considérant que la somme de l'état d'oxydation des substrats est égale à 0, l'équation suivante a été utilisée pour l'équilibre redox :

$$\frac{\sum r_{product} \times product\ oxidation\ state}{r_{substrates}}$$

La division par $r_{\text{substrates}}$ permet de comparer les conditions avec des débits de substrats différents.

D. Analyse des flux métaboliques en fonction du redox

1. Milieu de culture

Le milieu bactérien lactate/acétate (RCMLA), décrit plus haut, a été utilisé pour l'étude de la bactérie en fermentation continue. Le milieu a été stérilisé par filtration à l'aide d'un tank de 5L recueillant le milieu à stériliser (Millipore, Massachusetts, USA) mis en surpression à l'aide d'azote et rattaché à un support filtre (Millipore, Massachusetts, U.S.A) comprenant un préfiltre de 124 mm et un filtre en cellulose à 0,2 μm de 142 mm (Merck, France). Le support-filtre était relié à une bombonne de 20 L. Le support-filtre et la bombonne de 20 L étaient préalablement stérilisés par autoclavage à 120 °C / 15 min avec 1 L d'eau osmosée.

2. Fermenteur continu

Les fermentations ont été réalisées dans un bioréacteur de 2 L (New brunswick, Scientific, discover 100, USA). Un schéma du système intégral est présenté dans la Figure 28. Les fermentations ont été effectuées à une température de 37 °C et à un pH contrôlé à 5,8. L'agitation était contrôlée à 150 rpm, ce qui était suffisant pour garder les cellules en suspensions sans former de mousse. L'oxydoréduction a été mesurée à l'aide d'une sonde Pt4805- DPAS- SC- K8S (Mettler Toledo, France) reliée à l'interface du fermenteur. Le milieu RCMLA dans le fermenteur était préalablement dégazé à l'aide d'azote pour atteindre une valeur E_h : -25 mV avant ensemencement. L'arrivée d'azote était reliée à un filtre à 0,2 μm (Midisart 2000, Dutscher, France). Un flux à 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ d'azote était maintenu dans l'espace de tête afin de maintenir l'anaérobie dans le fermenteur. Des changements de conditions d'oxydoréduction ont été réalisés avec un dégazage des gaz solubles générés par la bactérie par le bullage d'azote à un débit de 10 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le volume final des fermentations a été fixé à 750 mL avec un ensemencement à 1% de préculture. La densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectromètre (PRIM, Secomam, France) à la longueur d'onde 750 nm. Une fois que la turbidité mesurée à $DO_{750\text{nm}}$, atteignait les valeurs entre 1,4 – 1,8 en milieu RCMLA, la fermentation batch était basculée en fermentation continue. Pour la fermentation continue, le flux d'alimentation du milieu était contrôlé à l'aide d'une pompe péristaltique (MINIPULS 3, Gilson, France). La phase d'équilibre de la culture bactérienne en fermenteur continu a été obtenue au taux de dilution 0,016 h^{-1} . Elle a été déterminée à partir de la stabilité de la densité cellulaire déterminée par la mesure de turbidité à $DO_{750\text{nm}}$ (PRISM, Secoman, France) avec des

valeurs de consommation de lactate, d'acétate et de potentiel redox (ORP) stables. Les dosages de ces acides organiques ont été effectués à l'aide des kits de dosage K-ACETAK pour l'acétate et K-DLATE pour le lactate (Mégazyme, France) en respectant les recommandations du fournisseur. Le volume de 750 mL était maintenu à l'aide d'un système de pesée (Lynx, Mettler Toledo, France) relié à l'interface du fermenteur (Monitoring Reactor Unit (MRU), New Brunswick, USA).

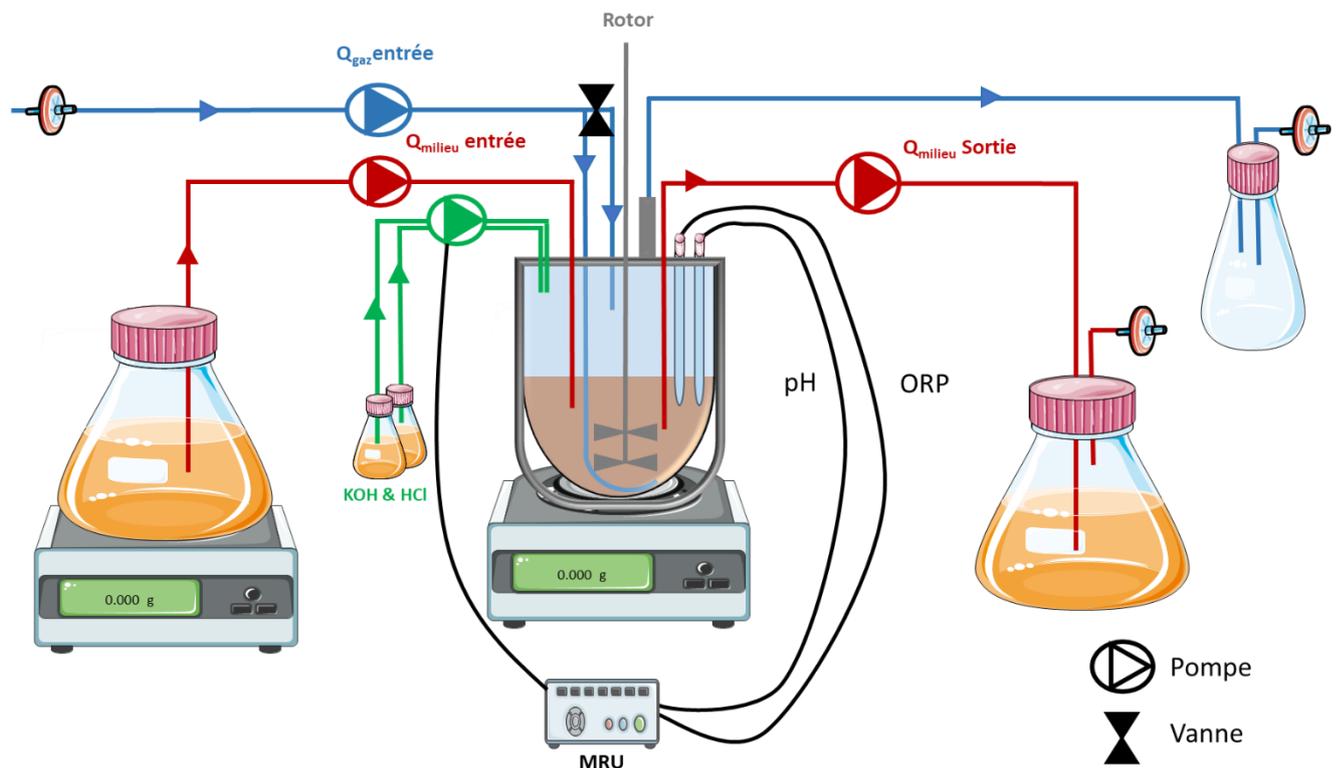


Figure 28 : Schéma de l'installation du fermenteur continu. ORP : sonde redox ; MRU : système d'acquisition et de contrôle du pH ; du poids ; du redox et de l'agitation du fermenteur.

3. Analyses des acides organiques

Les concentrations de lactate, acétate et butyrate ont été obtenues par HPLC (Cf II.G) et la préparation des échantillons a été réalisée comme pour l'étude de l'impact du E_h sur la germination des spores de *C. tyrobutyricum* (Cf A.2).

4. Analyses microbiologiques

Pour obtenir la biomasse en $g.L^{-1}$, 15 mL de culture étaient prélevés du fermenteur continu puis centrifugés à 4500 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant éliminé, 3 lavages ont été réalisés en resuspendant le culot dans de l'eau osmosée stérile et centrifugeant à 4500 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le culot resuspendu était par la suite séché dans un four Pasteur à 100 °C pendant 24 heures avant d'être pesé.

Résultats

Chapitre 1 : Sélection de 4 souches de bactéries lactiques réductrices intervenant au cours de la fabrication fromagère

Chapitre 2 : Etude de l'activité réductrice de bactéries lactiques en fabrication fromagère

Chapitre 3 : Effet du potentiel redox sur la germination et/ou les flux métaboliques chez *C. tyrobutyricum*

Chapitre 1: Sélection de 4 souches de bactéries lactiques réductrices intervenant au cours de la fabrication fromagère

I. Contexte

L'objectif de cette partie expérimentale se divise en deux parties.

La première est la sélection de souches de bactéries lactiques réductrices utilisées pendant une fabrication pour modifier le E_h de la matrice fromagère. Dans le projet ANR FoodRedox, une souche appartenant au genre *Lactococcus* avait été utilisée pour réduire rapidement le lait pendant l'étape de transformation en cuve dans le but d'engendrer rapidement un environnement réduit afin d'inactiver *C. tyrobutyricum*. Pour cela, cette dernière avait été sélectionnée en fonction de la rapidité de sa cinétique de réduction dans le fromage lui permettant d'atteindre son E_{h7min} au bout de 4,5 heures après ensemencement en cuve avec une valeur E_{h7} finale de -259 mV obtenue au démoulage. Ces résultats ont montré que cette réduction rapide engendrait un retard de l'apparition du gonflement tardif durant l'affinage, malgré une disparition de la souche lactique dès le début d'affinage.

Cette observation a conduit aux questions suivantes :

- Est-ce que l'utilisation d'autre bactérie lactique réductrice ayant une cinétique de E_{h7} rapide ou lente pourrait accentuer le retardement du gonflement tardif ou inhiber *C. tyrobutyricum* ?
- Est-ce que l'utilisation d'une seconde souche de bactérie lactique ayant une activité réductrice durant la période d'affinage pourrait repousser davantage ou inhiber l'apparition du gonflement tardif ?

Ainsi nous avons choisi de sélectionner à nouveau des souches de lactocoques pour une réduction plus ou moins rapide de la matrice laitière en cuve puis des espèces appartenant au

genre *Lactobacillus*, naturellement présents dans les fromages, pour une activité réductrice durant l'affinage.

À partir de souches isolées de fromage durant les projets ECLAIR et DIVCO menés par URTAL INRAE, des souches de lactocoques et de lactobacilles ont été présélectionnées en fonction de leur capacité de réduction à l'aide de la méthode de criblage mise au point par Michelon et al. (2013) que nous avons renommée ORCA pour Méthode mesurant la Capacité Réductrice par cOlorimétrie. Les souches retenues par genre devaient obtenir le score le plus élevé, soit 63. Ces dernières ont été ensuite soumises à différents tests pour réduire cette sélection à maximum 4 souches appartenant aux genres *Lactococcus* et *Lactobacillus*. Concernant les souches de lactocoques, le test FSDA a servi à contrôler les souches en fonction de leur activité protéolytique. Afin d'éviter une acidification trop importante en cuve, non désirée en fabrication fromagère type pâte pressée cuite, les protéases + ont été éliminées pour ne garder que les souches protéase -. Puis l'ensemble des souches présélectionnées ont été soumises au test citrate +/- et de détection de la présence de bactériocine contre *C. tyrobutyricum* afin de s'assurer que les résultats observés pendant la fabrication n'ont pas une origine autre que le potentiel réducteur des bactéries lactiques sélectionnées.

Les souches restantes ont été ensuite soumises à la Méthode de mesure de l'Activité Réductrice par POtentiométrie (PORA) afin de sélectionner seulement deux souches de chaque genre avec chacune une cinétique de réduction différente.

La seconde partie concerne l'élaboration d'une technique de criblage permettant de discriminer les bactéries lactiques en fonction de leur cinétique de réduction par spectrométrie.

Cette idée est venue au moment de la sélection des souches de bactéries lactiques utilisées pour l'expérimentation en fromagerie.

Comme il l'a été décrit dans l'étude bibliographique, l'utilisation des bactéries lactiques est une des possibilités pour moduler le potentiel redox dans les produits laitiers fermentés.

Actuellement, il existe deux techniques permettant de discriminer les bactéries lactiques entre elles en fonction de leur capacité réductrice. La méthode la plus commune est celle par mesure potentiométrique de l'activité réductrice (PORA) utilisant une sonde redox dans un milieu liquide ou dans une matrice alimentaire. Elle permet de suivre la cinétique de réduction en fonction du temps. Par conséquent, PORA permet d'obtenir les Vitesses maximales de réduction E_{h7} (V_{rmax}) et les temps nécessaires pour atteindre cette vitesse (t_{rmax}), qui sont des

valeurs discriminantes entre les différentes souches de bactéries lactiques. Bien que celle-ci soit la plus précise, elle reste une méthode chronophage, avec un protocole complexe, assez cher, demande l'utilisation d'un certain volume de milieux liquide en flacon et ne permettant pas un criblage rapide d'une banque de souche de bactéries lactiques.

La seconde technique est basée sur une discrimination colorimétrique de la capacité réductrice (ORCA) des bactéries lactiques via l'utilisation de sels de tétrazoliums sur milieux solides en boîte de Petri. Cette dernière est avantageuse par rapport à PORA par la possibilité de cribler un grand nombre de souches en peu de temps. Cependant, ORCA est peu discriminante entre les souches de bactéries lactiques appartenant à la même espèce.

Par conséquent, nous avons voulu mettre au point une nouvelle méthode, la mesure de l'activité réductrice par spectrométrie (ABRA) via l'utilisation de sels de tétrazolium, permettant de discriminer les espèces de bactéries lactiques en préservant la rapidité et la simplicité de la méthode ORCA tout en gardant la pertinence de la méthode PORA par l'obtention d'une cinétique de réduction. Cette méthode s'inscrirait dans la continuité de ORCA et pouvant s'effectuer en parallèle.

Deux stratégies par spectrométrie ont été envisagées. La première se base sur l'utilisation du CTC (5-cyano-2,3-di-(chlorure de p-tolyl)-tétrazolium), un sel de tétrazolium qui une fois réduit donne un formazan coloré ayant la capacité de fluorescer. L'avantage de la fluorescence est la possibilité d'utiliser directement le lait, sous forme liquide ou gélifiée.

La seconde approche est l'utilisation de sels de tétrazoliums de nouvelle génération donnant des formes réduites, colorées, solubles en milieu liquide et absorbant dans le visible. L'inconvénient de cette approche est d'élaborer un milieu de culture qui reproduise les propriétés de lait sans son caractère opaque.

Le milieu de culture choisi pour cette méthode doit être proche des conditions nutritionnelles, et des conditions redox du lait rencontrées par les bactéries lactiques au cours d'une fabrication de produits laitiers fermentés. Pour cela, nous avons étudié la capacité de différentes espèces de bactéries lactiques à se développer dans le milieu à 37 °C et leur activité de réduction dans le milieu sélectionné par rapport à celle obtenue avec la méthode PORA. Ainsi, nous avons comparé les caractéristiques redox et les capacités de croissances de différentes espèces de bactéries lactiques dans 3 milieux à base de lait.

II. Sélection des souches réductrices de bactéries lactiques pour les fabrications fromagères type pâte pressée

A. Sélection des souches de lactocoques

1. Présélection de souches de *Lactococcus lactis*

La collection de souches ECLAIR regroupe un total de 85 souches différentes de *Lactococcus lactis* isolées à partir de fromage, de lactosérums et de laits. Afin de réduire ce nombre à 4 souches, la technique de criblage ORCA a été utilisée sur l'ensemble des souches avec l'objectif de ne garder que les souches ayant le score le plus élevé, soit 63, symbolisant une grande capacité de réduction.

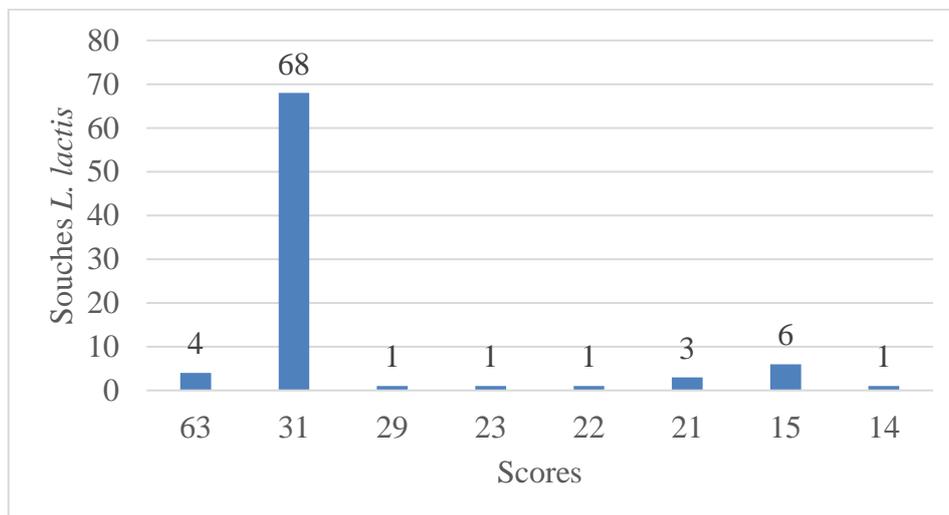


Figure 29 : Répartition des souches de *L. lactis* de la banque de souches ECLAIR en fonction de leur score obtenu avec la méthode ORCA. Chaque score est la moyenne de 3 répétitions pour chacune des souches.

Sur les 85 souches testées, 68 ont un score binaire de 31, 4 un score de 63 et 13 souches avec un score entre 29 et 14.

À partir de ce premier résultat, les souches 8F8, 4F33, 1F19 et 3F24 ont été sélectionnées en raison de leur score de 63 (Tableau 11). Le tableau détaillant les résultats pour les 85 souches de *L. lactis* se trouve en annexe (Annexe 1).

Tableau 11 : Méthode ORCA appliquée aux souches de *L. lactis* 8F8, 4F33, 4F19 et 3F24 (N= 3); BT : Tetrazolium bleu ; TTC : Tetrazolium Chloride ; VT : Tetrazolium violet ; MA+BP : Lait gélosé avec bromocrésol pourpre ; M17 : milieu bactérien.

Souches	Espèce	Collection	Origine	Capacité réductrice										
				BT		TTC		TV		Score	BP		M17	
				Air	N ₂	Air	N ₂	Air	N ₂		Air	N ₂	Air	N ₂
8F8	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>ECLAIR</i>	Fromage au lait de chèvre et de vache	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
4F33	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>ECLAIR</i>	Fromage vache	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
1F19	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>ECLAIR</i>	Fromage brebis	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
3F24	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>ECLAIR</i>	Fromage Vache	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+

Le but étant d'utiliser des souches de *L. lactis* en cuve seulement pour leur potentiel réducteur, des tests sur leur activité protéolytique, leur capacité à métaboliser le citrate et leur activité bactériocine contre *C. tyrobutyricum* devaient être réalisés. Les souches devaient être faiblement protéolytique et citrates négatifs pour éviter au maximum leur impact sur les levains ou ayant aucun effet bactéricide contre *C. tyrobutyricum*. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Activité protéolytique, production de bactériocines et capacité à métaboliser le citrate des souches 8F8, 4F33, 1F19 et 3F24. n=3.

Souches	Espèce	Collection	Citrate (KCA)	Test Bactériocine	Protéase (FSDA)
				<i>C. tyrobutyricum</i>	
8F8	<i>Lactococcus lactis</i>	ECLAIR	-	-	-
4F33	<i>Lactococcus lactis</i>	ECLAIR	-	-	-
1F19	<i>Lactococcus lactis</i>	ECLAIR	-	+ 4 mm	+
3F24	<i>Lactococcus lactis</i>	ECLAIR	-	-	+

Pour l'ensemble des souches, les observations réalisées sur milieux KCA ont permis de conclure que les 4 lactocoques étaient citrate négatif. En effet, les résultats sur boîte de Petri n'ont montré aucune présence de colonies rouges ou roses entourées d'un halo correspondant à l'utilisation du citrate au cours des différentes répétitions. Concernant leur activité protéolytique sur milieu FSDA, les colonies des souches de 8F8 et 4F33 ont présenté des petites colonies autour de 0,2 – 0,5 mm de diamètre au contraire de celles des souches 1F19 et 3F24 avec un diamètre supérieur à 2 mm. D'après Huggins and Sandine (1984), ces observations ont permis de conclure que les souches 8F8 et 4F33 ont une activité protéolytique lente alors que 1F19 et 3F24 en avaient une rapide. Quant au test « bactériocine », avec un diamètre d'inhibition de 4 mm la souche 1F19 s'est avérée la seule souche positive contre *C. tyrobutyricum*.

Sur l'ensemble de ces résultats, seulement deux souches répondent aux objectifs fixés. En effet, *L. lactis* 8F8 et 4F33 ont montré un métabolisme citrate négatif, aucun effet bactéricide sur *C. tyrobutyricum* et une activité protéolytique lente. Ainsi sur les 4 souches, les souches 8F8 et 4F33 ont été retenues pour l'étude de leur activité réductrice et 1F19 et 3F24 éliminées.

2. Sélection des souches de *L. lactis* sur la base de leur activité réductrice :

a) Conditions optimales

La seconde étape de cette sélection consiste à différencier les souches citrates négatives, bactériocines négatives et avec une faible activité protéolytique en fonction de leur activité réductrice dans le lait. Suite aux précédents résultats, seulement deux souches ont été retenues : *L. lactis* 8F8 et 4F33. L'objectif initial étant de sélectionner deux souches ayant des activités réductrices différentes en cuve pendant les fabrications fromagères type Emmental, une étude

de la vitesse maximale de réduction ($V_{r,max}$) et le temps ($t_{r,max}$) nécessaire pour l'atteindre a été réalisée dans du lait UHT bio liquide avec l'aide de la méthode PORA à température optimale de croissance de *L. lactis*.

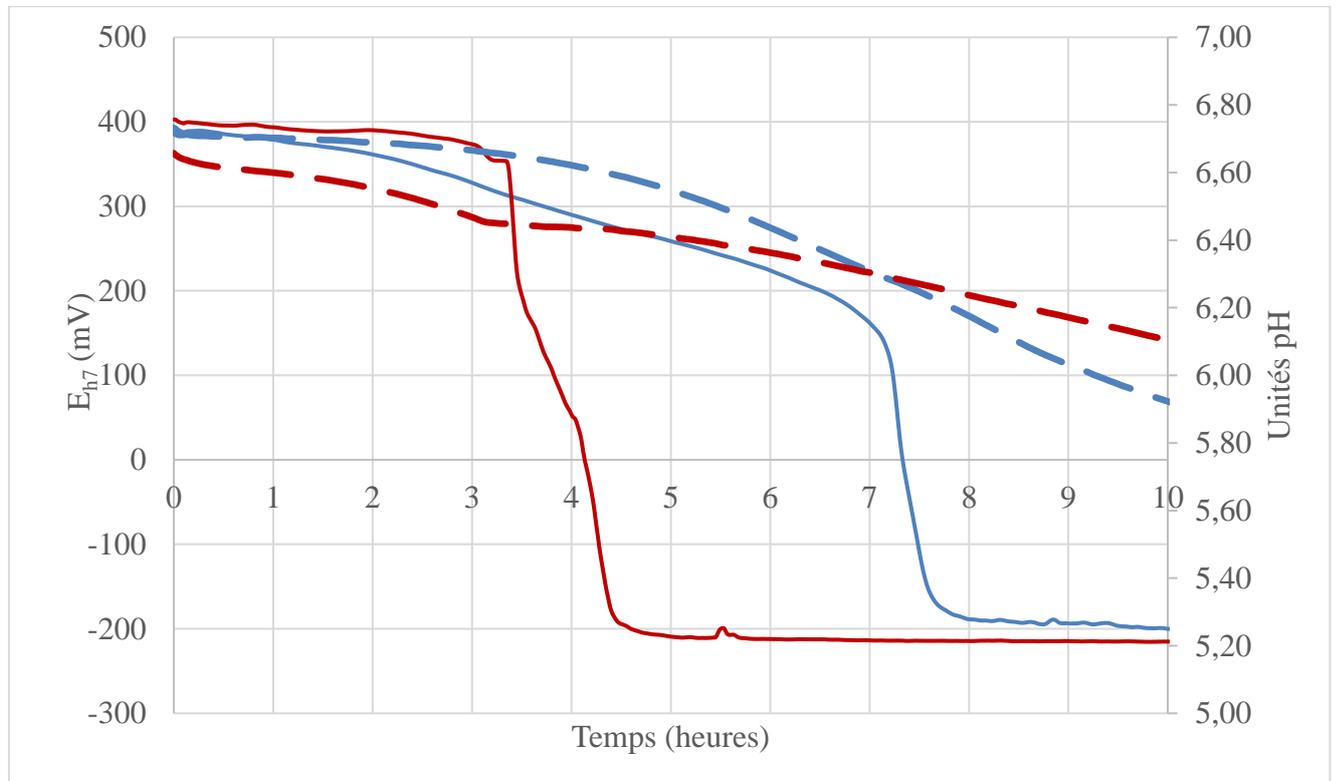


Figure 30 : Cinétiques de réduction et d'acidification de *L. lactis* 4F33 (bleu) et 8F8 (rouge) en milieu lait UHT écrémé à 30 °C. Courbes pleines : cinétiques de réduction (E_{h7}) ; Courbes pointillées : cinétiques d'acidification (pH).

D'après les courbes E_{h7} et pH, présentées dans la Figure 30, nous observons essentiellement des différences de cinétiques de réduction entre les deux souches. Pour la souche 8F8, la cinétique de réduction consiste en une phase de latence de 2,75 heures avec une chute de la valeur E_{h7} jusqu'à la valeur minimale de -214 mV. Tandis que pour 4F33, le profil de cinétique de réduction se décompose en une phase de latence de 1,5 heures suivie d'une chute redox en deux temps. Une première chute de la valeur E_{h7} lente entre 1,5 et 7 heures et une seconde rapide entre 7 heures jusqu'à 8 heures. L'analyse des paramètres descripteurs des cinétiques, résumé dans le Tableau 13, confirme cette différence entre les deux souches. Les $V_{r,max}$ et $t_{r,max}$ sont différentes entre les deux souches avec une vitesse de réduction plus importante de $-1411 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$ atteinte en 4 heures pour la souche 8F8 contre $-991 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$ en 7 heures pour la souche 4F33 (Tableau 13).

Tableau 13 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de *L. lactis* 8F8 et 4F33. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

Souche	$V_{r\max} E_{h7}$ (mV.h ⁻¹)	$T_{r\max} E_{h7}$ (h)	$E_{h7 \min}$ (mV)	tmin (h)
<i>L. lactis</i> 4F33	-991 ± 72 ^a	7,00 ± 0,7 ^a	-215 ± 9 ^a	15 ± 1 ^a
<i>L. lactis</i> 8F8	-1411 ± 53 ^b	4,00 ± 0,3 ^b	-242 ± 13 ^b	15 ± 2 ^a

De plus, il est intéressant de souligner que les valeurs $E_{h7 \min}$ obtenues en un temps similaire entre les deux souches sont significativement différentes. Si cela se confirme en fabrication, ces différences de valeurs de E_h négatives pourraient être également un levier intéressant pouvant agir sur *C. tyrobutyricum*. Ainsi, les deux souches répondent aux critères de sélections recherchés.

b) Conditions en cuve de fromagerie

Comme il a été montré dans le projet ANR FoodRedox, l'activité réductrice des lactocoques s'exprime durant l'étape de fabrication en cuve. La technologie type Emmental ayant été choisie pour ce projet de thèse, plusieurs facteurs induits par le processus de fabrication en cuve peuvent impacter l'activité réductrice des souches sélectionnées comme les cycles de températures, l'agitation. Malgré la difficulté de reproduire plusieurs de ces facteurs à l'échelle laboratoire, il a été décidé de confirmer la sélection de ces souches en étudiant à nouveau leur cinétique de réduction dans du lait UHT écrémé, mais en appliquant le cycle de température de la technologie pâte pressée cuite choisie pour les futures fabrications (Emmental), donnant les cinétiques et paramètres présentés dans la Figure 31 et le Tableau 14.

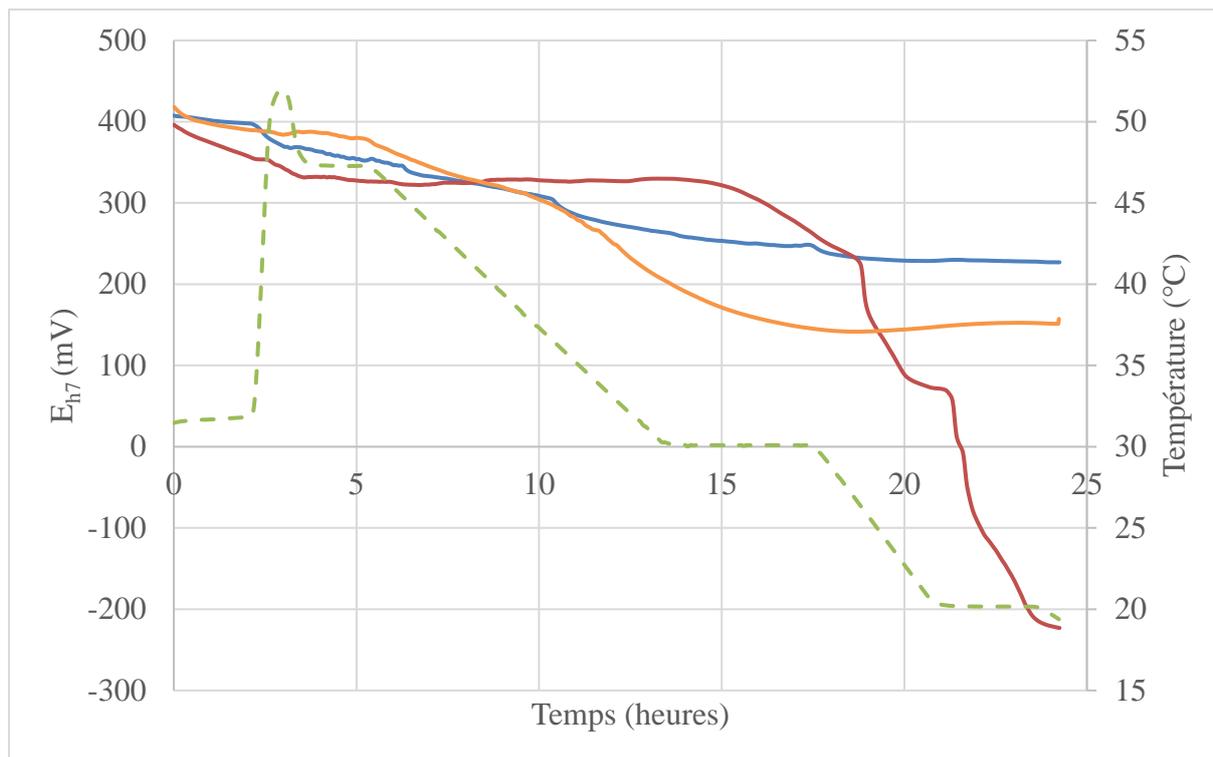


Figure 31 : Cinétiques de réduction et d'acidification de *L. lactis* 4F33 (bleu), 8F8 (rouge) et du ferment commercial (orange) en milieu lait UHT écrémé avec un cycle de température type Emmental. Courbes pleines : cinétiques de réduction E_{h7} ; Courbes pointillées : cinétique de température ($^{\circ}\text{C}$).

Tableau 14 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de *L. lactis* 8F8 et 4F33. F : cycle de température type Emmental ; O : 30 $^{\circ}\text{C}$. Test ANOVA $n=3$, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

Souches	$V_{r\max} E_{h7}$ ($\text{mV}\cdot\text{h}^{-1}$)	$t_{r\max} E_{h7}$ (h)	$E_{h7\min}$ (mV)	t_{\min} (h)
<i>L. lactis</i> 4F33 F	-95 ± 31 ^a	$6 \pm 4,0$ ^b	218 ± 120 ^a	22 ± 5 ^b
<i>L. lactis</i> 4F33 O	-991 ± 72 ^b	$7 \pm 0,7$ ^b	-215 ± 9 ^b	15 ± 1 ^b
<i>L. lactis</i> 8F8 F	-1165 ± 101 ^b	$21 \pm 1,5$ ^a	-237 ± 9 ^b	35 ± 3 ^a
<i>L. lactis</i> 8F8 O	-1411 ± 53 ^c	$4 \pm 0,3$ ^b	-242 ± 13 ^b	15 ± 2 ^b

Comme supposé plus haut, le cycle de température impacte l'activité réductrice des souches 4F33 et 8F8 sélectionnées et change leur profil. En comparant avec les valeurs obtenues en conditions optimales, la vitesse maximale de réduction des souches diminue pour les deux souches et le temps pour l'atteindre tend vers une augmentation en passant de 4 heures à 21 heures pour 8F8. Sauf pour la souche 4F33, la valeur finale $E_{h7\min}$ n'est pas impactée par le

cycle de température de fabrication, mais le temps à l’atteindre passe de 15 à 35 heures, soit hypothétiquement pendant l’étape de salage.

Le cycle de température impacte plus fortement la souche 4F33 avec une baisse de 90% de la vitesse maximale pour atteindre une valeur positive de $E_{h7 \text{ min}}$ soit 218 mV. En comparant ces paramètres avec ceux du mix de levains commerciaux composés de *Lactobacillus helveticus* LHB-02 et de *Streptococcus thermophilus* TA60-1, aucune différence entre les descripteurs des cinétiques de réduction n’a pu être constatée comme présenté dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de *L. lactis* 4F33 et du mix des ferments *Lactobacillus helveticus* LHB-02 / *Streptococcus thermophilus* TA60-1 en cycle de température type Emmental. N=3 et l’analyse statistique Krustal Wallis $p=0,05$.

Souches	$V_{r\text{max } E_{h7}}$ (mV.h ⁻¹)	$t_{r\text{max } E_{h7}}$ (h)	$E_{h7 \text{ min}}$ (mV)	tmin (h)
<i>L. lactis</i> 4F33	-95 ± 31 ^a	6 ± 4,0 ^a	218 ± 120 ^a	22 ± 5 ^a
LHB-02 & TA60-1	-53 ± 8 ^a	12 ± 0,3 ^a	125 ± 38 ^a	20 ± 4 ^a

Malgré un impact du cycle thermique de la fabrication d’Emmental sur leur activité réductrice, les souches 8F8 et 4F33 conservent leur potentiel réducteur dans la matrice fromagère avec de différents profils de réduction pour les fabrications de fromagères.

B. Sélection des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

Comme pour les lactocoques, nous avons appliqué la même stratégie de sélection pour les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LHF), dans l’objectif de maintenir une activité réductrice au cours de l’affinage. À partir de la collection de souches DIVCO, isolées à partir de fromages à pâte pressée cuite, nous avons criblé un total de 15 souches comprenant 5 souches de *Lacticaseibacillus rhamnosus* et 12 de *Lacticaseibacillus paracasei* (Figure 32). Ces espèces ont été sélectionnées, car elles sont retrouvées naturellement dans les fromages à pâte pressée cuite tels que l’Emmental au cours de l’affinage. Avec la méthode ORCA, seules 3 souches de *L. rhamnosus* ont été sélectionnées avec le score maximal de 63 (Tableau 16). Les résultats des tests KCA pour le citrate et de la production de bactériocine contre *C. tyrobutyricum* étant négatifs pour ces 3 souches (Tableau 17), les trois souches ont été soumises à l’étude de leur cinétique de réduction avec la méthode PORA.

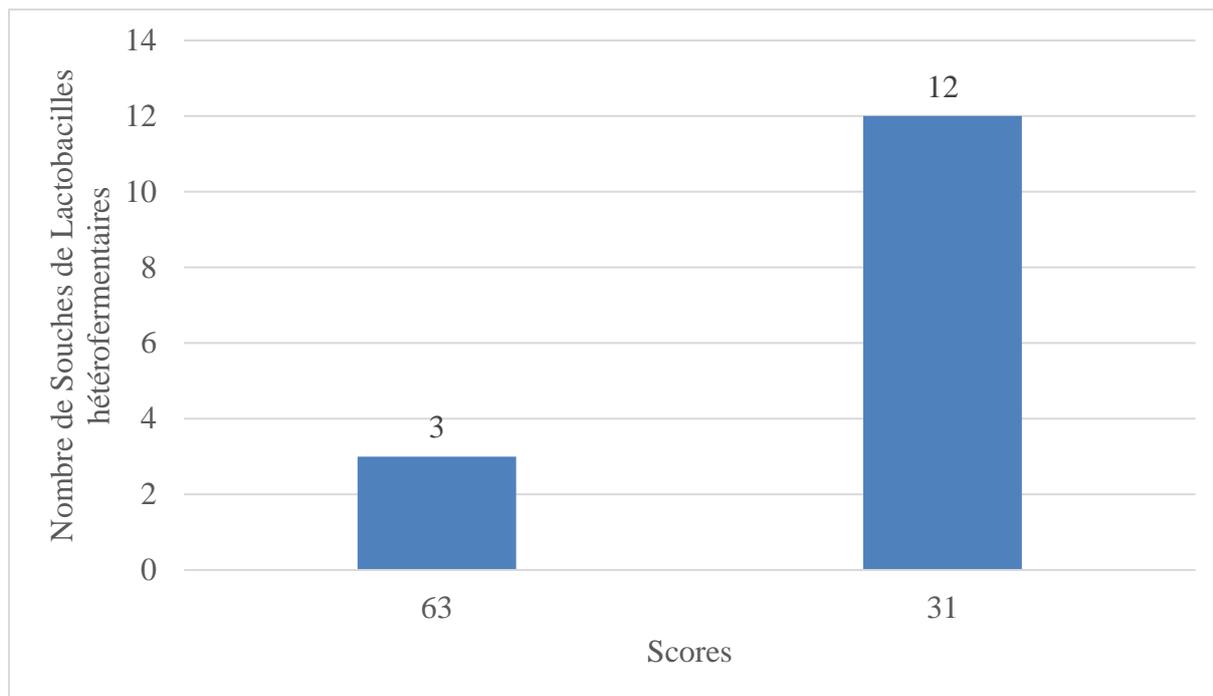


Figure 32 : Répartition des souches de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs de la collection de souches DIVCO en fonction de leur score obtenu avec la méthode ORCA. Chaque score est le résultat de 3 répétitions pour chacune des souches.

Tableau 16 : Screening des souches *L. rhamnosus* F9 5 60, F10 7 64 et F9 5 27 avec ORCA (n= 3 ; BT). Tetrazolium bleu ; TTC : Tetrazolium Chloride ; VT : Tetrazolium violet ; MA+BP : Lait gélosé avec bromocrésol pourpre ; MRS : milieu bactérien.

Souches	Espèces	Origines	Collection	BT		TTC		TV		Score	BP		MRS	
				Air	N ₂	Air	N ₂	Air	N ₂		Air	N ₂	Air	N ₂
F9 5 27	<i>L. rhamnosus</i>	Fromage pâte pressé cuite	DIVCO	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
				1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
				1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
F9 5 60	<i>L. rhamnosus</i>	Fromage pâte pressé cuite	DIVCO	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
				1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
				1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
F10 7 64	<i>L. rhamnosus</i>	Fromage pâte pressé cuite	DIVCO	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
				1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
				1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+

Tableau 17 : Criblage des souches *L. rhamnosus* F9 5 60, F10 7 64 et F9 5 27 sur la production de bactériocine et leur capacité à métaboliser le citrate. n=3.

Souches	Espèce	Collection	Citrate (KCA)	Bactériocine
				<i>C. tyrobutyricum</i>
F9 5 27	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	DIVCO	-	-
F9 5 60	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	DIVCO	-	-
F10 7 64	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	DIVCO	-	-

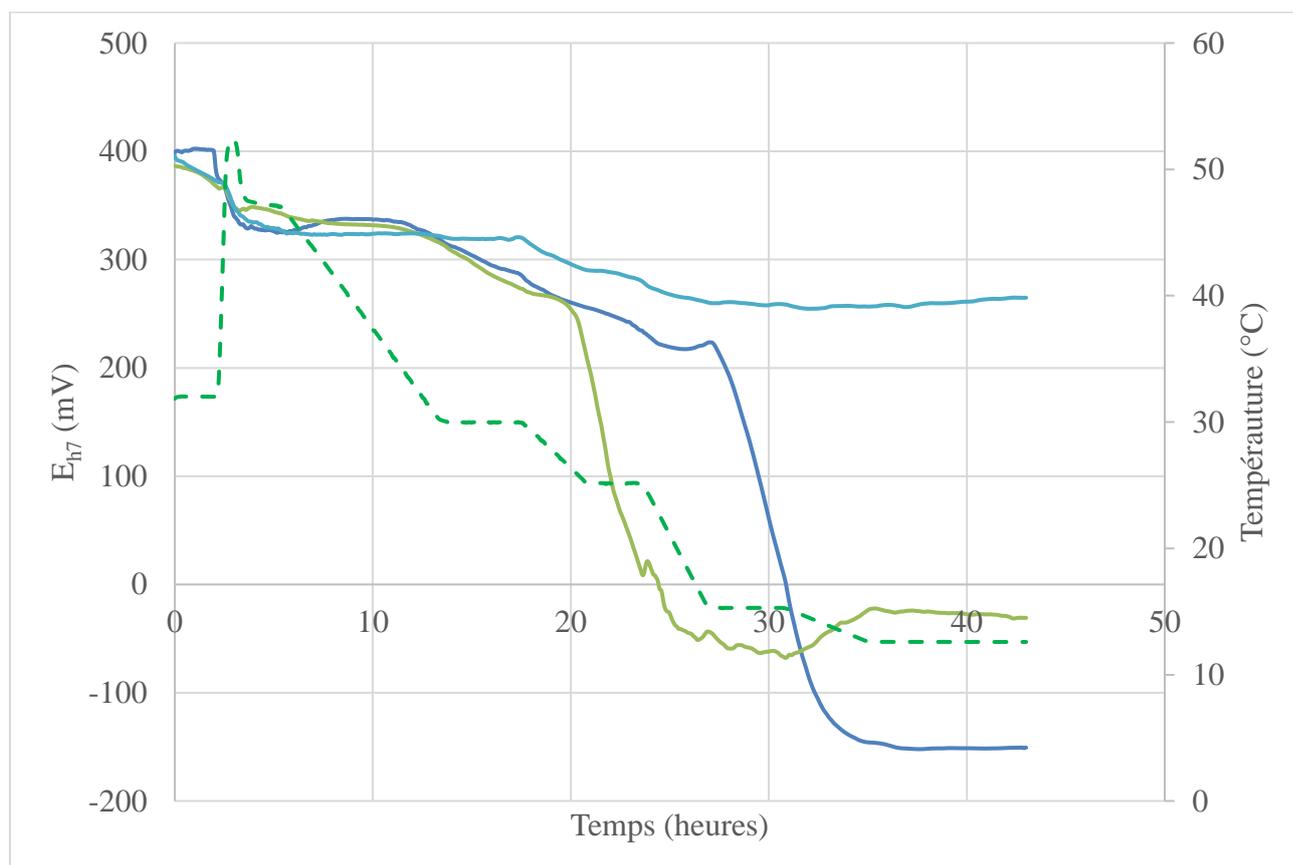


Figure 33 : Cinétiques de réduction des souches de *L. rhamnosus* F9 5 60 (bleu foncé), F10 7 64 (bleu clair) et F9 5 27 (vert clair) en milieu lait UHT écrémé avec un cycle de température type Emmental (vert). Courbes pleines : Cinétiques de réduction E_{h7} ; courbe pointillée : cinétique de température.

À la différence des lactocoques, nous avons réalisé la caractérisation des cinétiques de réduction et d'acidification de ces 3 souches directement en cycle de température du type Emmental.

Les paramètres de vitesse de réduction maximale (-60 mV.h^{-1}) et de $E_{h7 \text{ min}}$ (253 mV) obtenus avec *L. rhamnosus* F10 7 64 sont plus faibles et plus élevés, respectivement, par rapport aux deux autres souches.

Concernant les deux autres souches, les paramètres de vitesse maximale et de la valeur du $E_{h7 \text{ min}}$ ne sont pas différents. Alors que pour le t_{max} , la valeur chez F9 5 60 est significativement plus faible que chez F9 5 27.

Ainsi, la souche F10 7 64, a été sélectionnée comme souche au profil de réduction lent pour son activité de réduction lente. Pour la souche avec un profil de réduction rapide, nous avons retenu la F9 5 60 en raison de sa capacité à atteindre sa vitesse maximale plus tôt que F9 5 27 (Tableau 18 & Figure 33).

Tableau 18 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de *L. rhamnosus* F9 5 60, F10 7 64 et F9 5 27 en cycle de température type Emmental. Test ANOVA $n = 3$, $\alpha = 0,05$, comparaison tukey.

Souche	V_{rmax} (mV.h^{-1})	t_{max} (h)	$E_{h7 \text{ min}}$ (mV)	t_{min} (h)
<i>L. rhamnosus</i> F10 7 64	-60 ± 12 a	$3 \pm 0,1$ ab	253 ± 3 a	34 ± 3 a
<i>L. rhamnosus</i> F9 5 27	-109 ± 31 ab	$29 \pm 2,5$ c	-88 ± 112 b	39 ± 1 a
<i>L. rhamnosus</i> F9 5 60	-194 ± 72 b	$24 \pm 2,0$ b	-151 ± 3 b	32 ± 9 a

C. Étude de l'activité réductrice de bactéries sélectionnées en culture mixte ou en culture pure

Comme mentionné plus haut, l'idée de sélectionner une souche réductrice intervenant pendant la phase de fabrication en cuve et une seconde ayant une activité réductrice au cours de l'affinage implique des cultures mixtes avec les souches sélectionnées. Ainsi, nous avons voulu étudier les activités réductrices des cultures mixtes de bactéries dans le lait UHT avec le cycle de fabrication en technologie de pâte pressée cuite jusqu'au début de l'affinage. Cette étape a pour but d'étudier l'impact de l'interaction des espèces sélectionnées sur leur profil de réduction globale, de les comparer entre elles, et d'éliminer si besoin des profils les moins intéressants pour les futures fabrications.

Le Tableau 19 regroupe l'ensemble des paramètres descripteurs des différentes cinétiques de réduction.

Tableau 19 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des souches de *L. rhamnosus* et *L. lactis* sélectionnées et les combinaisons lactocoques et lactobacilles en cycle de température type Emmental. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

Souches	V_r max (mV.h ⁻¹)	t_r max (h)	$E_{h7 \text{ min}}$ (mV)	t_{min} (h)
Ferment commercial	-53 ± 8 ^a	19 ± 0,3 ^b	125 ± 38 ^a	20 ± 3,7 ^d
<i>L. lactis</i> 4F33	-95 ± 31 ^a	6 ± 4,0 ^c	218 ± 120 ^a	22 ± 5,2 ^d
<i>L. lactis</i> 4F33 + <i>L. rhamnosus</i> F9 6 50	-437 ± 32 ^{ab}	21 ± 0,5 ^a	-229 ± 7 ^b	42 ± 2,7 ^a
<i>L. lactis</i> 4F33 + <i>L. rhamnosus</i> F10 7 64	-454 ± 239 ^{ab}	22 ± 1,6 ^a	-215 ± 2 ^b	33 ± 1,5 ^{bc}
<i>L. lactis</i> 8F8 + <i>L. rhamnosus</i> F10 7 64	-858 ± 362 ^{bc}	19 ± 1,0 ^a	-220 ± 10 ^b	22 ± 0,5 ^d
<i>L. lactis</i> 8F8	-1161 ± 100 ^c	21 ± 1,5 ^a	-237 ± 9 ^b	35 ± 3,1 ^{ab}
<i>L. lactis</i> 8F8 + <i>L. rhamnosus</i> F9 6 50	-1336 ± 426 ^c	19 ± 1,6 ^a	-231 ± 4 ^b	25 ± 1,5 ^{cd}

Malgré une différence entre les valeurs de t_{min} , toutes les modalités (ferment commercial, bactérie en culture pure ou en association) se trouvent entre 20 et 42 heures, soit entre les étapes de pressage et de salage. Ainsi, ce critère importe peu sur la sélection des profils, car le E_{h7} est atteint avant l'étape d'affinage. Concernant le $E_{h7 \text{ min}}$ et le t_r max, à part la souche 4F33 et le ferment commercial, la souche 8F8 et les cultures mixtes des bactéries ont des valeurs similaires ne permettant pas de les départager les cultures mixtes entre elles. En revanche, pour le paramètre de V_r max, les valeurs ne sont pas différentes entre les cultures mixtes impliquant 4F33, la souche 4F33 et le ferment commercial. Ainsi les profils de réduction étant trop similaires à ceux déjà obtenus avec 4F33 et le ferment commercial, et ayant des valeurs $E_{h7 \text{ min}}$ similaires avec les cultures mixtes impliquant 8F8, les cultures mixtes impliquant 4F33 n'ont pas été retenues.

Ainsi, les modalités impliquant les souches seules de lactocoques 4F33 et 8F8 et les cultures mixtes impliquant 8F8 ont été retenues pour les fabrications fromagères.

III. Élaboration d'une nouvelle méthode de mesure de l'activité réductrice par absorbance

Afin de pouvoir différencier les bactéries ayant le même score selon la méthode de Michelon et al. (2013), il a été décidé de mettre au point un nouveau criblage basé sur leurs cinétiques de réduction. Parmi les bactéries lactiques, certaines espèces sont capables de réduire le potentiel d'oxydoréduction (E_h) jusqu'à des valeurs négatives, alors que d'autres non. Cette diversité d'activité réductrice retrouvée chez les bactéries lactiques permet l'utilisation de souches sélectionnées apportant des valeurs de réduction optimales nécessaires à la qualité globale des produits laitiers.

Actuellement, il existe différentes façons de comparer les bactéries lactiques en fonction de leurs propriétés réductrices. Cachon et al. (2002) ont proposé une Méthode de mesure POtentiométrique de l'Activité Réductrice (PORA) par le suivi des cinétiques en milieu liquide grâce à des sondes redox. Michelon et al. (2013) ont proposé la Méthode cOLORimétrique de mesure de la CAPacité Réductrice (ORCA) par criblage sur milieu solide. Par rapport à PORA, ORCA permet le criblage d'un grand nombre de souches en peu de temps. Cependant, cette méthode est binaire et discrimine relativement mal les souches d'une même espèce.

Par conséquent, nous avons développé une nouvelle méthode, la Méthode de mesure par ABSorbance de l'Activité Réductrice (ABRA) afin de différencier les souches en gardant la simplicité de ORCA mais avec la pertinence de la cinétique de réduction bactérienne obtenue avec PORA.

A. Approche de mesure par fluorescence

Pour y parvenir, la spectrométrie par fluorescence a été envisagée avec le 5-cyano-2,3-di-(chlorure de p- tolyl) –tétrazolium (CTC) qui, une fois réduit, donne une couleur rouge dans le visible et fluoresce à l'état solide (Bhupathiraju et al., 1999; Kobayashi et al., 2012; Rodriguez et al., 1992). Ainsi, à partir des milieux MTA et MBA, nous avons testé la capacité à de *Lactiseibacillus paracasei* ATCC 334 et *Lactococcus lactis* 2F21 à réduire le CTC donnant les résultats de cinétique et visuel suivant (Figure 34).

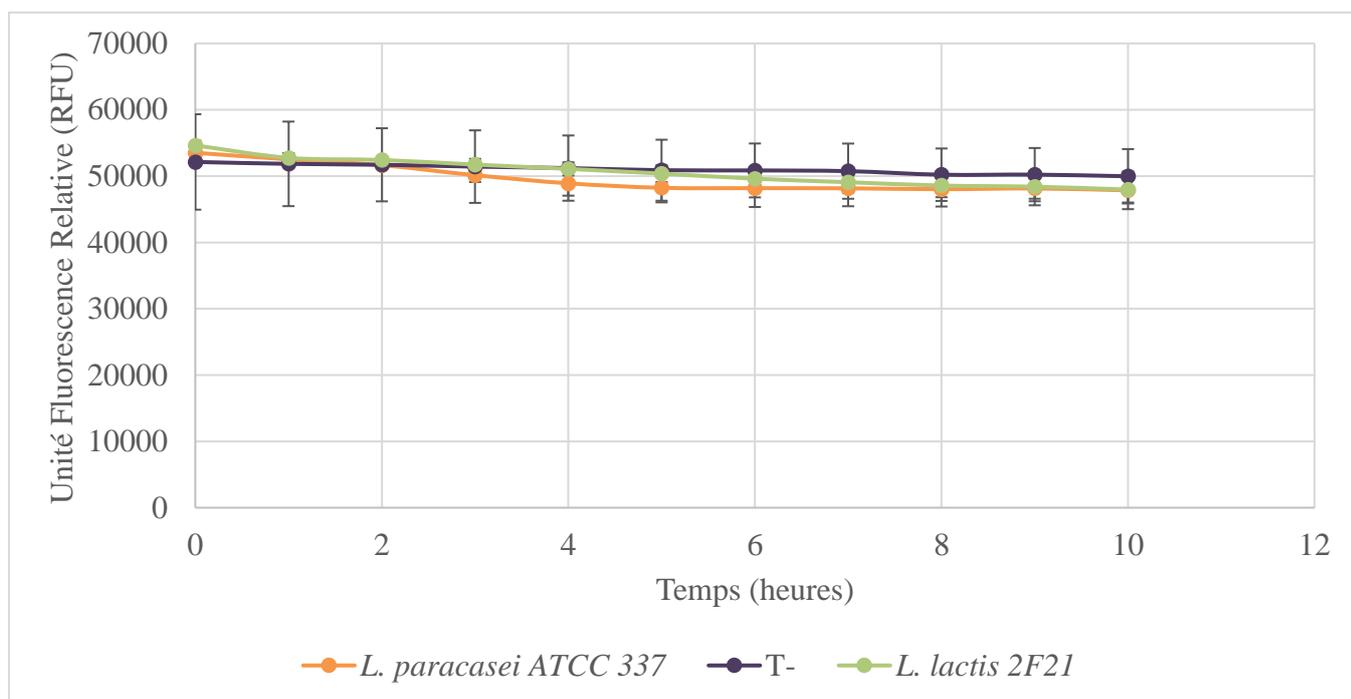


Figure 34 : Cinétique de réduction du CTC en formazan par *L. paracasei* ATCC 334 et *L. lactis* 2F21 en milieu lait gélosé (MTA), n=3.

Tableau 20 : Résultats des souches *L. paracasei* ATCC 334 et *L. lactis* 2F21 sur MTA supplémenté en CTC. MTA: Milieu Tétrazolium Lait ; MBA: Milieu Lait avec du bromocrésol pourpre ; Milieu optimal : MRS pour ATCC 334 et M17 pour 2F21, n=3.

Souches	MTA	MBA	Milieu optimal
<i>L. paracasei</i> ATCC 334	-/-	+/+/+	+/+/+
<i>L. lactis</i> 2F21	-/-	+/+/+	+/+/+



Figure 35 : Observations visuelles des activités réductrices sur milieu MTA supplémenté en CTC. Photo de gauche : les 3 tubes à gauche sont respectivement le MTA, le MBA et le milieu optimal en présence de *L. paracasei* ATCC 334 et les 3 tubes à droite les mêmes, mais en présence de *L. lactis* 2F21. Pour la photo de droite, les lignes de puits blanc sont le MTA et les puits jaune et violet sont le MBA. Les puits à gauche sont ensemencés avec *L. paracasei* ATCC334 et ceux à droite avec *L. lactis* 2F21.

Après plusieurs essais, les résultats ne montrent aucune trace de ce sel réduit, que ce soit en fluorescence ou de couleur rouge à l'œil nu. En revanche, les milieux de contrôles, avec lait supplémenté en bromocrésol pourpre et sur M17 ou MRS, montrent une acidification et une croissance de l'inoculum bactérien utilisé au cours de l'expérience (Tableau 20 & Figure 35). La publication de Corich et al. (2004) confirme l'incapacité des bactéries lactiques à réduire ce sel de tétrazolium.

B. Approche mesure par absorbance

Le CTC étant le seul sel de tétrazolium connu pour fluorescer une fois réduit en formazan, une approche de cinétique de réduction bactérienne dans le visible a été envisagée en utilisant un autre sel de tétrazolium. Le lait n'étant pas un milieu idéal pour un suivi de cinétique dû à son opacité, nous avons cherché à élaborer un milieu se rapprochant de la composition du lait et permettant la croissance de différents genres de bactéries lactiques.

1. Élaboration d'un milieu spécifique pour bactéries lactiques

Pour élaborer ce milieu de criblage, nous avons cherché, dans un premier temps, à formuler un milieu minimal pour chaque groupe de bactéries lactiques, soit les lactobacilles mésophiles, les lactobacilles thermophiles, les streptocoques et les lactocoques. Pour chaque genre, nous avons choisi une souche pour les représenter. Ce milieu minimal a pour but de s'assurer de la survie des espèces dans le milieu du test de criblage. La concentration de lactose présente dans ce milieu a été choisie à partir des concentrations retrouvées en moyenne dans le lait UHT écrémé.

Tableau 21 : Concentrations initiales (Ci) et finales bactériennes (Cf) après 16 heures d'incubation à température optimale. SL' : Solution Lactose ; SL : Solution Lactose Tampon ; SELL' : Solution Lactose Extrait de Levure ; SELL : Solution Lactose Extrait de levure Tampon. n=3.

Milieux	<i>L. paracasei</i> ATCC 334		<i>L. lactis</i> 2F21		<i>L. bulgaricus</i> ATCC 20081		<i>S. thermophilus</i> FTS2	
	C _i (UFC.mL ⁻¹)	C _f (UFC.mL ⁻¹)	C _i (UFC.mL ⁻¹)	C _f (UFC.mL ⁻¹)	C _i (UFC.mL ⁻¹)	C _f (UFC.mL ⁻¹)	C _i (UFC.mL ⁻¹)	C _f (UFC.mL ⁻¹)
SL'		2,40 ± 0,43 10 ⁸		3,97 ± 0,56 10 ⁷		<10 ⁻²		<10 ⁻²
SL	1,65.10 ⁶	1,51 ± 0,41 10 ⁹	6,00.10 ⁶	7,25 ± 1,73 10 ⁸	1,58.10 ⁶	<10 ⁻²	5,75.10 ⁶	7,00 ± 1,80 10 ⁶
SELL'		1,72 ± 0,03 10 ⁸		7,92 ± 2,45 10 ⁷		<10 ⁻²		1,08 ± 0,81 10 ⁶
SELL		1,13 ± 0,11 10 ⁹		1,22 ± 0,13 10 ⁹		8,25 ± 2,88 10 ⁶		1,01 ± 0,19 10 ⁷



Figure 36 : Résultats visuels de la réduction du sel de tétrazolium (TTC) dans chacun des milieux en présence de chacune des espèces. BP : milieux avec présence de bromocrésol pourpre.

D'après les résultats du Tableau 21 et de la Figure 36, les milieux minimaux SL' et SELL' ne présentent aucune coloration des culots pour chaque espèce testée. Ces milieux n'étant pas discriminants pour des cinétiques de réduction avec sels de tétrazolium, ils n'ont donc pas été retenus. Concernant les milieux SL et SELL, pour l'ensemble des espèces sauf pour *L. bulgaricus*, des culots roses/rouges ont pu être observés. Ces milieux semblent favorables à la discrimination des bactéries lactiques en fonction de leur activité réductrice. L'absence de culot coloré chez *L. bulgaricus* est en cohérence avec la littérature, car cette espèce a un faible pouvoir réducteur et ne permet pas la réduction du sel de tétrazolium TTC. Par contre, seul le milieu le milieu SELL a permis de maintenir une concentration bactérienne à 6 log UFC.mL⁻¹ pour l'espèce *L. bulgaricus* représentante des lactobacilles thermophiles.

Ainsi, seul le milieu SELL permet une croissance ou une survie pour l'ensemble des espèces représentantes de chaque genre ainsi qu'une réduction du sel de tétrazolium TTC donnant un culot rose/rouge.

Afin de venir compléter ce milieu minimal et d'en faire un milieu de criblage se rapprochant d'un milieu de type lait, nous avons ajouté du lait écrémé UHT afin d'apporter les sources azotées et carbonées propres au lait. Pour cela, nous avons testé différentes concentrations de lait UHT écrémé permettant la croissance de chaque espèce et également la possibilité de faire un suivi de cinétique de réduction des sels de tétrazolium dans le visible.

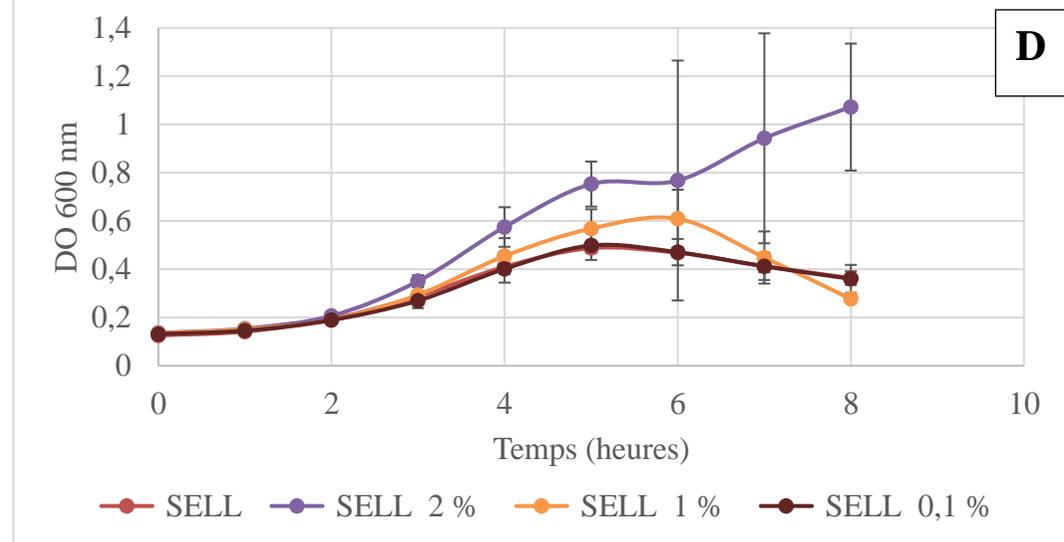
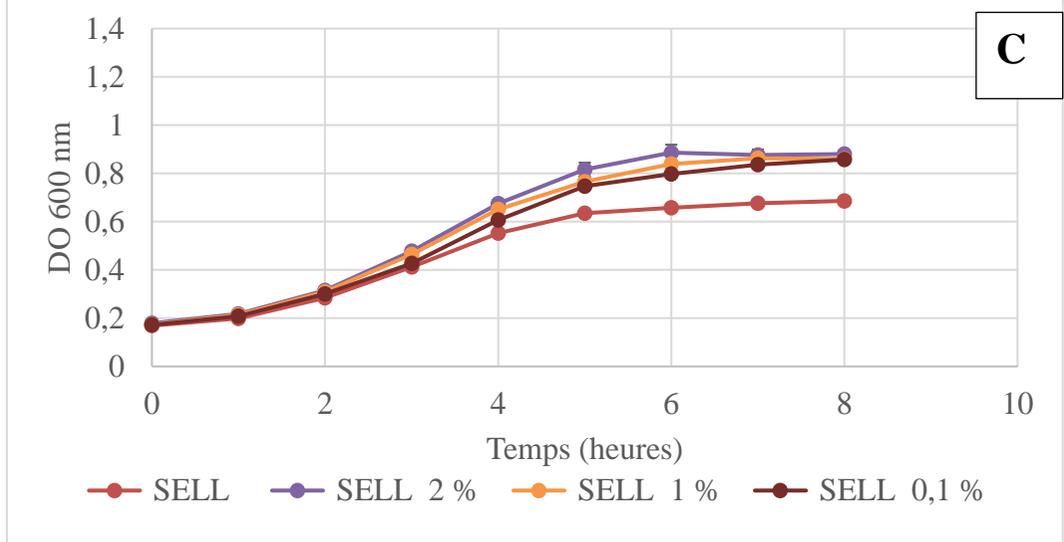
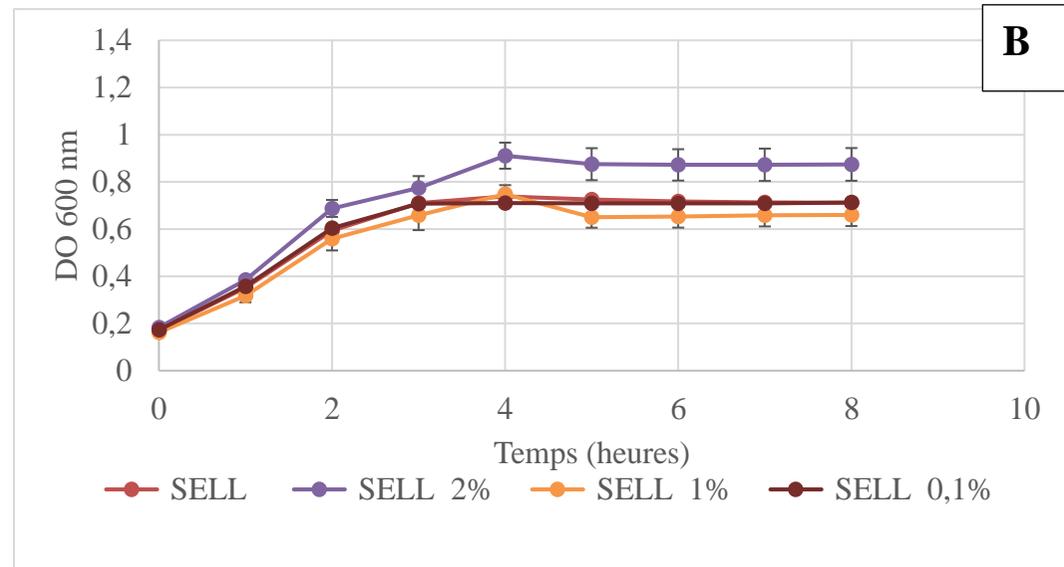
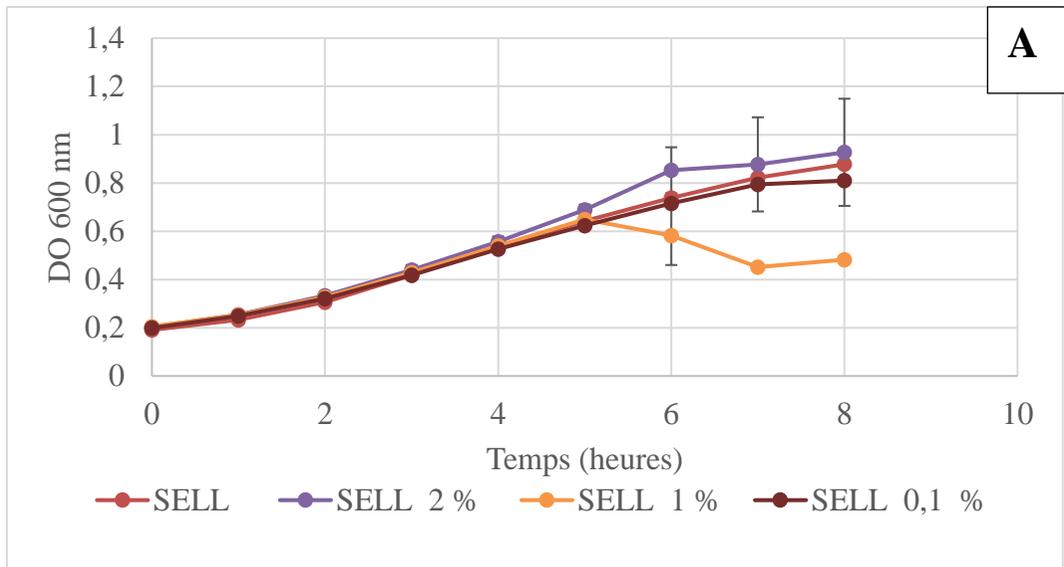


Figure 37 : Cinétiques de croissance des souches *L. paracasei* ATCC 334 (A), *L. lactis* 2F21(B), *L. bulgaricus* ATCC 20081 (C) et *S. thermophilus* FTS2 (D) dans le milieu SELL en présence de différentes concentrations de lait UHT écrémé (n=3).

Tableau 22 : Valeurs des μ_{\max} et DO_{\max} obtenues pour chacune des souches testées dans le milieu SELL en présence de différentes concentrations de lait UHT. μ_{\max} : taux de croissance maximal et DO_{\max} : valeur maximale de DO à 600 nm. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey ; lecture en colonne.

Milieux	μ_{\max} (h ⁻¹)			
	<i>L. paracasei</i> ATCC 334	<i>L. lactis</i> 2F21	<i>L. bulgaricus</i> ATCC 20081	<i>S. thermophilus</i> FTS2
SELL	0,110 ± 0,001 ^a	0,270 ± 0,005 ^a	0,147 ± 0,002 ^c	0,164 ± 0,003 ^a
SELL 0,1%	0,100 ± 0,001 ^b	0,272 ± 0,003 ^a	0,155 ± 0,001 ^{bc}	0,162 ± 0,023 ^a
SELL 1%	0,102 ± 0,001 ^b	0,269 ± 0,008 ^a	0,162 ± 0,003 ^{ab}	0,189 ± 0,032 ^a
SELL 2%	0,108 ± 0,001 ^a	0,287 ± 0,013 ^a	0,164 ± 0,001 ^a	0,221 ± 0,022 ^a
	DO_{\max}			
SELL	0,822 ± 0,0064 ^a	0,714 ± 0,013 ^{ab}	0,677 ± 0,001 ^b	0,413 ± 0,025 ^a
SELL 0,1%	0,794 ± 0,0057 ^a	0,709 ± 0,004 ^{ab}	0,836 ± 0,012 ^a	0,412 ± 0,057 ^a
SELL 1%	0,649 ± 0,0141 ^a	0,659 ± 0,047 ^b	0,863 ± 0,028 ^a	0,449 ± 0,108 ^a
SELL 2%	0,877 ± 0,1952 ^a	0,873 ± 0,069 ^a	0,876 ± 0,023 ^a	0,943 ± 0,435 ^a

D'après les courbes de la Figure 37, pour *L. paracasei* ATCC334 et quel que soit la concentration de lait ajouté, aucune différence n'a été observée sur les croissances bactériennes. En revanche, pour les autres espèces, l'ajout de lait pour *L. bulgaricus* et plus précisément 2% de lait UHT écrémé pour *L. lactis* 2F21 et *S. thermophilus* FTS2 permet d'obtenir des cinétiques de croissance qui ont tendance à être supérieures à celles obtenues dans le milieu sans lait. Ces observations visuelles se confirment par le calcul avec les paramètres de μ_{\max} et de DO_{\max} . Les μ_{\max} calculés sur SELL 2% sont supérieures par rapport aux autres milieux et ceux pour l'ensemble des souches. De plus, nous observons une homogénéisation des valeurs de DO_{\max} autour de 0,8 - 0,9 dans le milieu SELL 2% pour l'ensemble des souches ce qui n'est pas le cas pour les autres milieux (Tableau 21). Ainsi, nous observons avec le milieu SELL avec 2% de lait écrémé une meilleure croissance pour 3 des 4 souches étudiées ; ce milieu sera donc retenu pour le criblage des souches de bactéries lactiques.

2. Choix du sel de tétrazolium et validation de la méthode de criblage

Comme mentionné dans le chapitre 3 de la partie bibliographique sur les sels de tétrazolium, il en existe différents types. Nous avons choisi d'utiliser les sels de tétrazolium appartenant à la catégorie formazan (solubles dans l'eau). L'intérêt d'utiliser de ces sels est, d'une part, leur forme réduite se trouvant dans le surnageant et non dans le culot, et d'autre part leur utilisation facile en plaque 96 puits. Cependant, Tsukatani et al. (2008) mettent en avant la possibilité de réduction de ces sels par des molécules du milieu comme l'extrait de levure. Ainsi, nous avons sélectionné le WST-8, car ce dernier semble être moins enclin à réagir aux molécules réductrices présentes dans le milieu. De plus, par souci de sensibilité de la méthode, nous avons pris la décision de supprimer l'extrait de levure de notre milieu de criblage, car celui-ci absorbe à la même longueur d'onde que la forme réduite du WST8, soit à 460 nm. Ainsi, nous avons fait le choix d'utiliser le milieu SL 2% au lieu du milieu SELL 2%.

a) Impact de l'acidification sur WST8 dans le milieu de criblage

Ne connaissant pas la stabilité du sel de tétrazolium WST8 en cas d'une acidification à l'origine de l'activité métabolique des bactéries lactiques, nous avons simulé une acidification avec ajout d'acide lactique et sans présence de bactéries lactiques dans le milieu SL et suivi l'absorbance à 460 nm pour détecter l'apparition du formazan orange.

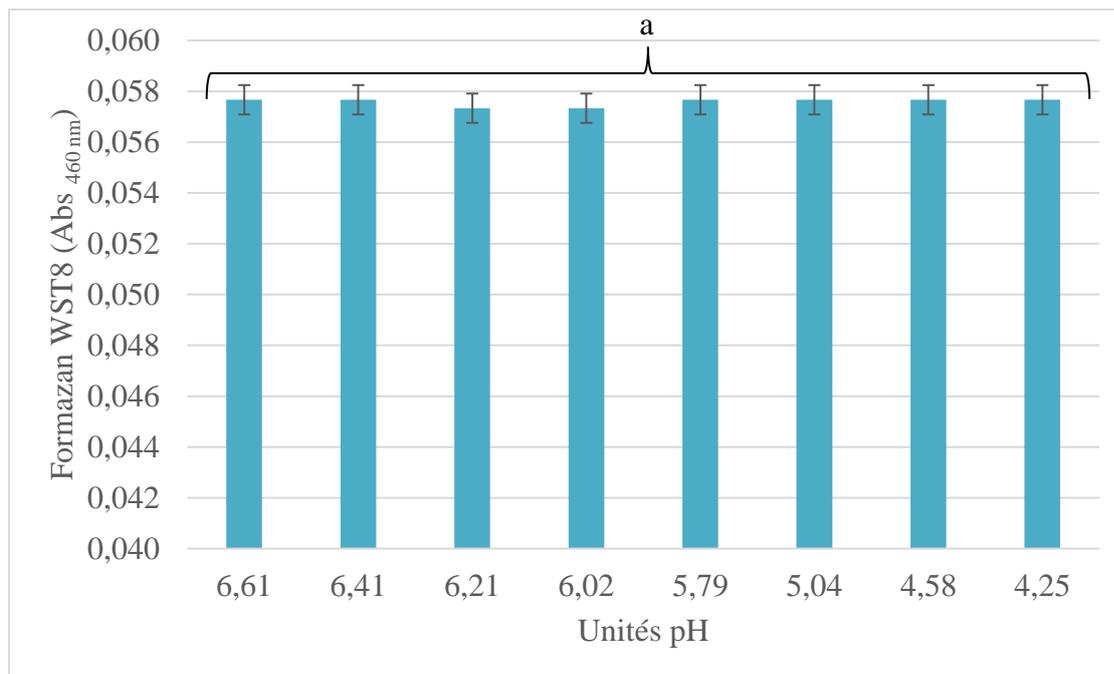


Figure 38 : Impact de différentes valeurs de pH sur la réduction du sel de tétrazolium WST8. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

D'après les résultats résumés à la Figure 38, aucune différence d'absorbance à 460 nm n'a été constatée entre les différentes valeurs de pH. Ainsi, nous pouvons affirmer qu'une acidification n'a pas d'impact sur le WST8.

b) Test de la méthode sur le genre Lactococcus et validation avec PORA

Étant donné la suppression de l'extrait de levure du milieu SELL 2%, nous avons décidé de tester et valider le milieu SL 2% du criblage avec le WST8 à partir de levains commerciaux (starters) contenant des lactocoques. Ce choix a été fait en raison des résultats démontrés dans le paragraphe 2.3.1 où l'absence d'extrait de levure (milieu SL) n'influençait pas la viabilité de *L. lactis* et l'ajout de 2% de lait permettait d'améliorer la μ_{\max} et la DO_{\max} .

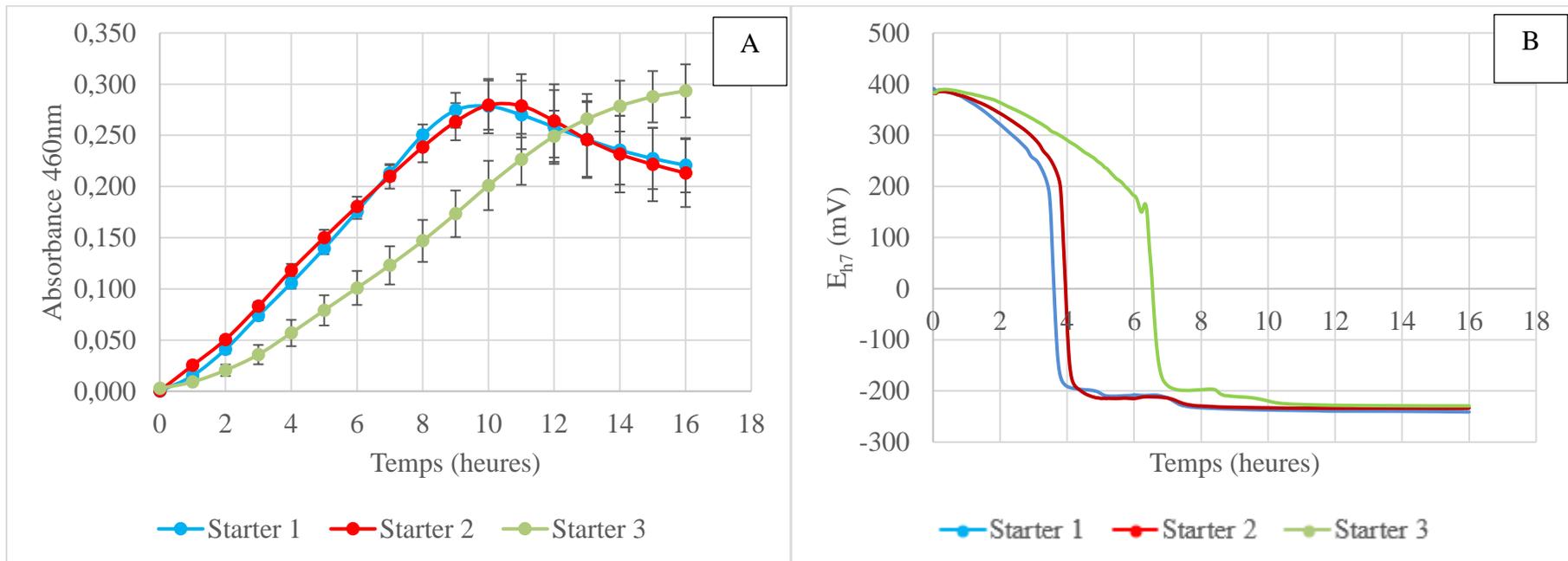


Figure 39 : Cinétiques de réduction avec la méthode ABRA (A) et la méthode PORA (B) de différents starters commerciaux appartenant au genre *Lactococcus*, n=3.

Tableau 23 : Valeurs des descripteurs de cinétiques de réduction obtenues avec les méthodes PORA et ABRA pour différents starters. V_r max/ t_r max pour PORA et V_{abs} max et t_{abs} max pour ABRA. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey en ligne.

Souches	Starter 1	Starter 2	Starter 3
PORA			
V_r max (mV.h ⁻¹)	-1596 ± 138 ^a	-1527 ± 65 ^a	-1050 ± 149 ^b
t_r max (heures)	3,68 ± 0,04 ^b	4,13 ± 0,17 ^b	6,72 ± 0,15 ^a
ABRA			
V_{abs} max (abs.h ⁻¹)	0,041 ± 0,003 ^a	0,0392 ± 0,004 ^a	0,0286 ± 0,003 ^b
t_{abs} max (heures)	9,80 ± 0,42 ^b	10,51 ± 0,37 ^b	15,93 ± 0,07 ^a

Les résultats des cinétiques de réduction du WST8 par les starters à partir de la méthode ABRA montrent que les starters 1 et 2 ont des cinétiques similaires alors que le starter 3 a une cinétique plus lente (Figure 39). En effet, en comparant les V_{absmax} et le temps pour atteindre l'absorbance maximale (t_{absmax}), les valeurs des starters 1 et 2 sont significativement différentes de celles du starter 3. Ainsi, selon la méthode ABRA, le starter 3 aurait une cinétique de réduction plus lente que les deux autres, alors que les starters 1 et 2 ont des activités réductrices similaires.

Ces résultats de la méthode ABRA sont en cohérence avec ceux obtenus avec la méthode PORA. Les paramètres V_rmax et t_rmax des starters 1 et 2 sont également significativement différents de ceux du starter 3, confirmant que l'activité réductrice du starter 3 est plus lente que les deux autres. De la même manière, les paramètres de PORA ne permettent pas de discriminer les starters 1 et 2 entre eux qui de fait auraient une activité réductrice similaire (Tableau 23).

Par conséquent, la méthode PORA valide la méthode ABRA rendant cette dernière pertinente pour ces starters commerciaux contenant des lactocoques. Ayant validé ABRA avec des lactocoques, nous avons également réalisé d'autres tests avec différentes souches appartenant à différents genres de bactéries lactiques afin de savoir si la méthode est applicable pour toutes les bactéries lactiques et si elle peut, comme PORA, discriminer des souches appartenant à des genres différents.

Tableau 24 : Valeurs des descripteurs obtenues avec les méthodes PORA et ABRA pour des souches pures. $V_{r,max}/t_{r,max}$ pour PORA et $V_{abs,max}$ et $t_{abs,max}$ pour ABRA. $V_{abs,max}$: Vitesse d'absorbance maximale ; $t_{abs,max}$: temps à la vitesse d'absorbance maximale ; $V_{r,max}$: Vitesse de réduction maximale ; $t_{r,max}$: temps à la vitesse de réduction maximale ; $E_{h7\ min}$: Valeur minimale E_{h7} ; Abs_{max} : valeur d'absorbance la plus haute.
n Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

Souches	<i>L. lactis</i> 8F8	<i>L. lactis</i> 4F33	<i>L. rhamnosus</i> F9 5 60	<i>L. rhamnosus</i> F10 7 64	<i>L. helveticus</i> F 1014	<i>L. helveticus</i> ATCC 15009
Inoculum (UFC.mL⁻¹)	3,33 ± 3 .10 ⁶ a	5,38 ± 7 .10 ⁵ bc	6,85 ± 11 .10 ⁵ bc	2,96 ± 19 .10 ⁵ c	2,49 ± 8 .10 ⁵ c	8,83 ± 10 .10 ⁵ b
PORA						
V_{r,max} (mV.h⁻¹)	-1422 ± 45 d	-943 ± 106 c	-571 ± 51 b	-191 ± 50 a	-78 ± 3 a	-80 ± 4,2 a
t_{r,max} (heure)	3,8 ± 0,2 d	7,6 ± 0,4 c	7,7 ± 0,2 c	14,0 ± 0,1 b	14,0 ± 0,3 a	11,8 ± 0,4 a
E_{h7 min} (mV)	-228 ± 27 c	-204 ± 4 c	-193 ± 5 c	123 ± 38 ab	162 ± 21 b	78 ± 8 a
ABRA						
V_{abs,max} (abs.h⁻¹)	0,100 ± 0,004 a	0,032 ± 0,001 b	0,011 ± 0,001 c	0,008 ± 0,002 cd	0,003 ± 0,001 d	0,014 ± 0,003 c
t_{abs,max} (heure)	1,3 ± 0,1 e	8,3 ± 0,4 d	9,5 ± 0,3 c	10,8 ± 0,8 b	1,1 ± 0,5 e	15 ± 0,1 a
Abs_{max}	0,350 ± 0,001 a	0,314 ± 0,010 b	0,083 ± 0,008 c	0,078 ± 0,018 c	0,008 ± 0,003 d	0,021 ± 0,011 d

Comme pour les starters, les résultats du Tableau 24 montrent une cohérence entre les souches de *L. lactis* et *L. rhamnosus*. En effet, les deux techniques permettent de discriminer les souches moins réductrices des plus réductrices au sein d'une même espèce ; ainsi *L. lactis* 8F8 est plus réductrice que *L. lactis* 4F33, et pour les souches de lactobacilles, *L. rhamnosus* F9 5 60 est plus réductrice que F10 7 64. En revanche, la sensibilité du criblage ne semble pas suffisante pour les espèces de lactobacilles thermophiles et de streptocoques thermophiles (résultats non montrés).

De même, nous constatons qu'il n'est pas possible de comparer les différents genres entre eux avec la méthode ABRA. En effet, la comparaison statistique des $V_{\text{abs,max}}$ entre les souches avec ABRA donne de différents résultats de ceux retrouvés avec la technique PORA. Par exemple, avec les méthodes PORA, la souche *L. rhamnosus* F9 5 60 présente une $V_{\text{r,max}}$ supérieure à celle de *L. helveticus* ATCC 15009 tandis qu'avec la méthode ABRA, le descripteur équivalent ne l'est pas. Cet exemple souligne l'incapacité du criblage avec ABRA à comparer l'activité de réduction de souches interespèces. De plus, les Abs_{max} n'ont pas de corrélation avec le $E_{\text{h7 min}}$ alors que les deux paramètres ont la même signification dans les deux méthodes. En effet, même si les valeurs intraespèces sont cohérentes avec la méthode ABRA, celles interespèces ne le sont pas ; comme par exemple, les valeurs Abs_{max} entre *L. rhamnosus* F9 5 60 et *L. lactis* 8F8 qui sont significativement différentes alors que les $E_{\text{h7 min}}$ ne le sont pas.

Ce résultat pourrait s'expliquer de deux manières : la première étant l'application du calcul pour obtenir la valeur d'absorbance. En effet, le calcul implique la soustraction de $\text{DO}_{460\text{nm}}$ à la valeur brute obtenue par la mesure, sauf que la turbidité entre les espèces n'est pas la même, d'où la baisse d' Abs_{max} . La seconde serait la capacité des différentes espèces de bactéries lactiques à réduire le WST8. En effet, il se pourrait que les lactocoques aient une capacité à réduire le WST8 plus importante que les lactobacilles ou les streptocoques.

En résumé, cette méthode de criblage apparaît pertinente pour comparer des activités réductrices intraespèces de souches de lactocoques et de lactobacilles mésophiles, mais ne permet pas de comparaison interespèce.

En conclusion, ce chapitre regroupe les différentes étapes qui ont permis d'élaborer une nouvelle méthode de criblage et également de sélectionner différentes souches plus ou moins réductrices. Ces résultats, nécessaires pour le chapitre 2, nous ont permis de choisir différentes souches ou cultures mixtes de bactéries lactiques réductrices à tester contre *C. tyrobutyricum* à l'origine du DGT en conditions fromagères.

Chapitre 2: Étude de l'activité réductrice de bactéries lactiques en fabrication fromagère

I. Contexte

Le chapitre 2 regroupe l'ensemble des résultats obtenus lors de l'étude de l'impact des souches réductrices sélectionnées au cours du chapitre 1 sur l'apparition du défaut du gonflement tardif à l'échelle pilote, soit au cours de fabrications type Emmental.

L'étude regroupe 6 fabrications d'au maximum 4 cuves comprenant à chaque fois un témoin positif avec l'ajout de spores de *C. tyrobutyricum*. Chaque modalité étudiée au cours de cette expérience, impliquant ou non des cultures pures ou mixtes de bactéries lactiques réductrices sélectionnées au cours du chapitre 1 des résultats, a été nommée de la manière suivante :

- T- : Fabrication fromagère avec les levains *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *P. freundenreichii* ;
- T+ : Fabrication fromagère avec les levains *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *P. freundenreichii* et ajout de spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 ;
- LcR : Fabrication fromagère avec les levains *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *P. freundenreichii*, les spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 et *L. lactis* 8F8, un lactocoque avec une cinétique de réduction Rapide;
- LcL : Fabrication fromagère avec les levains *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *P. freundenreichii*, les spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 et *L. lactis* 4F33, un lactocoque avec une cinétique de réduction Lente;
- LcR+LbL : Fabrication fromagère avec les levains *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *P. freundenreichii*, les spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 et *L. lactis* 8F8, un lactocoque avec une cinétique de réduction Rapide combiné avec *L. rhamnosus* F10 7 64, un lactobacille à cinétique de réduction Lente;
- LcR+LbR : Fabrication fromagère avec les levains *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *P. freundenreichii*, les spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 et *L. lactis* 8F8, un lactocoque avec une cinétique de réduction Rapide combiné avec *L. rhamnosus* F9 5 60, un lactobacille à cinétique de réduction Rapide.

Les résultats de ce chapitre ont été divisés en deux grandes parties. **La première partie** concerne la première étape que nous avons nommée l'étape en cuve regroupant l'ensemble des étapes réalisées en cuve jusqu'au démoulage après pressage. Le but de l'analyse de cette étape est d'étudier l'impact des modalités avec les bactéries réductrices sur la matrice type Emmental et de s'assurer que chaque modalité apporte son effet escompté. Avant de pouvoir étudier l'activité réductrice de ces bactéries lactiques, il était important de s'assurer que la matrice lait et les différents facteurs pouvant impacter l'activité réductrice de ces bactéries au cours de la fabrication soient similaires. Ainsi, nous avons vérifié que l'objectif du ratio matière grasse (MG)/ Matière Azoté Protéique (MAP) fixé à 0,92 avec un pourcentage d'erreur de +/- 5% était bien obtenu pour l'ensemble des laits utilisés au cours de cette étude.

Nous avons ensuite analysé statistiquement, à l'étape d'ensemencement en cuve, les concentrations des microflores indigènes du lait après pasteurisation, puis celles des levains, des spores de *Clostridium* et des bactéries lactiques réductrices pour chacune des modalités. L'objectif de cette analyse était de s'assurer de l'homogénéité des conditions de fabrication. L'analyse des concentrations bactériennes au sein d'une même modalité permet de s'assurer qu'aucun biais n'est observé au cours de la cinétique de réduction.

Au cours de la fabrication jusqu'au démoulage, des biais issus de l'hétérogénéité des matériels ou encore le risque d'hétérogénéité dans la manipulation du fromager et une différence dans l'enchaînement des étapes fromagère peuvent influencer l'activité réductrice des bactéries lactiques réductrices. Ainsi, afin de nous affranchir de ces phénomènes, nous avons choisi d'analyser les facteurs température, l'oxygène dissous et la cinétique d'acidification qui selon nous sont ceux les plus impactant sur l'activité réductrice.

L'analyse de l'ensemble de ces facteurs microbiologiques, matière première et technologie fromagère, nous permettra d'apporter la meilleure approche pour l'analyse statistique de la cinétique de réduction dans la matrice type Emmental, de connaître le réel impact des bactéries lactiques réductrices ajoutées sur les cinétiques et valeurs E_{h7} finales pour chacune des modalités.

La seconde partie de l'expérimentation se résume à l'étape d'affinage. Au cours de cette étape, nous nous sommes assurés de pouvoir comparer les différents fromages statistiquement entre eux malgré les différents laits et conditions de fabrication (jours, etc..). Pour cela, nous nous sommes penchés sur l'évolution des paramètres d'extrait sec au cours de l'affinage, ainsi que du taux de NaCl et des concentrations des acides organiques d'intérêt pour l'étude, soit le

lactate, l'acétate, le citrate, le propionate et le butyrate, aux premiers jours d'affinage. Dans notre approche, nous avons considéré l'évolution de l'extrait sec comme le reflet de celle de l' A_w au sein des fromages et donc des activités enzymatiques et des conditions de croissance bactérienne au cours de l'affinage ; tandis que le pourcentage de NaCl et des concentrations des acides organiques au premier jour d'affinage étaient des facteurs pouvant influencer le phénomène de germination ou la croissance de *C. tyrobutyricum* et des concentrations bactériennes de levains et des bactéries lactiques réductrices. Ainsi, avant de pouvoir comparer les différents fromages, il fallait que ces paramètres soient similaires.

Durant l'étape d'affinage, nous avons mis en place un système de suivi des cinétiques de réduction et d'acidification au cours des 24 premiers jours d'affinage. Cependant, nous avons constaté beaucoup d'artefacts et de valeurs aberrantes lors de l'analyse des cinétiques de réduction et d'acidification rendant les descripteurs de cinétique inexploitable. Malgré les recommandations de Cachon et De Coninck (2012), notre système d'acquisition n'était pas suffisamment protégé contre les interférences électriques ou électromagnétiques issues des moteurs des équipements retrouvés en cave d'affinage.

Afin de pouvoir tout de même comprendre l'impact de E_{h7} sur le gonflement tardif qui apparaît durant l'affinage, nous sommes partis du fait que la dernière valeur E_{h7} mesurée lors de l'étape en cuve se maintiendrait au cours des 24 premiers jours d'affinage. Cette prise de position s'appuie sur les travaux de Topcu et al. (2008) où il n'a été observé aucune variation de l' E_h entre le démoulage, le premier jour ainsi que tout au long de l'affinage.

Des analyses microbiologiques, d'acide organique et des scanners des fromages ont été réalisés à différents jours de l'affinage : J+1, J+12, +24, J+31 et J+55 (J+1 à J+12 correspondants à l'étape de préaffinage à 12 °C, J+24 et J+31 l'étape de cave chaude à 24 °C, et J+55 en cave froide à 4 °C). Le suivi scanner a pour but d'évaluer l'évolution des ouvertures dans le fromage pouvant être dues à la production de CO_2 par *P. freundenreichii*, les lactobacilles mésophiles ou bien dues à l'activité métabolique liée à *C. tyrobutyricum* produisant du CO_2 ou de l' H_2 .

Concernant les analyses microbiologiques, elles ont pour but d'une part, d'étudier l'évolution des populations de bactéries lactiques réductrices au cours de l'affinage afin de s'assurer qu'elles aient toujours une activité métabolique et donc de supposer qu'elles maintiennent une activité réductrice tout au long de la période en l'absence de mesure d' E_{h7} et d'autre part, de s'assurer que l'ajout de bactéries lactiques réductrices appartenant au genre des lactobacilles n'impacte pas la croissance des bactéries propioniques. En effet, selon Jimeno et al. (1995), les

produits finaux issus du métabolisme du citrate réalisé par les lactobacilles mésophiles, l'acétate, le formate ou encore le diacétyl, peuvent avoir un effet inhibiteur sur la croissance des bactéries propioniques et donc impacter la qualité des ouvertures des fromages.

En plus de ces analyses, un suivi des acides organiques a été réalisé. Nous avons choisi de suivre au cours de l'affinage le lactate, l'acétate, le butyrate, le propionate et le citrate. Le lactate est un substrat important au cours de l'affinage. En effet, le lactate est catabolisé par les bactéries propioniques pour donner du propionate, de l'acétate et du CO₂ à l'origine des ouvertures dans les fromages type Emmental, ou encore, il est oxydé en présence d'acétate par *C. tyrobutyricum* pour produire du butyrate, du CO₂ et du H₂ à l'origine du gonflement tardif. Il va de soi que l'étude de l'acétate avec celle du butyrate pourra apporter des informations importantes sur l'apparition du gonflement tardif initié par *C. tyrobutyricum*, ou encore celle du propionate pour l'activité métabolique des bactéries propioniques.

II. Standardisation du lait avant fabrication

Pour la fabrication de fromages à pâte pressée cuite type Emmental, un objectif de ratio matière grasse (MG)/Matière Azoté Protéique (MAP) a été fixé à 0,92 avec un pourcentage d'erreur de +/- 5%. Les valeurs de standardisations sont résumées dans le Tableau 25 ci-dessous :

Tableau 25 : Analyses des laits avant fabrication. MG : Matière grasse ; MAP : Matière azotée protéique ; R : ratio de MG/MAP ; ES : Extrait Sec.

Lait	MG (g.L ⁻¹)	MAP (g.L ⁻¹)	R	Lactose (g.L ⁻¹)	ES (g)	pH
1	30,59	33,44	0,915	49,01	121,76	6,67
2	29,47	32,21	0,915	49,06	119,39	6,70
3	30,00	32,42	0,925	48,56	119,74	6,61
4	30,03	32,75	0,917	49,10	120,56	6,75
5	29,12	31,83	0,915	49,14	118,70	6,60
6	29,19	31,67	0,922	49,01	118,52	6,71
Moyenne	29,73	32,39	0,918	48,98	119,78	6,67
Ecart-type	0,57	0,65	0,004	0,21	1,22	0,06
Pourcentage d'erreur (%)	4,94	2,25	1,15	1,18	2,70	2,25

Les pourcentages d'erreur calculés sont inférieurs à 5%. Nous pouvons donc admettre que l'ensemble des laits utilisés pour les fabrications sont équivalents. Ainsi l'impact de la matière grasse sur les spores de *C. tyrobutyricum* ainsi que la concentration initiale de lactose et l'extrait sec, paramètres représentant indirectement l' A_w , et pouvant influencer les activités enzymatiques et microbiennes sur la fabrication fromagère n'auront pas d'effet dans notre étude.

III. Contrôle microbien du lait après pasteurisation et ensemencement avec des spores de *Clostridium*

Le lait utilisé au cours de différentes fabrications a été soumis aux contrôles microbiologiques standards. Les résultats de dénombrements des coliformes, des spores de *Clostridium* et de la flore mésophile aérobie revivifiable (flore mésophile) ont été réalisés (Figure 40).

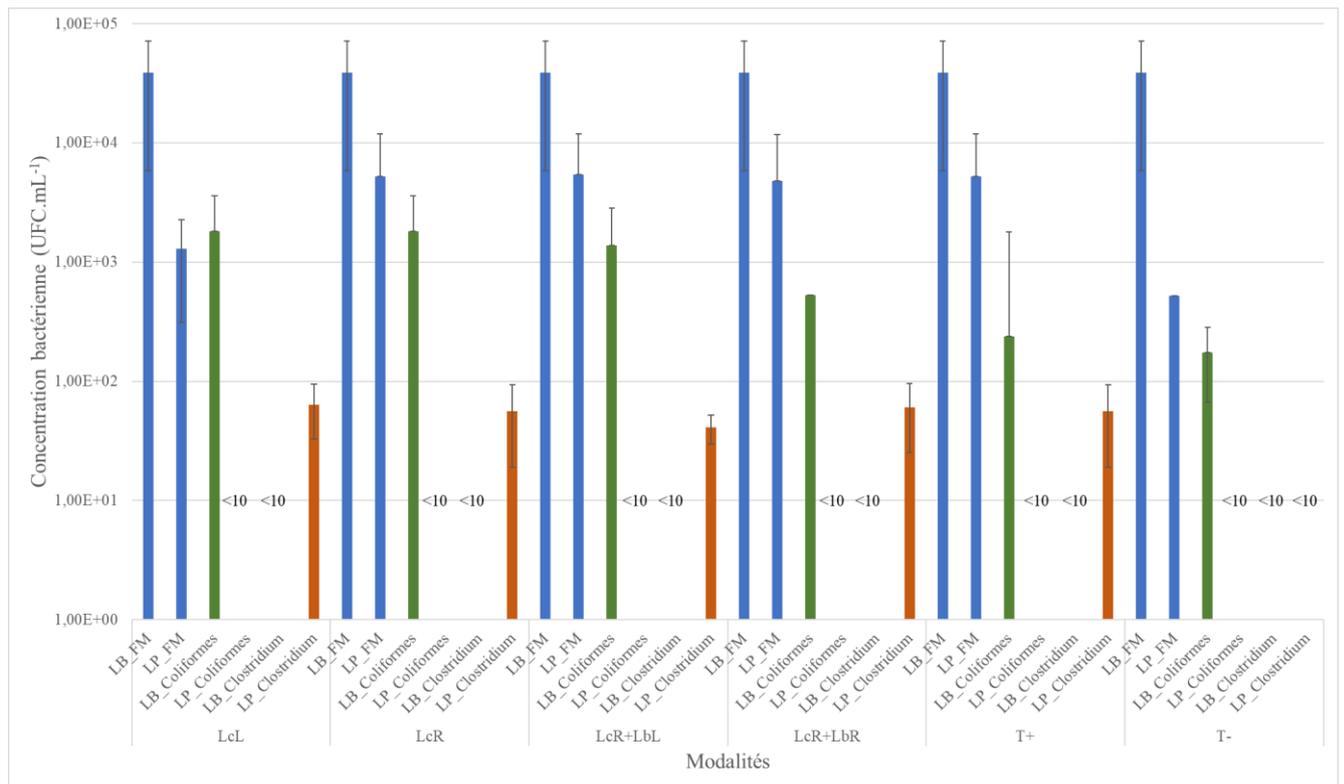


Figure 40 : Dénombrement des flores mésophiles, des Coliformes et des *Clostridia* avant et après pasteurisation. LB_FM : Flore mésophile avant pasteurisation ; LP_FM : Flore mésophile après pasteurisation ; LB_Coliformes : Coliformes avant pasteurisation ; LP_Coliformes : Coliformes après pasteurisation ; LB_Clostridium : *Clostridium* avant pasteurisation ; LP_Clostridium : *Clostridium* après pasteurisation.

Pour l'ensemble des modalités, la population des coliformes a chuté de 2-3 log UFC.mL⁻¹ de lait à une concentration inférieure à 10 UFC.mL⁻¹ et la flore mésophile a vu sa population se réduire de 1 log UFC.mL⁻¹ pour l'ensemble des modalités après pasteurisation. Concernant la population de *Clostridium*, les résultats dans le lait avant pasteurisation ont montré une concentration de spores ou cellules végétatives inférieure au seuil de détection laissant sous-entendre une absence de cellules dormantes ou végétatives de l'espèce.

Cette observation nous a conduit à la décision d'ensemencer volontairement les laits de fabrication avant l'étape de pasteurisation avec des spores de *Clostridium tyrobutyricum* CIRM BIA 2237, préparées en laboratoire à une concentration initiale de 10⁶ UFC.mL⁻¹, afin d'obtenir une concentration finale dans le lait de 8 x 10⁴ spores.L⁻¹ ; l'intérêt de cette démarche étant de se rapprocher au mieux des conditions pouvant être retrouvées en fromagerie. Le choix de cette

concentration finale se base sur les charges élevées retrouvées dans des cas réels de contamination en fromagerie.

Au final, après pasteurisation, les concentrations des flores mésophiles et des spores de *C. tyrobutyricum* dans les laits des différentes modalités sont similaires entre elles (Tableau 26).

Tableau 26 : Dénombrement des flores mésophiles et de *Clostridium* après pasteurisation. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture en colonne.

Modalités	Flore mésophile (UFC.mL ⁻¹)	<i>C. tyrobutyricum</i> (UFC.L ⁻¹)
LcL	1,29 ± 0,98 .10 ³ a	6,38 ± 3,11 .10 ⁴ a
LcR	5,21 ± 6,73 .10 ³ a	5,63 ± 3,73 .10 ⁴ a
LcR + LbL	5,46 ± 6,47 .10 ³ a	4,08 ± 1,13 .10 ⁴ a
LcR + LbR	4,81 ± 7,02 .10 ³ a	6,05 ± 3,52 .10 ⁴ a
T+	5,21 ± 6,73 .10 ³ a	5,63 ± 3,73 .10 ⁴ a
T-	5,24 ± 0,01 .10 ³ a	∅

Ces résultats nous permettent de postuler que les niveaux de microflores indigènes et que les populations de *C. tyrobutyricum* sont homogènes pour chacune des modalités avant fabrication fromagère.

En résumé, les résultats de la standardisation du lait et du contrôle des flores microbiennes après pasteurisation nous assure de l'homogénéité des laits avant chaque fabrication fromagère et que les possibles variations observées au cours de l'étape en cuve et en affinage ne seront pas influencées par cette étape.

IV. La fabrication : Étape en cuve jusqu'au démoulage

Au cours de la fabrication, nous avons identifié les différents facteurs clés pouvant influencer les cinétiques de réduction des différentes modalités et induire des biais dans notre étude. Ne pouvant pas tous les contrôler, nous les avons analysés statistiquement afin de savoir si ces derniers évoluaient de la même manière au cours de la fabrication ou bien identifier ceux qui ont pu avoir un impact sur la cinétique de réduction et donc le E_{h7} final. Les facteurs que nous avons étudiés dans ce paragraphe sont la concentration des levains et des bactéries lactiques réductrices à l'ensemencement, la teneur en O₂ dissous et la cinétique de température.

A. Ensemencements bactériens : Levains lactiques, bactéries lactiques réductrices et bactéries propioniques

L'activité réductrice bactérienne étant liée à l'inoculum bactérien, il est important de s'assurer que les concentrations des ferments et des bactéries lactiques réductrices ne soient pas différentes. Ainsi, des dénombrements des ferments et des bactéries réductrices ont été réalisés après ensemencement du lait (Tableau 27).

Tableau 27 : Dénombrement des ferments et bactéries lactiques réductrices après ensemencement en cuve. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture en colonne.

Modalités	<i>Lactocoques</i> (UFC.mL ⁻¹)	<i>L. helveticus</i> (UFC.mL ⁻¹)	<i>S. thermophilus</i> (UFC.mL ⁻¹)	Lactobacilles Hétérofermentaires (UFC.mL ⁻¹)	<i>P. freudenreichii</i> (UFC.mL ⁻¹)
LcL	1,45 ± 0,21 .10 ⁶ ^a	1,41 ± 1,9 .10 ⁵ ^a	1,38 ± 0,09 .10 ⁶ ^a	-	2,55 ± 0,33 .10 ⁶ ^a
LcR	2,00 ± 0,62 .10 ⁶ ^a	9,22 ± 5,61 .10 ⁴ ^a	1,37 ± 0,13 .10 ⁶ ^a	-	2,17 ± 0,12 .10 ⁶ ^a
LcR+LbR	1,97 ± 0,41 .10 ⁶ ^a	4,13 ± 2,24 .10 ⁵ ^a	1,48 ± 0,27 .10 ⁶ ^a	1,71 ± 2,3 .10 ⁶ ^a	2,00 ± 0,28 .10 ⁶ ^a
LcR+LbL	1,68 ± 0,33 .10 ⁶ ^a	5,04 ± 6,8 .10 ⁵ ^a	1,56 ± 0,31 .10 ⁶ ^a	6,88 ± 3,48 .10 ⁵ ^b	3,90 ± 0,31 .10 ⁶ ^a
T+	-	4,11 ± 3,52 .10 ⁵ ^a	1,19 ± 0,13 .10 ⁶ ^a	-	2,70 ± 0,31 .10 ⁶ ^a
T-	-	8,51 ± 5,53 .10 ⁴ ^a	1,74 ± 0,55 .10 ⁶ ^a	-	2,27 ± 0,42 .10 ⁶ ^a

Pour chacune des espèces de ferments, soient *L. helveticus*, *S. thermophilus* et *P. freundenreichii*, aucune différence des ensemencements n'a été constatée entre les différentes modalités. De même, aucune différence significative n'a été constatée entre les ensemencements de lactocoques réducteurs ou ceux de lactobacilles mésophiles. Ainsi, nous pouvons déjà admettre que les différences d' E_{h7} au cours de l'étape en cuve ne seront pas influencées par une divergence des concentrations bactériennes à l'ensemencement du lait.

A. Analyse des paramètres pH, température et teneur O_2 dissous

L'étape en cuve, implique un cycle de température précis tout au long des différentes étapes de la fabrication de type Emmental ainsi que des étapes impliquant une incorporation d' O_2 via l'air aux étapes de brassage, de délactosage, de moulage. Une variation de ces facteurs au cours des fabrications peut avoir un impact sur l'activité réductrice des bactéries lactiques ainsi que sur la valeur finale du E_{h7} . Ainsi, nous avons analysé à différentes étapes de la fabrication les valeurs de température et d' O_2 dissous dans la cuve dans le but de s'assurer que ces deux facteurs aient eu une évolution similaire, laissant sous-entendre un même impact sur l'activité réductrice au cours des différentes fabrications.

L'analyse statistique point par point des cinétiques de températures et d' O_2 dissous au cours des fabrications (Figure 41), nous montre une consommation totale de l' O_2 dans la matrice laitière au bout de 2 heures de pressage pour l'ensemble des modalités et plus généralement aucune différence entre les différentes modalités à chaque étape clé de la fabrication.

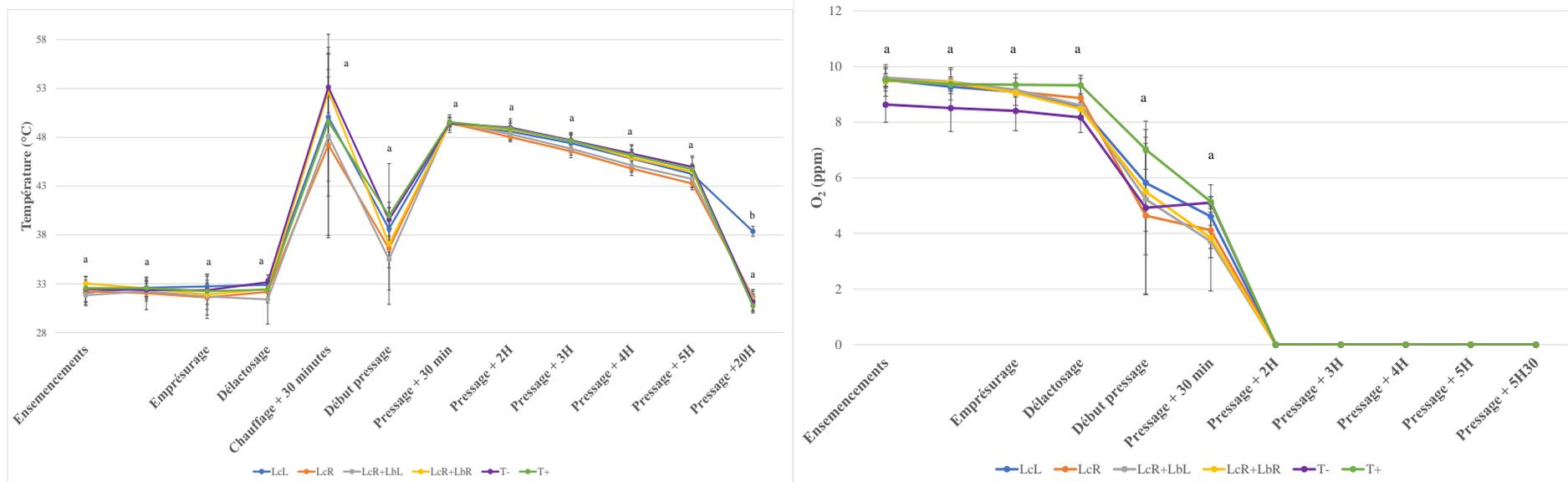


Figure 41 : Cinétiques de la température (A) et de l'O₂ dissous (B) au cours de la fabrication fromagère Test ANOVA n= 3, $\alpha= 0,05$, comparaison tukey point par point.

Ainsi, nous pouvons admettre que les cycles de température et l'évolution de l'O₂ dissous obtenu au cours des différentes fabrications avec les différentes modalités ont eu un impact similaire sur l'activité bactérienne et donc sur l'activité réductrice et les valeurs E_{h7} finales.

Lors du choix des bactéries lactiques réductrices, un des critères importants de sélection était lié à leur capacité d'acidification. En effet, l'ajout de certaines souches de lactocoques, au même moment que les ferments lactiques thermophiles, peut influencer la cinétique d'acidification au cours de l'étape en cuve, donnant des valeurs finales inférieures à celles escomptées en fin de pressage et occasionnant un défaut de fabrication au cours de l'affinage. De plus, le pH est directement lié aux valeurs redox. Malgré des cinétiques de réduction normalisées à pH 7, il est nécessaire d'analyser les cinétiques d'acidification afin de s'affranchir de l'impact de ce paramètre au cours de l'analyse des cinétiques de réduction.

L'analyse des descripteurs des cinétiques d'acidification a montré une différence des t_amax d'environ 1 heure entre le T- et les autres modalités pour atteindre la vitesse maximale (V_amax), alors que ce dernier reste similaire entre les différentes modalités. Cette différence entre les t_amax pourrait s'expliquer par la présence des lactocoques susceptibles d'améliorer les conditions environnementales favorisant les ferments lactiques thermophiles anaérobies facultatifs (Tableau 28).

Tableau 28 : Paramètres des cinétiques d'acidification des fromages et valeurs pH en début et fin de fabrication. pH_i : pH du lait ; pH_{min} : pH en fin de fabrication ; V_amax : Vitesse maximale d'acidification ; t_amax : Temps pour atteindre la vitesse maximale. Test ANOVA n=3, α=0,05, comparaison tukey lecture par colonne.

Modalités	pH _i	pH _{min}	V _a max (UpH.h ⁻¹)	t _a max (heure)
LcL	6,69 ± 0,06 ^a	5,43 ± 0,06 ^{ab}	-0,52 ± 0,07 ^a	4,74 ± 0,12 ^{ab}
LcR	6,68 ± 0,07 ^a	5,42 ± 0,02 ^{ab}	-0,76 ± 0,18 ^a	4,60 ± 0,08 ^b
LcR + LbL	6,71 ± 0,04 ^a	5,37 ± 0,03 ^{ab}	-0,84 ± 0,42 ^a	4,55 ± 0,11 ^b
LcR + LbR	6,66 ± 0,03 ^a	5,36 ± 0,02 ^{ab}	-0,72 ± 0,12 ^a	4,36 ± 0,27 ^b
T-	6,63 ± 0,01 ^a	5,34 ± 0,05 ^b	-0,58 ± 0,17 ^a	5,23 ± 0,10 ^a
T+	6,69 ± 0,05 ^a	5,46 ± 0,05 ^a	-0,56 ± 0,07 ^a	4,71 ± 0,29 ^b

Concernant les valeurs de pH après démoulage (pH_{\min}), celles des T+ et T- sont différentes avec le pH_{\min} du T+ significativement supérieur à celui du T-. Tandis que celles des modalités LcL, LcR, LcR+LbL et LcR+LbR ne sont pas différentes des T- et T+.

B. Analyse des cinétiques de réduction des différentes modalités

L'analyse statistique point par point des cinétiques de réduction des différentes modalités aux différentes étapes de fabrication du fromage (Figure 42) ne montre aucune différence sauf à l'étape à 20 h pressage.

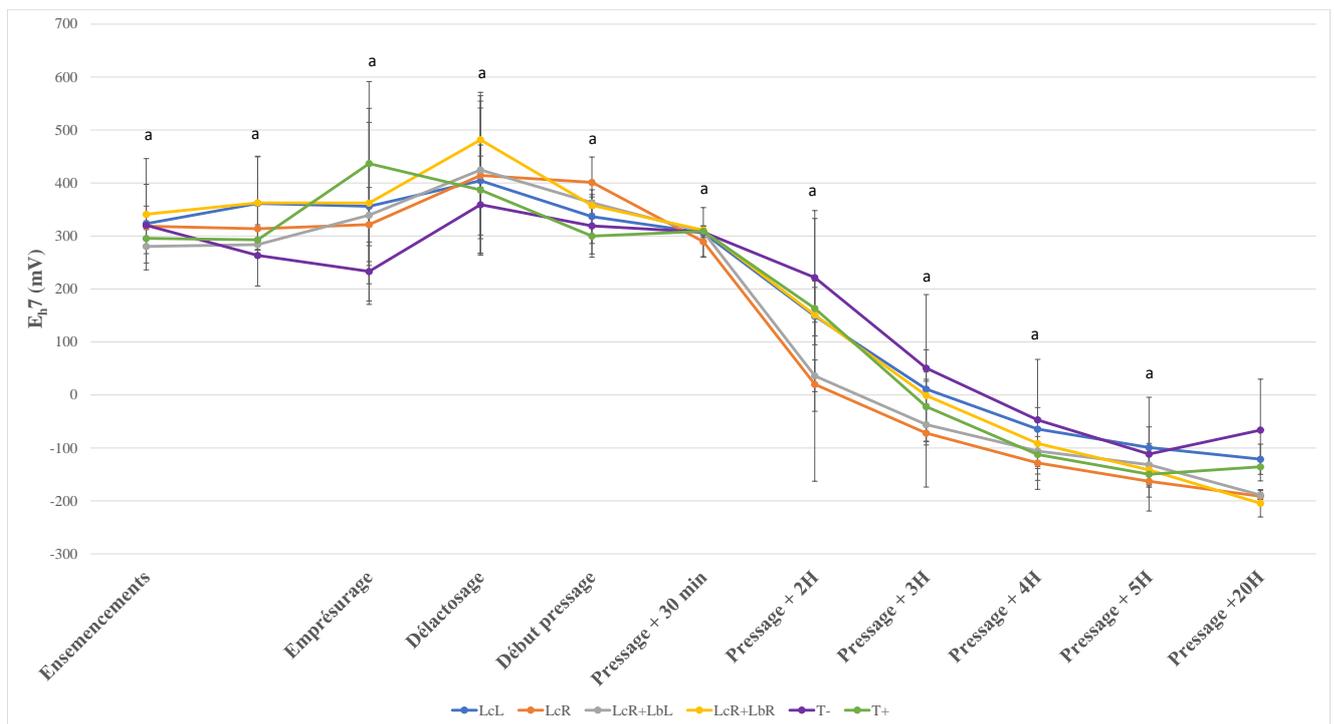


Figure 42 : Cinétiques de réduction au cours de la fabrication fromagère. Test ANOVA $n=3$, $\alpha=0,05$, comparaison tukey point par point.

Plus précisément, l'analyse du paramètre $V_{r\max}$ des cinétiques de réduction (Tableau 29), nous confirme cette première analyse. Malgré une sélection des souches de bactéries lactiques réductrices avec différents profils de réduction en laboratoire, la technologie fromagère et l'implication des ferments ne permettent pas d'obtenir des différences de vitesses de réduction maximales escomptées. Les $V_{r\max}$ pour l'ensemble des modalités ne montrent aucune différence.

Tableau 29 : Paramètres descripteurs des cinétiques de réduction des fromages. $E_{h7 \text{ min}}$: E_{h7} en fin de fabrication ; $V_{r \text{ max}}$: Vitesse maximale de réduction ; $t_{r \text{ max}}$: Temps pour atteindre la vitesse maximale. Test ANOVA $n=3$, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture par colonne.

Modalités	$V_{r \text{ max}}$ (mV.h^{-1})	$t_{r \text{ max}}$ (h)	$E_{h7 \text{ min}}$ (mV)
LcL	-300 ± 41 ^a	$4,9 \pm 0,09$ ^{abc}	-115 ± 15 ^a
LcR	-347 ± 91 ^a	$4,7 \pm 0,12$ ^{abc}	-177 ± 24 ^b
LcR + LbL	-274 ± 8 ^a	$4,7 \pm 0,26$ ^{bc}	-176 ± 5 ^b
LcR + LbR	-396 ± 59 ^a	$4,4 \pm 0,24$ ^c	-200 ± 18 ^b
T-	-345 ± 19 ^a	$5,2 \pm 0,21$ ^a	-118 ± 7 ^a
T+	-310 ± 36 ^a	$5,1 \pm 0,17$ ^{ab}	-125 ± 1 ^a

Cependant, nous observons tout de même un impact des bactéries lactiques réductrices sélectionnées au niveau des $t_{r \text{ max}}$ et des valeurs d' $E_{h7 \text{ min}}$ au démoulage (Tableau 29). Malgré des vitesses de réduction similaires, l'ajout de bactéries lactiques réductrices permet d'atteindre la vitesse maximale plus tôt que le T- concernant les modalités impliquant le LcR combiné avec les lactobacilles LbR et LbL. Concernant, les modalités avec les lactocoques seuls (LcR et LcL), les résultats obtenus ne montrent pas de différence avec les témoins (T+ et T-). Tandis qu'avec les modalités de lactocoques et lactobacilles, les $t_{r \text{ max}}$ sont différentes de ceux des témoins. Pour finir, nous observons un impact des bactéries lactiques réductrices sur la valeur $E_{h7 \text{ min}}$ au démoulage ; une moyenne de -184 mV a été obtenue pour les modalités avec bactéries lactiques réductrices contre -119 mV pour les modalités sans bactérie lactique réductrice. Ainsi, avec les modalités LcR, LcR+LbL et LcR+LbR, un environnement plus réducteur a été obtenu dans le fromage à l'étape de démoulage (début d'affinage).

V. Étape Affinage

A. Analyse des paramètres d'extrait sec et du taux NaCl/ Extrait sec des fromages

L'analyse statistique des résultats du Tableau 30 sur les paramètres de l'extrait sec et du ratio NaCl/Extrait sec, ne démontre aucune différence entre les fromages au cours de l'affinage. Ce qui nous permet de supposer indirectement que l'évolution de l' A_w , pouvant impacter les activités enzymatiques et métaboliques bactériennes au cours de l'affinage et donc le potentiel redox, ne serait pas différente entre l'ensemble de fromages de l'étude. Ainsi, à partir de ce constat, nous pouvons admettre que l'environnement interfromage n'est pas un facteur ayant pu avoir un impact sur cette étude cherchant à comprendre l'impact des bactéries réductrices sur l'apparition du DGT par *C. tyrobutyricum*.

Tableau 30 : Valeurs des Extraits secs au cours de l'affinage et du ratio NaCl/Extrait sec à J+72. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

Modalités	Extrait sec (g)					NaCl/E.S. (%)
	J+1	J+12	J+24	J+31	J+55	J+72
LcL	60,3 ± 0,55 ^a	61,2 ± 0,48 ^a	61,4 ± 0,23 ^a	61,4 ± 0,37 ^a	62,2 ± 0,65 ^a	0,81 ± 0,12 ^a
LcR	60,7 ± 0,80 ^a	61,5 ± 0,58 ^a	61,3 ± 0,75 ^a	61,2 ± 0,49 ^a	61,8 ± 0,86 ^a	0,77 ± 0,05 ^a
LcR + LbL	60,4 ± 0,57 ^a	61,0 ± 0,57 ^a	61,3 ± 0,42 ^a	61,3 ± 0,35 ^a	61,9 ± 0,68 ^a	0,72 ± 0,11 ^a
LcR + LbR	60,3 ± 0,30 ^a	61,3 ± 0,24 ^a	61,7 ± 0,37 ^a	61,5 ± 0,11 ^a	61,6 ± 0,84 ^a	0,82 ± 0,14 ^a
T-	61,1 ± 0,58 ^a	61,9 ± 0,23 ^a	62,0 ± 0,21 ^a	62,1 ± 0,16 ^a	62,4 ± 0,24 ^a	0,77 ± 0,03 ^a
T+	60,7 ± 0,27 ^a	61,6 ± 0,38 ^a	61,6 ± 0,17 ^a	61,2 ± 0,26 ^a	62,3 ± 0,45 ^a	0,67 ± 0,10 ^a

Concernant le % NaCl /Extrait sec, aucune différence n'a été observée en fin d'affinage entre les différentes modalités de fromage. De plus, les concentrations de NaCl sont en dessous des seuils d'inhibition retrouvés dans les travaux de Silveti et al. (2018), ce qui nous permet également de négliger ce potentiel facteur d'inhibition de la germination des spores de *C. tyrobutyricum*.

Par conséquent, à la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que l'environnement intrafromage n'a pas eu d'impact sur les phénomènes biochimiques et physiques, notamment le défaut de gonflement tardif, observé durant l'affinage et que les résultats obtenus pour tous les fromages peuvent être comparés statistiquement entre eux.

B. Analyses microbiologiques, des acides organiques et scanners au cours de l'affinage

Les dénombrements bactériens, au jour 1 de l'affinage (Tableau 31), ne montrent aucune différence entre les modalités pour les trois starters utilisés. Ce qui nous permet d'admettre que la technologie fromagère a eu le même impact jusqu'à J+1 sur toutes les populations de starters (aucune inhibition et aucun biais lié au starter). Mises à part les populations réductrices pour LcR+LbL et LcR+LbR, les populations de bactéries lactiques hétérofermentaires facultatives sont strictement inférieures à $2 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ pour les fromages LcR, LcL et les témoins. Ces résultats nous permettent donc de différencier strictement les modalités LcR+LbL/R des autres.

Une différence significative d'environ $2 \log \text{ UFC.mL}^{-1}$ a été observée entre la modalité LcR+LbR et LcR+LbL. En effet, en comparant avec les concentrations d'ensemencement à l'étape en cuve, nous ne constatons aucune évolution de la population LbL au cours de l'étape de fabrication ($6,88 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ à l'ensemencement contre $8,41 \times 10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ à J+1 d'affinage) tandis que celle de LbR s'est développée pour atteindre une population de $2,03 \times 10^8 \text{ UCF.mL}^{-1}$. Les dénombrements de spores de *Clostridium* étaient tous inférieurs au seuil de détection de notre technique de dénombrement, soient inférieurs à 100 spores. g^{-1} de fromage.

En premier constat, nous pouvons admettre que pour l'ensemble des populations bactériennes communes aux différentes modalités, soit les starters et les spores, il n'a pas été observé de différence. Ainsi, nous pouvons négliger tous biais liés à ces facteurs pouvant influencer le paramètre de potentiel redox. Nous pouvons donc nous concentrer sur la croissance des bactéries lactiques réductrices, celles de propioniques et des spores de *Clostridium* sans biais préalable.

Tableau 31 : Dénombrements des starters, des spores et lactobacilles hétérofermentaires à J+1 d'affinage. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture en colonne.

Modalités	<i>L. helveticus</i> (Log UFC.g ⁻¹)	<i>S. thermophilus</i> (Log UFC.g ⁻¹)	<i>C. tyrobutyricum</i> (Log UFC.g ⁻¹)	Lactobacilles hétérofermentaires (Log UFC.g ⁻¹)	<i>P. freudenreichii</i> (Log UFC.g ⁻¹)
LcL	7,02 ± 0,66 ^a	8,27 ± 0,22 ^a	<100	<100	7,10 ± 0,04 ^a
LcR	7,22 ± 0,13 ^a	8,41 ± 0,14 ^a	<100	<100	7,08 ± 0,06 ^a
LcR+LbR	7,27 ± 0,38 ^a	8,36 ± 0,16 ^a	<100	8,21 ± 0,41 ^a	7,14 ± 0,13 ^a
LcR+LbL	7,83 ± 0,54 ^a	8,46 ± 0,47 ^a	<100	5,90 ± 0,17 ^b	7,04 ± 0,09 ^a
T+	7,60 ± 0,22 ^a	8,14 ± 0,10 ^a	<100	<100	7,13 ± 0,03 ^a
T-	7,11 ± 0,55 ^a	8,23 ± 0,19 ^a	<100	<100	7,06 ± 0,16 ^a

L'évolution des populations bactériennes au cours de l'affinage (*C. tyrobutyricum*, *P. freundenreichii* et lactobacilles hétérofermentaires facultatifs) est décrite dans le Tableau 32.

Aucun *C. tyrobutyricum* n'a été détecté jusqu'à J+24 dans l'ensemble des modalités. À partir de J+31, les populations de *C. tyrobutyricum* atteignent en moyenne 6 Log UFC. g⁻¹ de fromage pour l'ensemble des modalités sauf pour LcR+LbR avec 5 log UFC. g⁻¹ et le T- avec aucune détection. Cependant, aucune différence significative de populations de *C. tyrobutyricum* n'a été observée à J+31 et également à J+55, excepté pour T-. La détection de *C. tyrobutyricum*, à partir de J+31, semble se corrélérer avec l'entrée en cave chaude des fromages qui débute à J+20.

Pour l'ensemble des modalités, la population des bactéries propioniques passe de 7 log UFC.g⁻¹ en moyenne à 9 log UFC.g⁻¹ entre J+12 à J+55 pour l'ensemble des modalités. Cependant, les résultats statistiques entre J+24 et J+31 montrent des différences pouvant être significatives entre la modalité LcR+LbR et les autres modalités. Les populations de bactéries propioniques de LcR+LbR sont significativement inférieures à celles obtenues par les autres modalités jusqu'à J+55, laissant sous-entendre un effet inhibiteur ralentissant leur croissance. Ayant éliminé les impacts de la technologie fromagère et les starters et n'ayant pas d'effet inhibiteur avec la modalité LcR, il serait possible que l'ajout du LbR soit à l'origine de ce ralentissement.

En dehors des modalités LcR+LbL et LcR+LbR qui expliquent la présence de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs dès J+1, aucune population n'est observée pour le reste des modalités jusqu'à J+24-J+31 ; des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont dénombrés à des concentrations pouvant atteindre 5 log UFC. g⁻¹ pour les modalités LcR, LcL et T+, mais aucune différence significative entre elles n'a été constatée à J+55 ; toutes les modalités présentaient une population de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs avec aucune différence entre elles mis à part celles avec les lactobacilles réducteurs.

Tableau 32 : Evolutions des populations bactériennes au cours de l'affinage. Test ANOVA n = 3, $\alpha = 0,05$, comparaison tukey lecture par ligne.

Espèces & Jour d'affinage		Modalités					
		LcL	LcR	LcR+LbR	LcR+LbL	T-	T+
<i>C. tyrobutyricum</i> (Log UFC.g ⁻¹)	J+1	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	J+12	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	J+24	<100	<100	<100	<100	<100	<100
	J+31	6,24 ± 0,10 ^a	6,24 ± 0,10 ^a	6,33 ± 0,38 ^a	5,61 ± 0,88 ^a	<100	6,21 ± 0,29 ^a
	J+55	6,28 ± 0,16 ^a	6,19 ± 0,49 ^a	5,82 ± 0,49 ^a	6,23 ± 0,48 ^a	<100	6,50 ± 0,13 ^a
<i>P. freundenreichii</i> (Log UFC.g ⁻¹)	J+1	7,10 ± 0,04 ^a	7,08 ± 7,08 ^a	7,04 ± 0,14 ^a	7,14 ± 0,04 ^a	7,06 ± 0,16 ^a	7,13 ± 0,03 ^a
	J+12	7,09 ± 0,13 ^a	7,16 ± 0,09 ^a	6,99 ± 0,11 ^a	7,12 ± 0,08 ^a	7,04 ± 0,04 ^a	7,10 ± 0,12 ^a
	J+24	7,78 ± 0,49 ^a	7,66 ± 0,26 ^{ab}	6,99 ± 0,16 ^b	7,44 ± 0,10 ^{ab}	7,72 ± 0,35 ^{ab}	7,31 ± 0,14 ^{ab}
	J+31	9,10 ± 0,29 ^a	9,03 ± 0,32 ^a	7,68 ± 0,80 ^b	8,98 ± 0,17 ^a	9,03 ± 0,21 ^a	8,89 ± 0,04 ^a
	J+55	9,24 ± 0,04 ^a	8,55 ± 1,09 ^a	9,12 ± 0,30 ^a	9,10 ± 0,22 ^a	9,11 ± 0,25 ^a	9,14 ± 0,13 ^a
Lactobacilles Hétérofermentaires (Log UFC.g ⁻¹)	J+1	<100	<100	8,21 ± 0,41 ^a	5,90 ± 0,17 ^b	<100	<100
	J+12	<100	<100	8,54 ± 0,12 ^a	7,06 ± 0,26 ^b	<100	<100
	J+24	<100	<100	8,50 ± 0,08 ^a	7,56 ± 0,31 ^b	<100	<100
	J+31	3,52 ± 1,16 ^b	4,63 ± 0,52 ^b	8,53 ± 0,10 ^a	8,25 ± 0,11 ^a	<100	5,76 ± 1,76 ^{ab}
	J+55	4,42 ± 2,25 ^b	5,64 ± 0,62 ^b	8,01 ± 0,26 ^a	8,10 ± 0,15 ^a	5,85 ± 0,23 ^b	6,18 ± 1,61 ^{ab}

Par comparaison avec la modalité LcR+LbR qui a une population stable (Figure 43) jusqu'à J+55, il est intéressant de constater que la population de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs de la modalité LcR+LbL évolue au cours de l'affinage par rapport à LcR+LbR (Tableau 33). Observant que l'apparition générale de population de lactobacilles se réalise à j+31 pour les modalités sans ajouts de lactobacilles, il serait pertinent de dire que l'évolution de la population observée chez LcR+LbL serait liée à la croissance de la souche LbL.

Tableau 33 : Dénombrement des lactobacilles réducteurs des modalités LcR+LbL et LcR+LbR au cours de l'affinage. Test ANOVA n = 3, $\alpha = 0,05$, comparaison tukey lecture en colonne.

Modalités	Lactobacilles hétérofermentaires réducteurs (log UFC.g ⁻¹ de fromage)				
	J+1	J+13	J+24	J+31	J+55
LcR+LbL	5,90 ± 0,17 ^b	7,06 ± 0,26 ^b	7,56 ± 0,31 ^b	8,25 ± 0,11 ^b	8,10 ± 0,15 ^a
LcR+LbR	8,21 ± 0,41 ^a	8,54 ± 0,12 ^a	8,50 ± 0,08 ^a	8,53 ± 0,10 ^a	8,01 ± 0,26 ^a

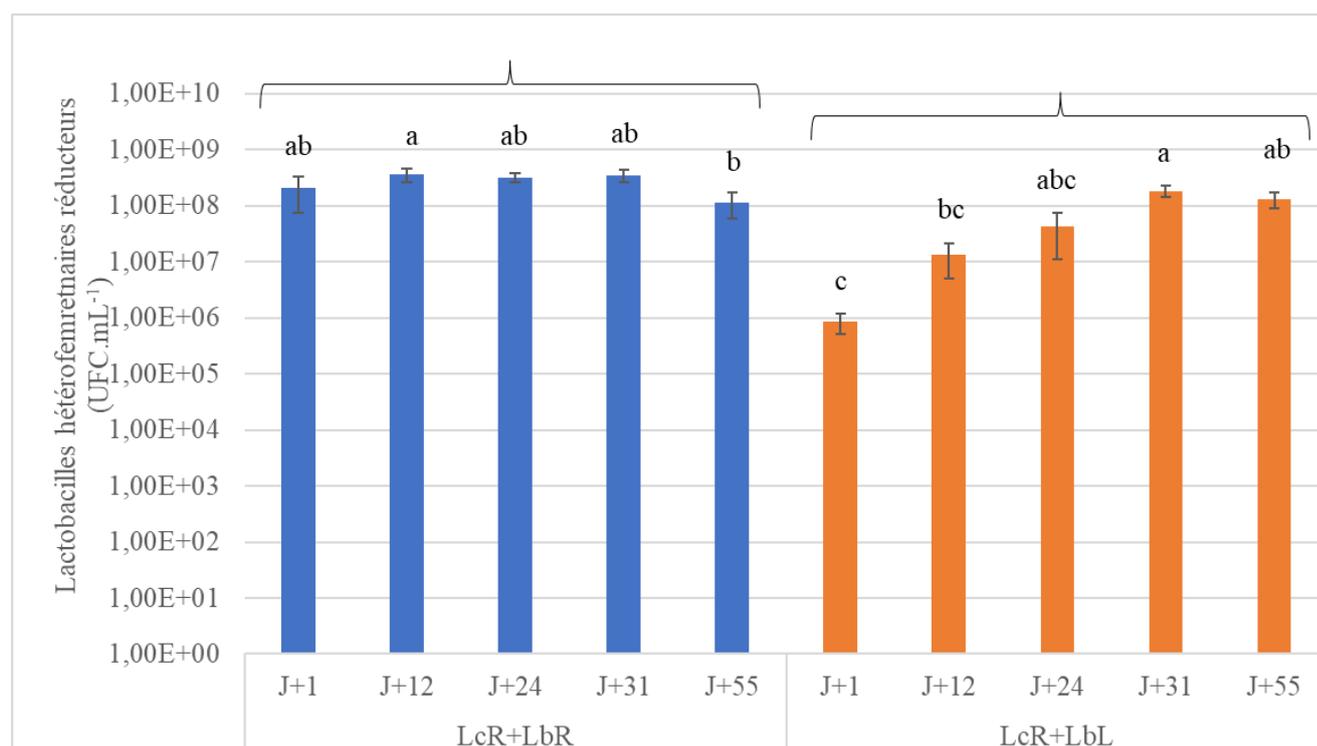


Figure 43 : Évolution des populations de lactobacilles réducteurs au cours de l'affinage. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

Afin d'apporter des informations supplémentaires pour répondre à notre problématique sur l'impact du E_h sur l'apparition du DGT par *C. tyrobutyricum*, nous avons suivi l'évolution de

différents acides organiques au cours de l'affinage ; l'ensemble des résultats détaillés se trouvant dans l'Annexe 4. Nous avons analysé l'acide organique caractéristique de la fermentation par *Clostridium*, c'est-à-dire le butyrate. Le lactate et l'acétate étant les sources de carbone pour cette voie, il aurait été intéressant de les étudier. Cependant, les variations de ces acides organiques au cours de l'affinage ne concernent pas seulement la voie métabolique de *Clostridium*. En effet, elles peuvent être également la résultante de la production de lactate et d'acétate dans le cas du métabolisme du citrate par les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs et celle des bactéries propioniques avec la consommation du lactate et la production d'acétate et de propionate. Les résultats sur l'évolution du butyrate au cours de l'affinage sont résumés dans la Figure 44.

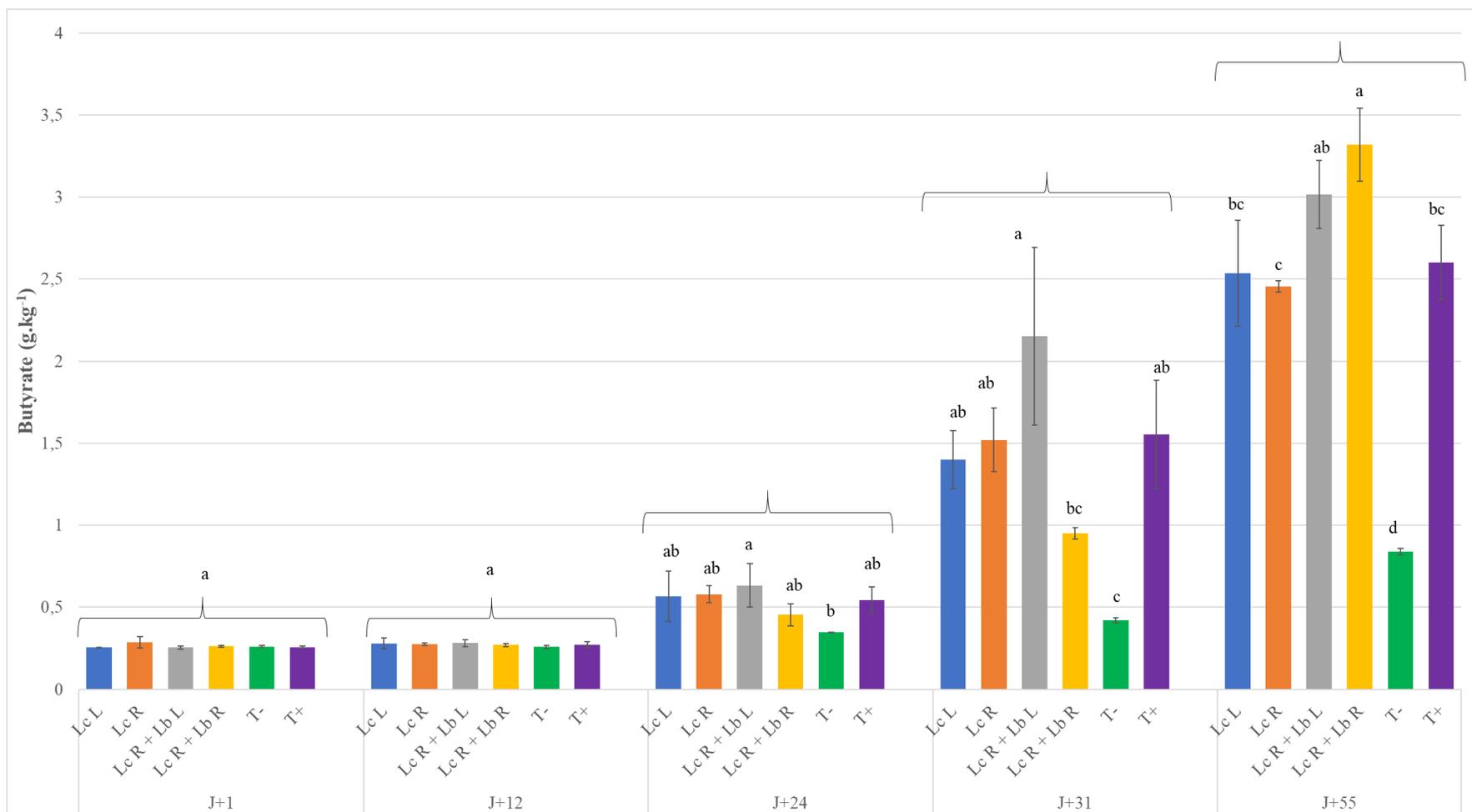


Figure 44 : Évolution du butyrate au cours au cours l'affinage pour les différentes modalités. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey.

Jusqu'à J+12, aucune différence n'a été constatée entre le T- et les autres modalités, ce qui est en cohérence avec la détection microbiologique de *Clostridium*. À partir de J+24 jusqu'à J+55, nous pouvons observer une évolution similaire des concentrations en butyrate entre les modalités LcR, LcL, LcR+LbL et le T+ et qui sont significativement supérieures à celle du T- à J+24 pour la modalité LcR+LbL et à J+31 pour les autres. Concernant la modalité LcR+LbR, les valeurs de butyrate sont sensiblement supérieures à celles du T-, mais restent non significativement différentes jusqu'à J+31. À J+55, l'ensemble des modalités contaminées par *Clostridium* montrent des valeurs supérieures à celle du T-.

À partir de ces résultats, nous pouvons déduire plusieurs éléments. D'une part, à la différence des analyses microbiologiques de *Clostridium* à J+24, l'analyse du butyrate nous permet d'apporter plus de précision sur le moment de l'initiation de la germination et donc le début de la fermentation butyrique des *Clostridia*, à l'origine du DGT, qui apparaîtrait durant les premiers jours en cave chaude selon la comparaison du T+ avec le T-. D'autre part, le potentiel réducteur induit par l'activité réductrice des bactéries lactiques des modalités LcR, LcL et LcR+LbL ne semble pas avoir d'impact sur les phénomènes de germination et le début de la fermentation butyrique chez *Clostridium* dans le fromage type Emmental. De plus, malgré une différence significative entre les valeurs de $E_{h7 \text{ min}}$ entre la modalité T- (-118 mV) et les modalités LcR+LbL et LcR (-177 et -176 mV), une valeur E_{h7} plus basse ne semble pas affecter *Clostridium*. Néanmoins, nous avons observé une évolution plus lente de la production de butyrate avec la modalité LcR+LbR suggérant un ralentissement de l'activité métabolique de *C. tyrobutyricum*. Avec ces éléments, il est difficile d'identifier la raison de ce ralentissement. Malgré une valeur $E_{h7 \text{ min}}$ non significativement différente de celles des modalités LcR et LcR+LbL, à la différence de la modalité LcR+LbL avec une croissance de LbL au cours de l'affinage, il se pourrait que la présence du *L. rhamnosus*, le plus réducteur à 8 Log UCF.g⁻¹, maintiendrait une activité réductrice suffisante tout au long de l'affinage pour ralentir l'activité métabolique de *Clostridium*. Mais il ne s'agit pas de la seule hypothèse. En analysant le citrate, nous avons également observé des valeurs inférieures au T- suggérant une métabolisation de cet acide organique par LbR. Le métabolisme du citrate peut avoir un impact sur les autres populations bactériennes du fromage comme les bactéries propioniques où les produits du métabolisme du citrate auraient un effet inhibiteur sur l'activité métabolique des bactéries propioniques. Observant ce phénomène dans la modalité LcR+LbR, il se pourrait également qu'il y ait un effet inhibiteur du métabolisme du citrate des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sur la croissance de *Clostridium* (Figure 45).

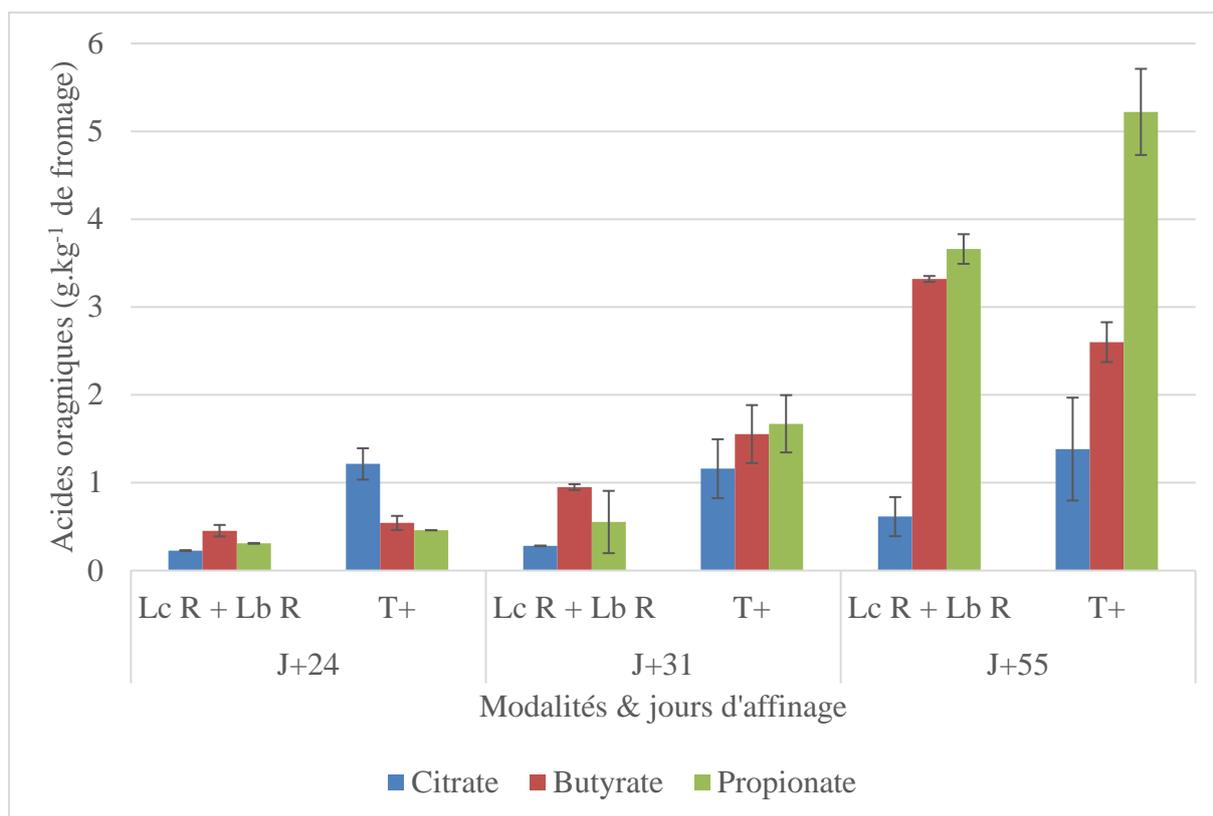


Figure 45 : Évolution du citrate, du butyrate et du propionate en cours d'affinage entre J+24 et J+55.

Le suivi de l'évolution des fromages au scanner (Tableau 34) confirme le ralentissement de l'activité métabolique de *Clostridium* entre J+24 et J+31 pour la modalité LcR+LbR. En effet, en comparant l'ensemble des modalités aux mêmes jours, les ouvertures dans les fromages LcR, LcL, LcR+LbL et le T+ sont plus larges que celles observées dans le fromage T-, ce qui nous permet de déduire qu'elles seraient caractéristiques du dégagement gazeux dû à la fermentation butyrique. Tandis que celles de LcR+LbR sont beaucoup moins conséquentes. Nous pouvons également observer une concentration de petites cavités au centre du fromage LcR+LbR à J+31, retrouvées également chez LcR+LbL, qui serait liée à l'activité métabolique du citrate avec production de CO₂ par le *L. rhamnosus*.

Tableau 34 : Suivi de l'évolution morphologique des fromages par scanner (scan par le dessus et transversal). Les tunnels transversaux sont les trous de sondes pour les prélèvements.

	LcL		LcR		LcR+LbR		LcR+LbL		T+		T-	
J+1												
J+12											-	-
J+24												
J+31												-
J+55												

Ne pouvant conclure précisément sur l'effet d'un potentiel réducteur induit par une activité réductrice bactérienne sur la germination des spores ou sur le métabolisme des cellules végétatives de *C. tyrobutyricum*, nous avons réalisé d'autres expériences à l'échelle laboratoire. L'objectif était d'étudier l'impact de l'activité réductrice bactérienne, dans un premier temps, sur la germination des spores de *C. tyrobutyricum*, puis dans un second temps, sur l'orientation des flux métaboliques.

Chapitre 3: Effet du potentiel redox sur la germination et/ou les flux métaboliques chez *C. tyrobutyricum*

I. Contexte

Les résultats obtenus en fromagerie ne nous permettent pas de mettre en évidence un lien entre l'impact du E_h et l'origine du ralentissement de l'apparition du gonflement tardif avec la modalité « lactocoque réducteur et lactobacilles réducteurs ». De plus, en supposant que le E_h soit à l'origine de ce ralentissement, il n'est pas possible de déterminer s'il a agi sur le phénomène de germination ou bien sur les flux métaboliques lors de la fermentation butyrique.

Ainsi, des études en laboratoire ont été réalisées pour déterminer l'impact du E_h sur les spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 en milieu optimal RCM en remplaçant le glucose par du lactate comme source carbonée retrouvée dans le fromage durant l'affinage et en supprimant la L-Cystéine hydrochlorure, élément réducteur du milieu. Le pH pouvant être également un paramètre déclenchant la germination, un plan factoriel à 2 niveaux a été réalisé avec deux valeurs initiales de E_h (E_{hi}) différentes et deux valeurs de pH (pH_i) initiaux afin de déterminer l'impact de chacun des paramètres, pH et/ou E_h , sur la germination. Pour obtenir différentes valeurs E_{hi} , des gaz inertes (N_2) ou réducteurs (mélange N_2/H_2) ont été utilisés. Concernant les pH_i , les valeurs de 6,6 et 5,3 ont été choisies, car caractéristiques des valeurs obtenues en début de fabrication en cuve ainsi qu'en début d'affinage, respectivement, dans une fabrication type Emmental. À l'échelle phénotypique, les suivis cinétiques pH/ E_h ont été réalisés et l'évolution de la population de *C. tyrobutyricum* et des concentrations de butyrate, lactate et acétate ont été mesurées. À l'échelle génomique, une approche transcriptomique a été envisagée, impliquant au préalable une identification de possibles gènes d'intérêt, pour venir compléter les observations à l'échelle phénotypique.

Le mécanisme de germination chez *C. tyrobutyricum* n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies. Néanmoins, des études à partir d'autres espèces de *Clostridium* ont permis de proposer un schéma général du phénomène de sporulation et d'identifier trois différents mécanismes possibles de germinations retrouvés chez *Clostridium* et *Bacillus* (Cf chp3). Pour identifier de possibles gènes impliqués dans la germination et la sporulation, une étude bio-

informatique sur la séquence du génome de *C. tyrobutyricum* a été réalisée en comparant des séquences protéiques ou nucléiques codant pour des protéines caractéristiques de ces mécanismes et identifiées chez d'autres espèces de *Clostridium* ou chez le genre *Bacillus*. Les comparaisons, basées sur le pourcentage de « query cover », ont été réalisées à partir de Blastn (comparaison entre séquence nucléique) ou Blastp (comparaison entre séquences protéiques) en fonction de l'espèce ou du genre. L'interprétation des résultats obtenus a suivi la démarche détaillée dans la Figure 46.

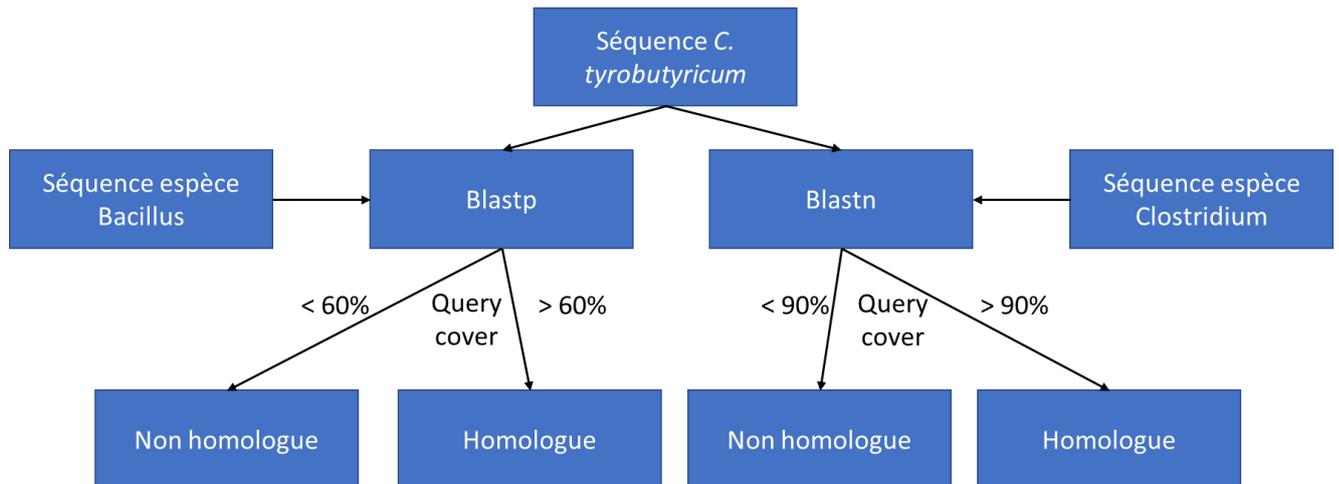


Figure 46 : Arbre de décision en fonction des résultats obtenus en bio-informatique.

Travaillant avec la souche *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237, un séquençage de son génome et son annotation ont été effectués afin de réaliser l'étude bio-informatique. Son séquençage a fait l'objet d'une première publication (Munier et al., 2019).

Une seconde étude bio-informatique a été réalisée sur la voie métabolique de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237. Ce métabolisme a longtemps fait l'objet de controverses et a évolué jusqu'à la publication de Lee et al. (2016) proposant un schéma différent de ceux retrouvés chez Gottschalk (1979) ou encore McSweeney et Sousa (2000) sur la souche type de l'espèce. N'ayant aucune autre référence bibliographique pour confirmer ce schéma à partir d'une autre souche de *C. tyrobutyricum*, nous avons, dans un premier temps, identifié les différences entre les schémas métaboliques puis réalisé des comparaisons entre séquences nucléiques afin de valider, chez notre souche, le schéma métabolique à partir du glucose.

Dans un second temps, une recherche d'un mécanisme pouvant être impliqué dans l'oxydation du lactate a été menée à partir des observations obtenues dans la littérature. Un fois identifié et

introduit dans le schéma métabolique, une validation de ce schéma a été réalisée à partir de données expérimentales en fermentation continue avec *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 et en utilisant l'approche par analyse des flux métaboliques, des équilibres carbonés et du recyclage des cofacteurs. Pour cette analyse, nous avons réalisé une fermentation continue à $D=0,016 \text{ h}^{-1}$ pour obtenir des données du lactate et acétate consommés et du butyrate produit. Cette étape a abouti à l'écriture d'une publication qui est actuellement en révision dans le journal International Microbiology et que nous présenterons dans son format pré-print.

L'objectif était d'obtenir un schéma métabolique valide et complet pour pouvoir étudier l'impact des variations du E_h sur les flux métaboliques chez *C. tyrobutyricum* sur lactate.

II. Séquençage du génome de la souche *Clostridium tyrobutyricum* CIRM BIA 2237

Pour réaliser les recherches bio-informatiques sur une souche de *C. tyrobutyricum* pouvant déclencher le DGT, nous avons réalisé son séquençage. Cela a débouché sur une publication, ci-dessous, détaillant l'ensemble des étapes de résultats du séquençage.



Whole-Genome Sequencing and Annotation of *Clostridium tyrobutyricum* Strain Cirm BIA 2237, Isolated from Silage

Edouard Munier,^{a,b} Hélène Licandro-Séraut,^b Christine Achilleos,^a Rémy Cachon,^b Eric Beuvier^a

^aURTEL, INRA, Poligny, France

^bUMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques, Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, Dijon, France

ABSTRACT *Clostridium tyrobutyricum* is the main bacterial species leading to the late blowing defect, a major cause of spoilage in semihard and hard cheeses. This study reports the complete genome sequencing, assembly, and annotation of *C. tyrobutyricum* strain Cirm BIA 2237, formerly called CNRZ 608, isolated from silage.

The strict anaerobic endospore-forming bacterium *Clostridium tyrobutyricum* is known to be the leading cause of the late blowing defect in semihard and hard cheeses (1, 2), which results in huge losses of products and profits in the cheese industry. Spores of *C. tyrobutyricum* contaminate the milk during milking and survive throughout the pasteurization process. Butyric fermentation due to *C. tyrobutyricum* produces butyric acid, hydrogen, and carbon dioxide, resulting in characteristic defects in cheeses, such as late blowing and altered flavor. This metabolic pathway remains poorly understood for *C. tyrobutyricum*. To date, the genome sequence of the type strain ATCC 25755 has been sequenced and annotated (3), but its role in the late blowing defect has not been studied. Some projects of *C. tyrobutyricum* draft genome sequencing from the late blowing defect in cheese have been initiated (4, 5).

We report the whole-genome sequencing, assembly, and annotation of *C. tyrobutyricum* strain Cirm BIA 2237 (formerly CNRZ 608 [6]), belonging to the French National Institute for Agricultural Research collection. This strain was isolated from silage and is known to cause the late blowing defect in semihard and hard cheeses. It was also used as a reference strain in many studies (7–14).

C. tyrobutyricum was grown in reinforced clostridial medium (RCM) (Biokar, France) at 37°C in an anaerobic chamber. The genomic DNA isolation and sequencing were performed by Genoscreen, France. Extraction of the genomic DNA was performed using the Qiagen Genra Puregene kit, and the DNA was quantified by fluorescence using the Qubit double-stranded DNA broad-range (dsDNA BR) kit. The sequencing libraries were prepared with the Illumina Nextera XT sample prep kit and sequenced using an Illumina HiSeq 2 × 100-bp sequencing platform. A total of 10,595,027 raw reads were obtained. Raw data quality analysis was performed with FastQC v0.11.5 (15), and elimination of sequences containing undetermined or small-sized (<60 bp) nucleotides or a Phred score under 30 was performed with Prinseq v0.20.4 (16). The *de novo* assembly, which consists of 93 scaffolds, was performed using SPAdes v3.10.1 (k-mer sizes of 21, 33, 55, and 77) (17). The assembly was verified by calculating the reads mapped back to contigs (RMBC) index using Bowtie v2.1.0 with stringent mapping parameters (18) and by evaluating the depth of scaffold sequencing using SAMtools v1.5 (19). Scaffolds with a value of less than 200 bp were removed. Annotation was performed using Prokka v1.11 (20) with the hidden Markov model (HMM) (21) and UniProt (22) databases by predicting open reading frames (ORFs) and HMMER v3.1b2 (23) with the eggNOG v4.5 (24) database for a supplementary annotation from ORFs.

The strain Cirm BIA 2237 genome is composed of a chromosome of 3.16 Mb with a

Citation Munier E, Licandro-Séraut H, Achilleos C, Cachon R, Beuvier E. 2019. Whole-genome sequencing and annotation of *Clostridium tyrobutyricum* strain Cirm BIA 2237, isolated from silage. *Microbiol Resour Announc* 8:e00492-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00492-19>.

Editor Vincent Bruno, University of Maryland School of Medicine

Copyright © 2019 Munier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Edouard Munier, edouard.munier@inra.fr.

Received 2 May 2019

Accepted 9 July 2019

Published 25 July 2019

GC content of 30.75% and does not contain plasmids. It comprises 3,182 coding sequences.

The genome analysis showed that this strain is composed of genes encoding the required enzymes involved in butyric fermentation from lactate and acetate. The genome annotation will ease studies of the mechanisms causing the defect of late blowing during cheese ripening.

Data availability. The complete genome sequence of *C. tyrobutyricum* strain Cirm BIA 2237 has been deposited in DDBJ/EMBL/GenBank (25) under the accession number CP038158, and the raw reads have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive under the accession number PRJNA524264.

ACKNOWLEDGMENT

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- Klijn N, Nieuwenhof FF, Hoolwerf JD, Van Der Waals CB, Weerkamp AH. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 61:2919–2924.
- Brändle J, Domig KJ, Kneifel W. 2016. Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control* 67:96–113. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038>.
- Jiang L, Zhu L, Xu X, Li Y, Li S, Huang H. 2013. Genome sequence of *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755, a butyric acid-overproducing strain. *Genome Announc* 1:e00308-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00308-13>.
- Bassi D, Fontana C, Gazzola S, Pietta E, Puglisi E, Cappa F, Cocconcelli PS. 2013. Draft genome sequence of *Clostridium tyrobutyricum* strain UC7086, isolated from Grana Padano cheese with late-blowing defect. *Genome Announc* 1:e00614-13. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00614-13>.
- Storari M, Wüthrich D, Bruggmann R, Berthoud H, Arias-Roth E. 2015. Draft genome sequences of *Clostridium tyrobutyricum* strains FAM22552 and FAM22553, isolated from Swiss semi-hard red-smear cheese. *Genome Announc* 3:e00078-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00078-15>.
- Roux C, Bergère JL. 1977. Taxonomic characters of “*Clostridium tyrobutyricum*.” *Ann Microbiol (Paris)* 128A:267–276. (In French.)
- Bourgeois CM, Le Parc O, Abgrall B, Cleret J-J. 1984. Membrane filtration of milk for counting spores of *Clostridium tyrobutyricum*. *J Dairy Sci* 67:2493–2499. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81605-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81605-7).
- Bergère J-L, Hayes H, Commissaire J. 1986. Major protein components in the cell envelope of *Clostridium tyrobutyricum*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 137:271–282. [https://doi.org/10.1016/S0769-2609\(86\)80117-X](https://doi.org/10.1016/S0769-2609(86)80117-X).
- Bergère J-L, Vassal L, Pittel M, Cathelin M. 1978. Bactéries lactiques susceptibles d’inhiber la croissance de *Clostridium tyrobutyricum* en culture et dans le fromage. *Lait* 58:215–233. <https://doi.org/10.1051/lait:1978575-57613>.
- Mathot AG, Bellard E, Thuault D. 2003. *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. *J Dairy Sci* 86:3068–3074. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73906-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73906-X).
- Thuault D, Bellard E, Le Guern J, Bourgeois C-M. 1991. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 74:1145–1150. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78266-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78266-0).
- Abgrall B, Bourgeois C, Bourva F. 1985. Dénombrement des spores de *Clostridium tyrobutyricum* par filtration sur membrane et culture sur milieu gélosé. *Lait* 65:45–53. <https://doi.org/10.1051/lait:1985647-6484>.
- Le Bourhis A-G, Doré J, Carlier J-P, Chamba J-F, Popoff M-R, Tholozan J-L. 2007. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *Int J Food Microbiol* 113:154–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.027>.
- Bergère J-L. 1985. Mise en évidence de deux groupes sérologiques principaux chez *Clostridium tyrobutyricum*. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 136:75–91. [https://doi.org/10.1016/S0769-2609\(85\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0769-2609(85)80008-9).
- Brown J, Pirrung M, McCue LA. 2017. FQC Dashboard: Integrates FastQC results into a Web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics* 33:3137–3139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx373>.
- Schmieder R, Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27:863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>.
- Bankovich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Bateman A, Haft DH. 2002. HMM-based databases in InterPro. *Brief Bioinform* 3:236–245. <https://doi.org/10.1093/bib/3.3.236>.
- The UniProt Consortium. 2019. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47:D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>.
- Prakash A, Jeffries M, Bateman A, Finn RD. 2017. The HMMER Web server for protein sequence similarity search. *Curr Protoc Bioinformatics* 60:3.15.1–3.15.23. <https://doi.org/10.1002/cpbl.40>.
- Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. 2017. Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-Map. *Mol Biol Evol* 34:2115–2122. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx148>.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2012. GenBank. *Nucleic Acids Res* 41:D36–D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>.

III. Études bio-informatiques et flux métaboliques

A. Sporulation

Comme expliqué précédemment, il y a très peu d'informations et d'études sur le mécanisme de sporulation propre à *C. tyrobutyricum*. Cependant, il existe un schéma général de sporulation chez le genre *Clostridium* regroupant différents facteurs principaux de régulation communs à l'ensemble des espèces. Ainsi, nous avons ciblé ces facteurs comme marqueurs moléculaires. Pour s'assurer que l'espèce étudiée réponde aux mêmes similarités qu'avec ce schéma, les séquences génomiques des différents facteurs sigmas (A, H, F, E, G et K) et de Spo0A de *C. acetobutylicum* ou *C. botulinum* ont été recherchées dans la base de données du NCBI (National center for Biotechnology Information). Une fois obtenues, elles ont été comparées par Blastn avec le génome de *C. tyrobutyricum* KCTC 5387. Les résultats sont regroupés ci-dessous dans le Tableau 35.

Tableau 35 : Blastn entre les séquences nucléiques sigmas et spo0A retrouvées chez *C. acetobutylicum* ATCC 824 ou *C. botulinum* ATCC 3502 et le génome de *C. tyrobutyricum*.

Sigma	Gène	Taille (pb)	Comparaison	Query cover sur KCTC (%)
σ^A	<i>sigA</i>	1136	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	93
σ^H	<i>sigH</i>	572	<i>C. botulinum</i> ATCC 3502	99
σ^F	<i>sigF</i>	758	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	96
σ^E	<i>sigE</i>	707	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	99
σ^G	<i>sigG</i>	773	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	99
σ^K	<i>sigK</i>	694	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	93
Spo0A	<i>spo0A</i>	845	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	99

L'ensemble des séquences de ces facteurs, comparé au génome de *C. tyrobutyricum*, montre une similarité variant de 93% à 99%. Ces résultats permettent de fortement suggérer la présence de ces facteurs chez l'espèce étudiée.

Concernant les histidines kinases orphelines, seules celles de *C. acetobutylicum* sont clairement étudiées et détaillées dans la littérature. Les séquences génomiques codant pour ces kinases sont répertoriées dans la base de données du NCBI. Ainsi, des comparaisons entre ces séquences et

le génome du *C. tyrobutyricum* ont été réalisées. Cependant, les résultats obtenus, 43% de query cover, ne permettent pas d'identifier des séquences similaires chez *C. tyrobutyricum*.

Dès lors, le mécanisme de sporulation chez *C. tyrobutyricum* respecterait celui des *Clostridia* en général avec l'intervention des différents facteurs impliqués. Cinquante autres comparaisons Blastn ont été effectuées avec *C. acetobutylicum* ATCC 824, espèce dont le mécanisme de sporulation est le plus renseigné, dans le but d'apporter plus de précisions sur le mécanisme de sporulation chez *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237. L'ensemble des résultats sont regroupés dans l'annexe 5. Par contre, le déclenchement de ce mécanisme par des histidines kinases orphelines reste à approfondir.

B. Germination

Afin de déterminer à quel schéma de germination utilisé par *C. tyrobutyricum* correspondrait le mieux, il a été décidé de partir de l'étude des différentes couches composant une spore et de déterminer couche par couche quelles sont les protéines principales et suffisamment discriminantes pour répondre à cette interrogation. Au total, quarante-huit protéines ou gènes retrouvés dans les différentes couches d'une spore ont été identifiés dans la littérature et comparés avec le génome de *C. tyrobutyricum*.

Au final, les protéines ou gènes retenus, dont les séquences génétiques ou protéiques sont connues et répertoriées dans la base de données NCBI, se trouvent principalement dans la membrane interne et le cortex de la spore. Plus précisément, il s'agit des récepteurs de germination ainsi que des enzymes lysant le cortex et leurs gènes régulateurs.

Pour les récepteurs de germination, les Ger-types sont retrouvés chez les espèces bactériennes répondant aux schémas de germination de *Bacillus subtilis* et *C. perfringens* alors que les Csp-type répondent au schéma retrouvé chez *C. difficile*. Les enzymes de lyse de cortex, chez *B. subtilis*, CwlJ et SleB sont retrouvées ainsi que leurs gènes régulateurs GerQ et YepB/HtrC, respectivement. En ce qui concerne *C. perfringens* et *C. difficile*, seul SleC permet la dégradation grossière du cortex dont les produits sont, par la suite, pris en charge par SleM qui transforme les peptides résiduels en acides aminés durant la germination. Ainsi, nous avons comparé ces séquences protéiques avec le génome de *C. tyrobutyricum* (Tableau 36 : Résultats des Blastn/p avec *C. tyrobutyricum*. CLEs : Enzyme lysant le cortex ; KCTC5387 : Génome souche type de *C. tyrobutyricum* ; IM : membrane interne.

Tableau 36 : Résultats des Blastn/p avec *C. tyrobutyricum*. CLEs : Enzyme lysant le cortex ; KCTC5387 : Génome souche type de *C. tyrobutyricum* ; IM : membrane interne.

Localisation	Protéines	Locus tag	Fonction	Espèces	Résultats	
					Query cover	Nom protéine chez <i>C. tyrobutyricum</i>
Cortex	YpeB	BSU_22920	sporulation protein YpeB (inhibiteur de SleB)	<i>B. subtilis strain 168</i>	98%	Germination protein YpeB
	SleB	BSU_22930	spore cortex-lytic enzyme	<i>B. subtilis strain 168</i>	57%	spore cortex lytic enzyme
	CwIJ	BSU_02600	spore cortex-lytic enzyme localisée sur la surface externe du cortex de la spore	<i>B. subtilis strain 168</i>	86%	cell wall hydrolase
	SleC	KNZ77_RS03050	spore cortex-lytic protein	<i>C. difficile CD630</i>	-	Aucune séquence similaire
Membrane interne	GerAA	BSU_33050	gerAA spore germination protein A1	<i>B. subtilis strain 168</i>	86%	Spore germination protein B1
	GerAB	BSU_33060	gerAB spore germination protein A2	<i>B. subtilis strain 168</i>	83%	Ger(x)C family spore germination protein
	GerAC	BSU_33070	gerAC spore germination protein A3	<i>B. subtilis strain 168</i>	93%	Ger(x)C family spore germination protein
	GerBA	BSU_35800	gerBA spore germination protein B1	<i>B. subtilis strain 168</i>	99%	spore germination protein
	GerBB	BSU_35810	gerBB spore germination protein B2	<i>B. subtilis strain 168</i>	86%	spore germination protein
	GerBC	BSU_35820	gerBC spore germination protein B3	<i>B. subtilis strain 168</i>	97%	spore germination protein
	CspC	CD630DERM_22460	Subtilisin-like serine germination related protease	<i>C. difficile CD630</i>	-	Aucune séquence similaire

Pour les récepteurs de germination, les comparaisons des séquences ont montré une forte similarité pour le Ger-type ce qui n'est pas le cas pour les Csp-type. Ces premiers résultats permettent d'éliminer le schéma caractéristique de la germination chez *C. difficile*.

Pour les enzymes de lyse du cortex et leurs régulateurs, des similarités importantes ont été retrouvées entre les séquences chez *Bacillus* et le génome de *C. tyrobutyricum*. Pour les enzymes intervenant chez *C. perfringens*, les « query cover » sont trop faibles pour supposer leur présence dans le génome de la bactérie étudiée. Ainsi, les résultats des différentes comparaisons de séquences suggèrent que le mécanisme de germination de *C. tyrobutyricum* se rapprocherait de celui identifié chez *Bacillus subtilis*.

C. Métabolisme de la fermentation butyrique à partir du glucose

Le métabolisme de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* n'est pas encore clair dans la littérature. L'objectif étant de bien connaître le schéma du métabolisme central chez *C. tyrobutyricum* afin d'étudier l'impact du E_h sur l'orientation des flux métaboliques, des études bio-informatiques ont été réalisées. Cette démarche avait pour but de confirmer le schéma métabolique proposé par Lee et al. (2016) sur la souche type avec notre souche CIRM BIA 2237, et de venir apporter des réponses possibles sur le fonctionnement de cette voie métabolique avec différentes sources carbonées. Les données actuelles pouvant être contradictoires, nous sommes partis sur la base des données métaboliques de la fermentation butyrique du site KEGG sur *C. tyrobutyricum* (Figure 47).

CoA-transférase qui permettrait d'obtenir du butyrate à partir du butyryl-CoA. La réaction de cette enzyme est la suivante : butyryl-CoA + Acétate → Acétyl-CoA + Butyrate. Afin d'assurer de sa présence, un Blastn a été réalisé à partir de la séquence nucléique codant pour cette enzyme chez *C. beijerinckii* NCIMB 14988 et du génome de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237. Le « query cover » obtenu est de 99% ce qui suggère que *C. tyrobutyricum* utilise bien ce mécanisme pour la production du butyrate.

Selon le schéma de Yu et al. (2011), les productions de CO₂ et de H₂ s'effectuent pendant le passage du pyruvate vers l'acétyl-CoA par une pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase couplée par une ferrédoxine : NAD oxydoréductase et d'une hydrogénase pour la production de NADH₂ et d'H₂ (Figure 48).

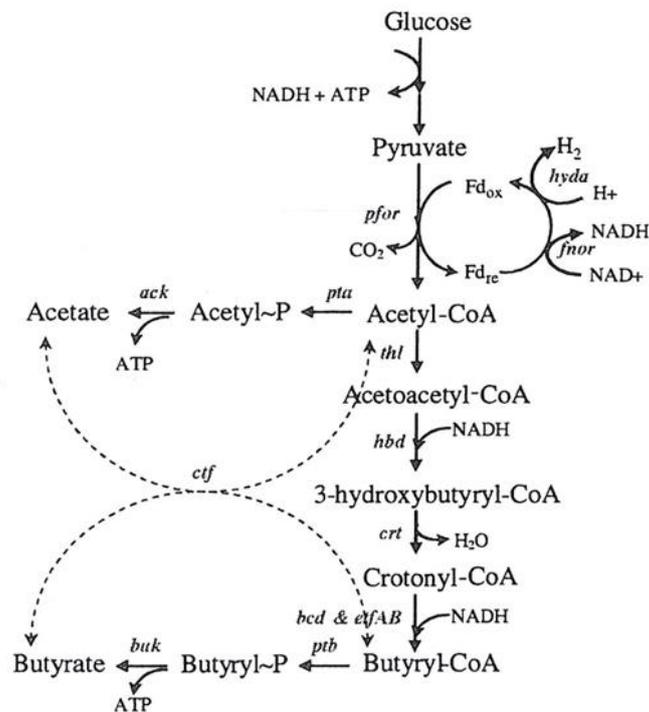


Figure 48 : Représentation de la fermentation butyrique (Yu et al., 2011). Pfor : pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase ; hyda : hydrogénase ; pta : phospho-transacétylase ; ack : acétate kinase ; ctf : CoA-transférase ; thl : acétyl-CoA acétyltransférase.

La comparaison par Blastn de séquences confirme la présence de la pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase et de l'hydrogénase mais pas de la ferrédoxine : NAD oxydoréductase. Pourtant, une publication de Petitdemange et al. (1976) met en évidence une activité d'une enzyme de ce type. Afin d'apporter une solution, Wang et al. (2010) montrent l'existence d'un complexe chez *C. kluyveri* pouvant avoir une activité similaire à une ferrédoxine : NAD

oxydoréductase, appelé RnfABCDEG. Il s'agirait d'un complexe composé de six gènes, rnfA, rnfB, rnfC, rnfD, rnfE, rnfG, qui codent pour un transporteur d'électrons (Figure 49).

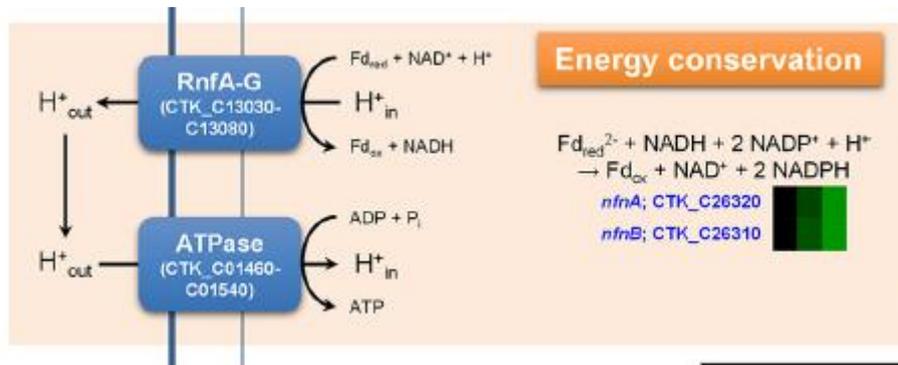


Figure 49 : Schéma montrant la présence d'un complexe RnF et d'une l'ATPase (Lee et al., 2016).

De plus, dans cette même étude, ces derniers trouvent aussi la présence de ce complexe, qui plus est, couplé par une F₁F₀ ATP synthétase permettant les équations suivantes : $Fd_{red2-} + NAD^+ + H^+ \rightarrow Fd_{ox} + NADH_2 + H^+$ et $ADP + Pi + H^+ \rightarrow ATP + H_2O$.

Après une recherche dans le génome de *C. tyrobutyricum* dans NCBI, les six gènes codant pour ce complexe ont été retrouvés (Figure 50).

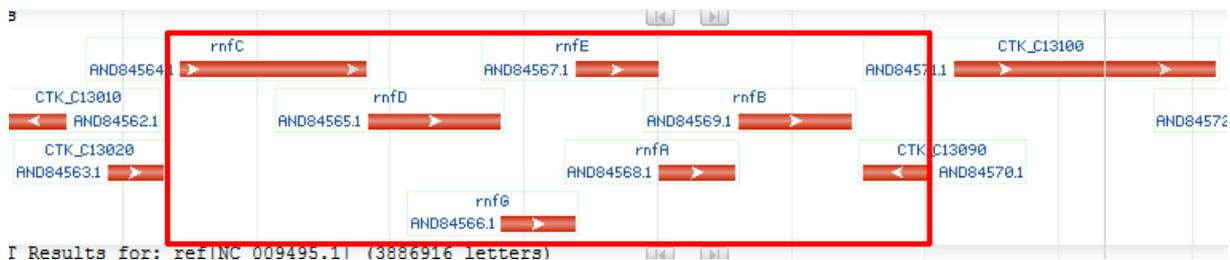


Figure 50 : Le complexe Rnf chez *C. tyrobutyricum* KCTC 5387.

Ainsi, le schéma de la fermentation butyrique sur glucose, retrouvé chez *C. tyrobutyricum* serait le suivant :

NfnAB, bien expliqués chez *C. kluyveri*, seraient les éléments manquants pour comprendre le fonctionnement du métabolisme de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum*.

Ainsi, pour le passage du crotonyl-CoA au butyryl-CoA, un mécanisme identique a été découvert chez *C. kluyveri*, impliquant le complexe cytoplasmique composé d'une butyryl-CoA déshydrogénase (bcd) couplée aux protéines EtfA/B, des flavoprotéines permettant la réaction suivante : $2 \text{ NADH}_2 + \text{Crotonyl-CoA} + 2 \text{ Fd}_{\text{ox}} \rightarrow 2 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ Fd}_{\text{red}}$. Le modèle ressemblerait à celui de la Figure 52.

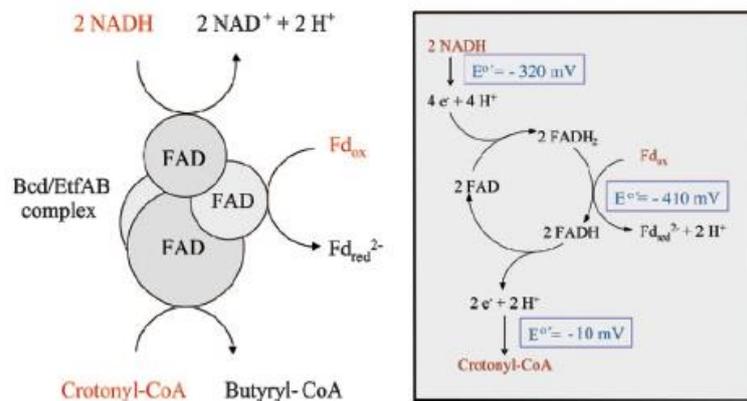


Figure 52 : Modèle hypothétique de la bifurcation d'électrons du complexe butyryl-CoA déshydrogénase/ EtfAB chez *C. kluyveri* (Li et al., 2008).

Il se compose des gènes *bcd*, *etfB* et *etfA* et dont la configuration dans le génome débute par la déshydrogénase et se termine par la flavoprotéine EtfA chez *C. kluyveri*. Des Blastn ont été réalisés sur le génome de *C. tyrobutyricum* et sa configuration a été étudiée. Il se trouve, à nouveau, que le génome de cette dernière comporte ces gènes ainsi qu'une configuration identique, laissant donc fortement supposer que la bactérie emploie le même mécanisme pour obtenir du butyryl-CoA (Figure 53).



Figure 53 : Différents gènes impliqués dans le complexe BCD/EtfAB chez *C. tyrobutyricum* KCTC5387. Bcd1 : butyryl-CoA DH, EtfB1 : Electron transport flavoprotein B, EtfA1 : Electron transport flavoprotein B.

Il a également été observé chez *C. kluyveri* que ce complexe faisait partie d'un cluster regroupant les gènes codant pour les enzymes intervenant dans la fermentation butyrique, ainsi qu'une séquence codante promotrice Rex en amont (Figure 54).

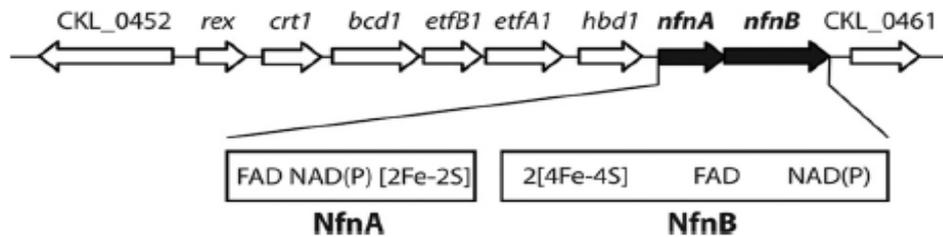


Figure 54 : Région génomique chez *C. kluyveri* regroupant le cluster de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la fermentation butyrique (Wang et al., 2010).

Cette séquence promotrice est connue pour jouer un rôle clé comme régulateur transcriptionnel dans certains métabolismes en réponse au ratio $\text{NADH}_2/\text{NAD}^+$ présent dans la cellule.

De plus, d'après Wang et al. (2010), il existe chez *C. kluyveri* deux séquences nucléotidiques codant pour la 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase ; la première qui serait NADH dépendant et la seconde NADPH dépendant. Cette première est transcrite lorsque le ratio NADH/NAD^+ est supérieur à 1. Dans le cas contraire, il s'agit de la seconde qui est transcrite en même temps que le complexe formé par les flavoprotéines NfnA/B. Ce complexe permet la réaction suivante $2 \text{NADP}^+ + \text{NADH} + 2 \text{Fd}_{\text{red}}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2 \text{NADPH} + \text{NAD}^+ + 2 \text{Fd}_{\text{ox}}$ et permet d'alimenter la déshydrogénase NADPH dépendante. Ci-dessous une représentation schématique du complexe NfnA et NfnB (Figure 55).

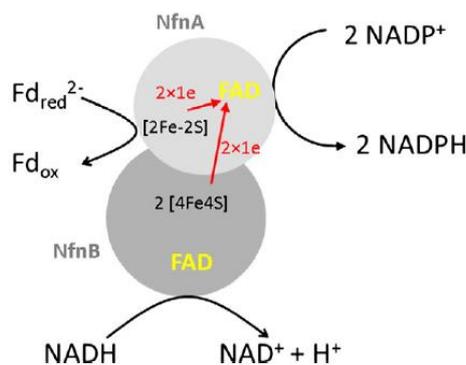


Figure 55 : Modèle hypothétique de la bifurcation d'électrons du complexe NfnA et B retrouvé chez *C. kluyveri* (Buckel & Thauer, 2013).

Chez *C. tyrobutyricum*, le cluster de la fermentation butyrique, régi par le facteur transcriptionnel *rex*, est retrouvé d'une manière identique chez *C. kluyveri*. De plus, les résultats de Blastn, comparant le complexe NfnA/B et les séquences NADPH et NADH dépendantes codant pour la 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase avec le génome de *C. tyrobutyricum*, sont respectivement 100% pour le complexe, 94% et 100% de « query cover » pour les déshydrogénases. Ces résultats permettent donc de suggérer que *C. tyrobutyricum* utilise le même mécanisme à cette étape de la fermentation butyrique (Figure 56).

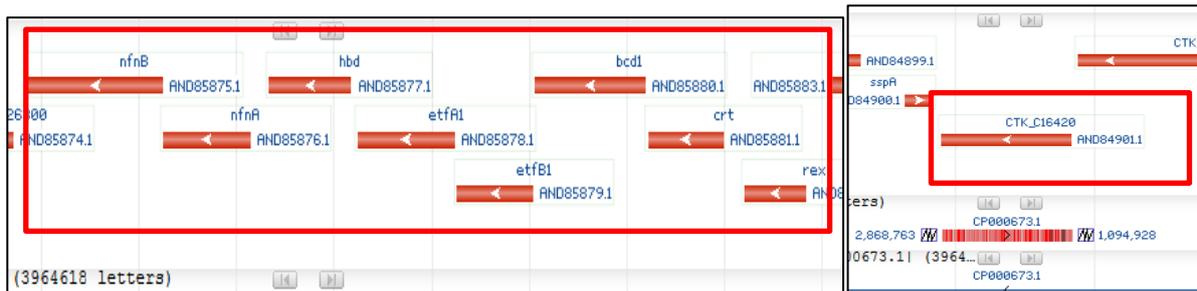


Figure 56 : Région génomique chez *C. tyrobutyricum* KCTC 5387 retrouvant le cluster de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la fermentation butyrique. crt : crotonase ; hdb : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase NADPH dépendante ; bcd1 : butyryl-CoA déshydrogénase ; CTK_C16420 : 3-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase NADH dépendante.

Au final, ces recherches ont permis de générer des éléments de réponses sur le mécanisme de la fermentation butyrique retrouvée chez *C. tyrobutyricum* (Figure 57).

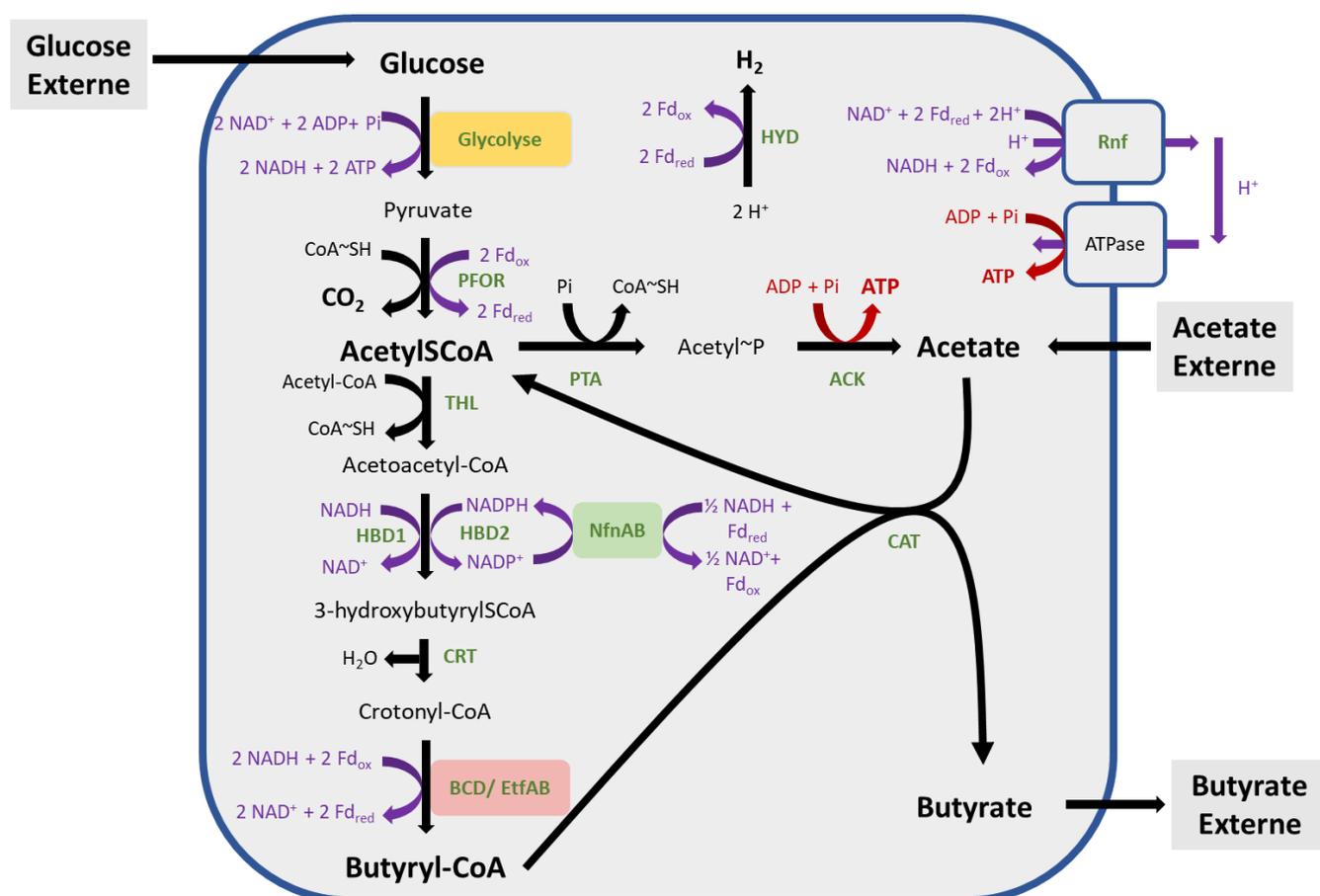


Figure 57 : Schéma proposé pour la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* à partir des résultats d'analyse bio-informatique. Pfor : pyruvate : ferrédoxine oxydoréductase ; hyd : hydrogénase ; pta : phospho-transacétylase ; ack : acétate kinase ; cat : CoA-transférase ; thl : acétyl-CoA acétyltransférase ; HBD1 : NADH dépendant 3-hydrobutyryl-CoA déshydrogénase ; HBD2 : NADPH dépendant 3-hydrobutyryl-CoA déshydrogénase ; NfnAB : complexe NfnAB ; crt : crotonase ; bcd /etfAB: butyryl-CoA déshydrogénase avec le complexe EtfAB ; Rnf : complexe Rnf.

Afin de s'assurer que l'ensemble des comparaisons bio-informatiques réalisées à partir du génome de la souche type *C. tyrobutyricum* sur NCBI se retrouve bien dans celui de la souche *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237, nous avons réalisé plusieurs comparaisons de contrôle entre les deux génomes pour éviter toutes exceptions génétiques liées à un phénomène de souche dépendance. L'ensemble des résultats est résumé dans le Tableau 37.

Tableau 37 : Résultats des comparaisons bio-informatiques entre *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 et la souche type *C. tyrobutyricum* KCTC 5387.

	<i>C. tyrobutyricum</i> Cirm bia 2237			Bio-informatique Blastn				
	Locus tag NCBI	Fonction	Cluster	Espèce comparaison	Gène	Nom	Fonction	Query cover (%)
Gènes								
Rex	EZN00_RS10780	Modulates transcription in response to change	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85882	rex	redox-sensing transcriptional repressor	100
Crt	EZN00_RS10785	Enoyl-CoA hydratase	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85881	crt	3-hydroxybutyryl-CoA déhydratase (crotonase)	100
bcd1	EZN00_RS10790	acyl-Coa dehydrogenase	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85880	bcd1	butyryl-CoA dehydrogenase	100
etfB1	EZN00_RS10795	Electron transfer flavoprotein	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85879	etfB1	electron transfer flavoprotein subunit beta	100
etfA1	EZN00_RS10800	Electron transfer flavoprotein	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85878	etfA1	electron transfer flavoprotein subunit alpha	100
hbd2	EZN00_RS10805	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85877	hbd	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	100
nfnA	EZN00_RS10810	oxidoreductase FAD NAD(P)-binding domain	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85876	nfnA	ferredoxin-NADP(+) redctase subunit alpha	100
nfnB	EZN00_RS10815	glutamate synthase	rex	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND85875	nfnB	ferredoxin-NADP(+) redctase subunit beta	100
hbd1	EZN00_RS10820	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	-	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84901	CTK_C164	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	100
lutR	EZN00_RS08600	transcriptional regulator	-	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84835	CTK_C157	FadR family transcriptional regulator	100
lct permease	EZN00_RS08605	L-lactate	lactate	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84834	lctP	L-lactate permease	100
racemase	EZN00_RS08610	Domain of unknown function (DUF2088)	lactate	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84833	CTK_C157	hypothetical protein	100
etfB3	EZN00_RS08615	Electron transfer flavoprotein	lactate	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84832	etfB3	electron transfer flavoprotein beta subunit	100
etfA3	EZN00_RS08620	Electron transfer flavoprotein	lactate	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84831	etfA3	electron transfer flavoprotein alpha subunit	99
lct DH	EZN00_RS08625	FAD linked oxidase domain protein	lactate	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84830	CTK_C157	FAD/FMN-containing dehydrogenase	100
rnfC	EZN00_RS06360	Electron transport complex	Rnf	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84564	rnfC	electron transport complex protein RnfC	100
rnfD	EZN00_RS06365	Electron transport complex	Rnf	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84565	rnfD	electron transport complex protein RnfD	100
rnfG	EZN00_RS06370	Electron transport complex	Rnf	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84566	rnfG	electron transport complex protein RnfG	100
rnfE	EZN00_RS06375	Electron transport complex	Rnf	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84567	rnfE	electron transport complex protein RnfE	100
rnfA	EZN00_RS06380	Electron transport complex	Rnf	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84568	rnfA	electron transport complex protein RnfA	100
rnfB	EZN00_RS06385	electron transport complex, RnfABCDGE type	Rnf	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84569	rnfB	electron transport complex protein RnfA	100
CoA transferase	EZN00_RS10095	CoA transférse	-	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND84920	pct1	acetate CoA-transférse Ydif	100
CoA transferase	EZN00_RS14205	CoA transférse	-	<i>C. tyrobutyricum</i> KCTC5387	AND86048	pct2	acetate CoA-transférse Ydif	100
Buk	-	-	-	<i>C. acetobutyrium</i> ATCC 824	CA_RS158	buk	butyrate kinase	2%
Ptb	-	-	-	<i>C. acetobutyrium</i> ATCC 824	CA_RS158	ptb	Phosphate butyryltransferase	No significant similarity

Avec ces analyses bio-informatiques de contrôle, nous pouvons affirmer que l'ensemble des observations et conclusions faites à partir du génome de la souche type, peut également être appliqué chez la souche *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237.

IV. Identification du mécanisme impliqué dans l'oxydation du lactate et validation avec une approche de flux métaboliques

Pour identifier le mécanisme de l'oxydation du lactate, une recherche bio-informatique basée sur l'ensemble des complexes EtfAB présents dans le génome de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 a été réalisée. Les résultats ont permis d'identifier un cluster de gènes homologues à celui de *A. woodii* impliqué dans l'oxydation du lactate impliquant un complexe EtfAB lié à une lactate déshydrogénase. De ce constat, nous avons proposé un nouveau schéma métabolique combinant les recherches bio-informatiques sur la voie de la fermentation butyrique tout en ajoutant le mécanisme de l'oxydation du lactate. Puis, une matrice de flux métaboliques a été construite à partir de ce schéma et une analyse de flux réalisée à partir de données obtenues à partir d'une fermentation continue de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237. Les recouvrements carbone, les équilibres des cofacteurs et le rendement ATP, nous ont permis de valider ce schéma métabolique et d'apporter davantage de compréhension sur l'activité métabolique de *C. tyrobutyricum* avec le lactate et l'acétate comme sources de carbones. Le détail des démarches et des résultats est expliqué ci-dessous, sous forme de publication.

Title page

Bioinformatics and Metabolic flux analysis highlight a new mechanism involved in lactate oxidation in *Clostridium tyrobutyricum*

Edouard Munier^{1,2}, Hélène Licandro¹, Eric Beuvier², Rémy Cachon^{1*}

(1) Univ. Bourgogne Franche-Comté, L'Institut Agro Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France

(2) INRAE, URTAL, F-39800 Poligny, France

(*) Corresponding author, email: remy.cachon@agrosupdijon.fr.

Abstract

Climate change and environmental issues compel us to find alternatives to the production of molecules of interest from petrochemistry. This study aims at understanding the production of butyrate, hydrogen and CO₂ from the oxidation of lactate with acetate in *Clostridium tyrobutyricum* and thus proposes an alternative carbon source to glucose. This specie is known to produce more butyrate than the other butyrate-producing *Clostridium* species due to a lack of solvent genesis phase. The recent discoveries on flavin-based electron bifurcation mechanism as a mode of energy conservation lead us to suggest a new metabolic scheme for the formation of butyrate from lactate-acetate co-metabolism.

While searching for genes encoding for EtfAB complexes and neighboring genes in the genome of *C. tyrobutyricum*, we identified a cluster of genes involved in butyrate formation and another cluster involved in lactate oxidation homologous to *Acetobacterium woodii*. A phylogenetic approach encompassing other butyrate-producing and/or lactate-oxidizing species based on EtfAB complexes confirmed these results. A metabolic scheme on the production of butyrate, hydrogens and CO₂ from the lactate-acetate co-metabolism in *C. tyrobutyricum* has been constructed, and then confirmed with data of steady-state continuous culture. This *in silico* metabolic carbon flux analysis model showed the coherence of the scheme from the carbon recovery, the cofactor ratio and the ATP yield.

This study improves our understanding of the lactate oxidation metabolic pathways, the role of acetate and intracellular redox balance, and opens new perspectives for the production of molecules of interest as butyrate and hydrogen with *C. tyrobutyricum*.

Keywords:

Phylogenetic analysis, Flavin-Based Electron Bifurcation, metabolic pathway, continuous culture, *Clostridium tyrobutyricum*, redox balance

Background

Many saccharolytic species of the genus *Clostridium* are known to produce CO₂, butyric acid and H₂ as the main metabolic end products of butyric acid fermentation during the acidogenesis phase (S. Y. Lee et al., 2008). Butyric acid fermentation attracted great R&D interest over the past decades, as it offers an alternative for the production of (i) butyric acid, a platform molecule widely used in food, cosmetic, and oil industries, mainly produced through petrochemical means, (ii) hydrogen, a potential environmentally friendly energy carrier for the substitution of fossil fuels, mainly produced from water electrolysis (Bao et al., 2020; Cai et al., 2010; Dwidar et al., 2012; Zeng & Zhang, 2010).

Clostridium tyrobutyricum produces higher amounts of butyric acid and hydrogen as the main fermentation products from carbohydrates than other species like *Clostridium acetobutylicum* or *Clostridium butyricum* (Cummins & Johnson, 1971; Jang et al., 2013, 2014). A reason that explains why this bacteria has been extensively explored by metabolic engineering and in fermentation is its potential to produce butyric acid and hydrogen from sugars and lignocellulosic biomass hydrolysates containing glucose and xylose (Du et al., 2015; Fu et al., 2017; Jiang et al., 2013; Jo et al., 2010; X. Liu et al., 2006; Michel-Savin et al., 1990; Suo et al., 2019; Suo, Fu, et al., 2018; Suo, Ren, et al., 2018; L. Yu et al., 2015; Zhu & Yang, 2004). *Clostridium tyrobutyricum* is also known as the main contaminant engendering late blowing defect in semi-hard and hard cheeses in dairy industry because of its ability to metabolize lactate in presence of acetate (D’Incecco, Pellegrino, et al., 2018; Klijn et al., 1995).

In an industrial perspective, the use of lactate could be an attractive alternative to the use of carbohydrate. Especially since it has been shown that co-metabolism with acetate could stimulate butyrate and bio-hydrogen productions (Matsumoto & Nishimura, 2007). Among species usable in industry, *Clostridium* species belonging to butyric group seem to be the best candidates; in particular *C. tyrobutyricum* because of its sole acidogenesis phase. Hence, lactate-acetate co-metabolism in *C. tyrobutyricum* needs to be clarified.

First suggestion of lactate oxidation mechanism was proposed in *C. acetobutylicum*. Lactate oxidation to pyruvate would be catalyzed with iNAD⁺ lactate dehydrogenase but the genes involved have not yet been identified (Cheng et al., 2013). The discovery of Flavin-Based Electron Bifurcation (FBEB) complexes has improved our understanding of energy conservation mechanisms in strict anaerobic bacteria and Archea (Buckel & Thauer, 2018; Thauer et al., 2008; Wang et al., 2010). This conservation of energy results in a net exergonic reaction with minimal negative free energy change involving electron transfer between exergonic and endergonic reactions. The FBEBs complexes are divided into 4 distinct families, including that of the Electron transfer flavoproteins (Etf) complex. This complex is composed of two subunits encoded by the *etfA* and *etfB* genes. It was first described in *C. kluyveri* (Bcd/etfAB) in which its genes are clustered with a butyrylCoA dehydrogenase gene (Li et al., 2008). This key reaction in the production of butyrate involves the exergonic reduction of crotonyl-CoA to butyrylCoA with NADH and the endergonic reduction of ferredoxins with NADH, the equation (Eq.1) of which is as follows:



The genes encoding BCD/EtfAB are clustered with those of HBD (3-hydroxybutyrylCoA dehydrogenase) also found in other *Clostridium* genomes (Bennett & Rudolph, 1995; J. Lee et al., 2016). It is common to find genes coding for Etf complex in the same genetic locus as a CoA dehydrogenase gene in *Bacteria* genomes. This is the case for *Acetobacterium woodii* with a lactate dehydrogenase (LDH) gene. This LDH/EtfAB complex explains the biochemical reaction of the lactate oxidation (Weghoff et al., 2015). It involves the exergonic reaction of the ferredoxin oxidation reduced with NAD⁺ coupled with the endergonic reaction of the lactate reduction to pyruvate with NAD⁺ giving the following equation (Eq.2):



This FBEB complex leads to the decrease of ΔG° of the oxidation of lactate from +25 to +6 kJ mol⁻¹ making the reaction energetically more favorable. The genes encoding the LDH/EtfAB complex are grouped with those encoding a lactate permease, a lactate racemase and a transcriptional regulator forming a lactate oxidation operon. Orthologous operons have been identified in other Firmicutes species, some of which belong to the *Clostridium* genus such as *C. botulinum* and *C. ljundhallii*. From phylogenetic and structural analyses of different EtfA and EtfB subunits belonging to the domain of Bacteria and Archea, five Etf groups (G1-G5) have been distinguished. The G2 group is mostly represented by the Firmicutes and divided into two sub-groups. The G2A subgroup includes the Etf complexes involved in butyrate synthesis and the G2B subgroup involves those in the lactate oxidation (Garcia Costas et al., 2017).

The aim of this study was to investigate lactate-acetate co-metabolism in *C. tyrobutyricum* using LDH/EtfAB complex. Because *C. tyrobutyricum* is phylogenetically close to *C. ljundhallii*, a comparison with *A. woodii* and *C. kluyveri* could provide answers to the metabolic mechanisms of lactate oxidation involved. The investigation was made in three complementary steps: (i) an *in silico* analysis of putative lactate oxidation clusters; (ii) a phylogenetic analysis; (iii) a Metabolic Flux Analysis (MFA) including intracellular redox balance and carbon recovery, with data gathered from a steady-state continuous culture of *C. tyrobutyricum* using lactate and acetate as carbon-substrates.

Methods

Bacteria and medium

Clostridium tyrobutyricum CIRM BIA 2237 was obtained from National Institute of Agronomic Research and Environment collection. The strain was stored at -80°C in cryotubes.

For pre-culture, 1 colony of *C. tyrobutyricum* on RCM (Reinforced Clostridial Medium, Biokar, France) Petri dishes was used to inoculate 100 mL of RCM modified (glucose was replaced by sodium lactate) medium at 37 °C until obtaining OD_{600nm}: 1.4~1.8 measured by a spectrometer (PRIM, Secomam, France). A medium with 14 g.L⁻¹ sodium lactate (Sigma-Aldrich, France), yeast extract 3 g.L⁻¹ (VWR, France) and 10 g.L⁻¹ meat extract (VWR, France), 3 g.L⁻¹ sodium acetate (Rectapur, France), 5 g.L⁻¹ NaCl (Chem-LAB, Belgium), 0.05 g.L⁻¹ cysteine hydrochloride (Sigma-Aldrich, France) was used in pre-culture and continuous culture studies. Media for pre-culture were autoclaved at 120 °C for 15 minutes, and filter sterilized (0.2 µm) for continuous cultures (Millipore, Merck, France).

Continuous culture set up for butyrate fermentation:

Continuous culture was carried out in a 1 L bioreactor with 750 mL working volume (New Brunswick, Scientific, discovery 100, USA). The bioreactor was autoclaved with distilled water at 120°C for 15 minutes. After cooling, water was replaced by filter sterilized medium with lactate and acetate. The culture was controlled at a temperature of 37 °C, and a pH of 5.8. The stirring rate was controlled at 150 rpm, which was high enough to keep homogenous medium without leading to significant foaming. Oxidoreduction potential (E_h) was measured with redox probe (Pt4805- DPAS- SC- K8S, Mettler Toledo, France). The initial batch culture was started with 700 mL of medium inoculated with 50 mL pre-culture, and switched to the continuous culture at the end of the growth phase. During fermentation, nitrogen was sparged into the headspace of bioreactor at a flowrate of 10 mL.min⁻¹ to maintain the anaerobic state of the bioreactor. The flow rate of the feed medium was controlled by a peristaltic pump (MINIPULS 3, Gilson, France). The total volume of 750 mL was maintained using a balance (Lynx, Mettler Toledo, France) coupled with the Monitoring Reactor Unit (MRU) (New Brunswick, USA).

Analytical methods

Short-chain fatty acids were analyzed by HPLC with ion exclusion (HPLC system, Diomex (Thermo Fischer)—Photodiode Array Detector Ultimate 3000 DAD, and 300×7.8 mm Aminex HPX-87H column with guard column). HPLC conditions for determination of organic acids were: column temperature of 30 °C; flow rate, 0.6 mL.min⁻¹; injected volume, 20 µL; mobile phase, 9 mM sulfuric acid in water.

Identification of a predicted EtfA/B and neighboring genes involved in lactate oxidation from *Clostridium tyrobutyricum* CIRM BIA 2237

Protein sequences researches from of predicted Etf genes were performed on *Clostridium tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 (NCBI RefSeq: NZ_CP038158.1). The *etfA* (locus_tag: AWO_RS04415) and *etfB* (AWO_RS0441) genes of *Acetobacterium woodii* DSM 1030 (NC_016894) [20] were used as queries. Searches, data analyses and visualizations were performed with NCBI blast. The *etf* sequences from *C. ljungdahlii* DSM 13528 were also used as queries.

Phylogenetic analysis of Etf complex proteins from the selected bacterial species

EtfA and EtfB protein sequences were searched in the genome sequence of the following species: *Acetobacterium woodii* DSM1030 (RefSeq: NC_016894), *Clostridium kluyveri* DSM555 (RefSeq: NC_009706.1), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (RefSeq: NC_003030.1), *Clostridium butyricum* KNU-L09 (RefSeq: NZ_CP013252.1), *Clostridium beijerenckii* DSM791 (RefSeq: NZ_CP073653.1), *Clostridium tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 (RefSeq: NZ_CP038158.1) and *Eubacterium limosum* (RefSeq: NZ_CP019962.1).

A custom EtfA and EtfB protein database of the above listed species was prepared using NCBI database, by searching all Electron transfer Flavoprotein A or B genes from the genome sequences. For EtfA: A.woodii_DSM-1030_EtfA (AWO_RS04415), A.woodii_DSM-1030_EtfA (AWO_RS08105), C.butyricum_KNU-L09_EtfA (ATN24_08885), C.butyricum_KNU-L09_EtfA (ATN24_03030), C.butyricum_KNU-L09_EtfA (ATN24_03165), C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfA (EZN00_RS08620), C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfA (EZN00_RS10800), C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfA (EZN00_RS10865), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfA (CKR_RS02265), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfA (CKR_RS16650), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS01655), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS01720), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS10410), C.beijerenckii_DSM-791_EtfA (KEC93_RS14700), C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfA (CA_RS13965), E.limosum_ATCC-8486_EtfA (B2M23_RS01165), E.limosum_ATCC-8486_EtfA (B2M23_RS12010), E.limosum_ATCC-8486_EtfA (B2M23_RS16675), C. ljungdahlii _DSM-13528_EtfA (CLJU_RS10595). For EtfB: A.woodii_DSM-1030_EtfB (AWO_RS04410), A.woodii_DSM-1030_EtfB (AWO_RS08100), C.butyricum_KNU-L09_EtfB (ATN24_08880), C.butyricum_KNU-L09_EtfB (ATN24_03025), C.butyricum_KNU-L09_EtfB (ATN24_03160), C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfB (EZN00_RS08615), C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfB (EZN00_RS10795), C.tyrobutyricum_CIRMBIA-

2237_EtfB (EZN00_RS10860), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfB (CKR_RS02260), C.kluyveri_NBRC-12016_EtfB (CKR_RS16645), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_RS01650), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_RS01715), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_RS10405), C.beijerenckii_DSM-791_EtfB (KEC93_14705), C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfB (CA_RS13035), C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfB (CA_RS13970), E.limosum_ATCC-8486_EtfB (B2M23_RS01170), E.limosum_ATCC-8486_EtfB (B2M23_RS12005), E.limosum_ATCC-8486_EtfB (B2M23_RS16670), C.ljungdahlii_DSM-13528_EtfB (CLJU_RS10600).

The selected EtfA and EtfB proteins sequences forming an Etf complex in each genome were compiled by addition of both sequences giving Etf complex protein sequences. The Etf complex proteins were named according to the neighboring genes with which they were found and listed below : A.woodii_DSM-1030_EtfAB_GlcD_LctP, A.woodii_DSM-1030_EtfAB_Acyl-CoA, C.butyricum_KNU-L09_EtfAB_GlcD_LctP, C.butyricum_KNU-L09_EtfAB_GlcD, C.butyricum_KNU-L09_EtfAB_Hbd, C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfAB_GlcD_LctP, C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfAB_Hbd, C.tyrobutyricum_CIRMBIA-2237_EtfAB_GlcD, C.kluyveri_NBRC-12016_EtfAB_Hbd, C.kluyveri_NBRC-12016_EtfAB_GlcD, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_GlcD, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_Hbd, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_Acyl-CoA, C.beijerenckii_DSM-791_EtfAB_GlcD_LctP, C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfAB_GlcD, C.acetobutylicum_ATCC-824_EtfAB_Hbd, E.limosum_ATCC-8486_EtfAB_Acyl-CoA, E.limosum_ATCC-8486_EtfAB_GlcD, E.limosum_ATCC-8486_EtfAB_GlcD_LctP, C.ljungdahlii_DSM-13528_EtfAB_GlcD_LctP.

Etf complexes were subjected to phylogenetic analysis: Protein sets were aligned using ClustalW with default parameters (Cost matrix: ID, Gap open cost: 8, Gap extend cost: 0.1). A phylogenetic tree was built using Tree Builder with the following parameters: Genetic Distance Model: Jukes-Cantor [31], Tree build Method: UPGMA [32], Resampling Method: bootstrap, Number of replicates: 1000, Support Threshold: 30% by using Geneious v2022.0.2 software.

In silico model construction and metabolic flux

The anaerobic lactate oxidation metabolic network for *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 strain was developed for Metabolic Flux Analysis (MFA) from the identification of EtfAB complex in *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 and phylogenetic analysis steps and completed with pathway information collected from other studies reported in the literature and KEGG database

(Kanehisa et al., 2017; J. Lee et al., 2016). The metabolic network of *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 was constructed with 11 reactions and 7 intracellular metabolites. The lactate and acetate uptakes and the production of butyrate, which were measured during steady-state phase of continuous culture, were used as constraints in MFA. The steady-state phase was identified from the stability of the cell density determined by OD_{600nm} method with a stable lactate and acetate consumption values and redox potential value (E_h). The model construction and the *in silico* analysis were carried out using a previous method (Orth et al., 2010; Tsai & Lee, 1988) and applied on <https://smart-biotech.online/research/mfa/Clostridium.tyrobutyricum.lactate>. From the metabolic steady state for intracellular metabolites, the metabolic fluxes (v) are constrained by the stoichiometry matrix (S) giving the following equation:

$$(Eq. 3) S\mathbf{v} = \mathbf{0}$$

Metabolic carbon fluxes were calculated with measured rates (r) of: lactate and acetate consumption, butyrate production, estimating CO₂ production rate from lactate-acetate metabolic scheme (Fig. 1), and lactate consumption rate, giving the matrix system in Eq. 4, where x_i are intracellular flow rates.

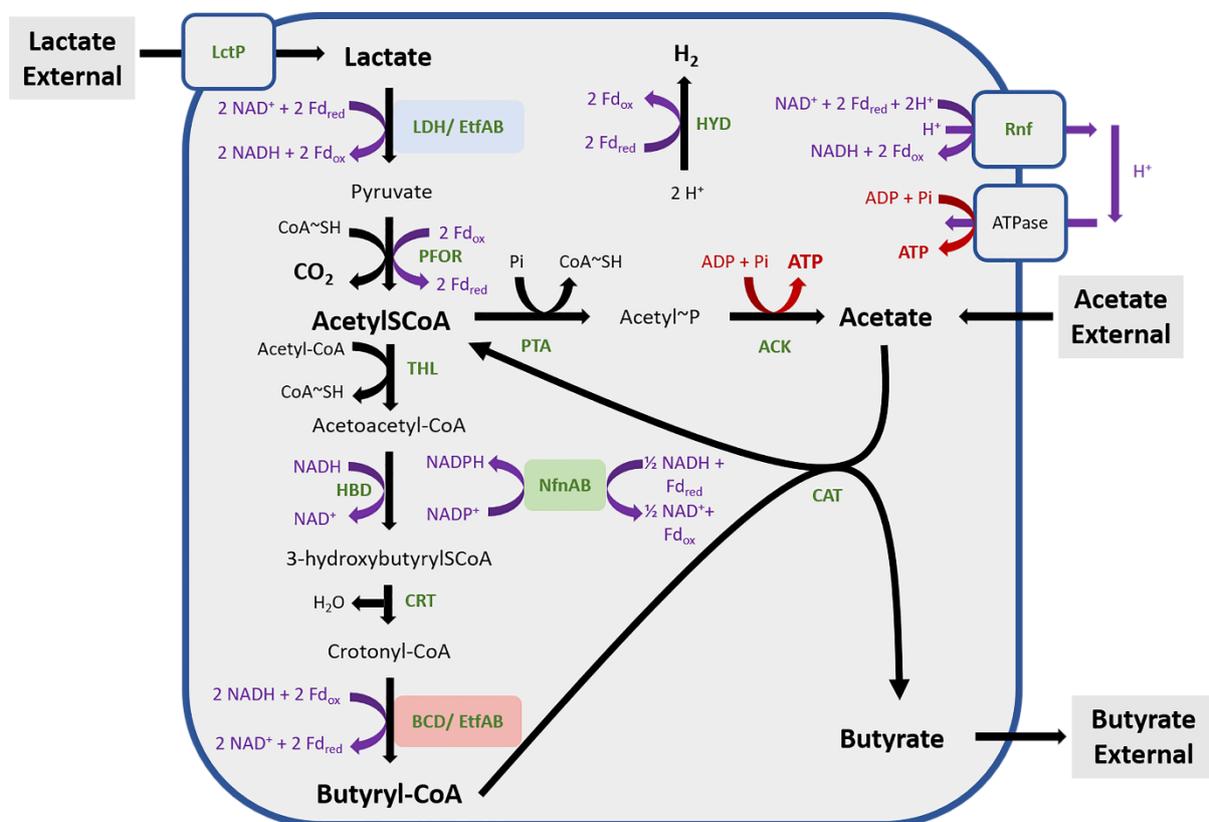


Fig. 1 Proposed scheme for the metabolic pathways involving lactate and acetate conversion in *C. tyrobutyricum*

LctP: Lactate permease; LDH: Lactate dehydrogenase; PFOR: Pyruvate ferredoxine: oxidoreductase; PTA: Phosphotransacetylase; ACK: Acetate kinase; THL: Thiolase; HBD: 3-hydroxybutyrylCoA dehydrogenase; CRT: Crotonase; BCD: ButyrylCoA dehydrogenase; CAT: CoA-Transferase; HYD: Hydrogenase.

Considering the steady-state continuous culture, the intracellular flow rates of AcetylCoA and ButyrylCoA are assumed as equal 0.

$$(Eq. 4) \begin{pmatrix} r_{lactate} \\ r_{CO2} \\ r_{acetylCoA} \\ r_{acetate} \\ r_{butyrylCoA} \\ r_{butyrate} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 \\ 1/3 & 0 & 0 & 0 \\ 2/3 & -1 & -1 & 1/3 \\ 0 & 1 & 0 & -1/3 \\ 0 & 0 & 1 & -2/3 \\ 0 & 0 & 0 & 2/3 \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} x1 \\ x2 \\ x3 \\ x4 \end{pmatrix}$$

An important application of MFA includes determining ATP yields and parameters of redox homeostasis (cofactor redox balances and metabolites redox balance, the both being involved in cellular redox balance).

ATP yield (Y_{ATP} , g.mol⁻¹) is the ratio of biomass (g DW.L⁻¹) produced from ATP (mol.L⁻¹) produced. For cofactors recovery, NADH ratio (Eq. 5) and Fd ratio (Eq. 6) were calculated separately and compiled together giving the Eq. 7, all these ratios were calculated on the basis of intracellular flux:

$$(Eq. 5) \frac{\sum NAD+}{\sum NADH} \times 100$$

$$(Eq. 6) \frac{\sum Fd_{ox}}{\sum Fd_{red}} \times 100$$

$$(Eq. 7) \frac{\sum Fd_{ox} + \sum NAD+}{\sum Fd_{red} + \sum NADH} \times 100$$

The redox balance was calculated from the oxidation state of substrates and products (lactate, 0; acetate, 0; carbon dioxide, +2; hydrogen, -1; and butyrate, -2) (Riondet et al., 2000). The sum of oxidation state of products should equal the sum of oxidation state of substrates; considering that the sum of oxidation state of substrates equals 0, the following equation was used for redox balance (Eq.8):

$$\text{(Eq. 8)} \frac{\sum r_{\text{product}} \times \text{product oxidation state}}{r_{\text{substrates}}}$$

Dividing by $r_{\text{substrates}}$ allows to compare conditions with different substrates flow rates.

Results and discussion:

Identification of genes involved in lactate oxidation

The discovery of complex FBEBs has led to a better understanding of the metabolic function of strict anaerobes and archaea (Buckel & Thauer, 2018) and to understand some metabolic activities like the ability to metabolize lactate with acetate or butyrate synthesis from some *Clostridium* species (Detman et al., 2019; Li et al., 2008).

We studied the genome of *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 to establish the presence of EtfAB complexes. *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 has been isolated from silage and has already been used as a lactate oxidizer in different works (Roux & Bergere, 1977). Its complete genome has been fully sequenced and annotated (Munier et al., 2019). Analysis of the chromosome (NZ_CP038158.1) of *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 identified three clusters of genes coding for EtfAB complexes (Fig. 2).

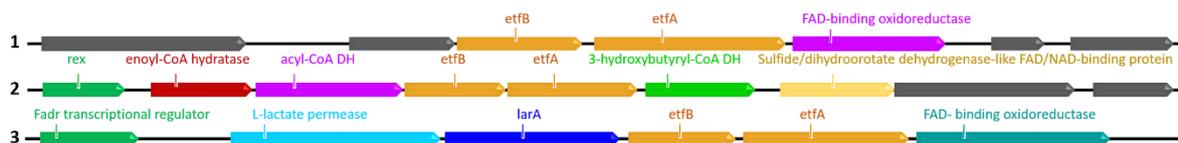


Fig. 2 Chromosome fragments (NZ_CP038158.1) of *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 containing EtfBA and FAD-binding oxidoreductase genes

EtfB (1: EZN00_RS10860, 2: EZN00_RS10795, 3: EZN00_RS08615), EtfA (1: EZN00_RS10865, 2: EZN00_RS10800, 3: EZN00_RS08620), FAD-binding oxidoreductase (1:: EZN00_RS10870; 3: EZN00_RS08625).

In fragment 1, the genes encoding the EtfAB complex are next to a FAD-binding oxidoreductase. The EtfAB complex involved in fragment 2 is in a cluster of genes involving an enoyl-CoA hydratase (also identified as a crotonase), an acyl-CoA dehydrogenase, a 3-hydroxybutyrylCoA dehydrogenase and a FAD/NAD-binding protein. The predicted acyl coA dehydrogenase protein present 100% identity with the as butyrylCoA dehydrogenase of *C.*

tyrobutyricum KCTC 5387 and can thus be identified as a butyrylCoA dehydrogenase. Thus, the cluster of genes identified in fragment 2 is most likely involved in the production of butyrylCoA characteristic of butyrate-producing *Clostridium*.

In fragment 3, the EtfAB complex is included between the genes coding for a transcriptional regulator, a L-lactate permease, a lactate racemase and a FAD-binding oxidoreductase. This gene cluster was also found in *Clostridium ljungdahlii* DSM 13528, a species phylogenetically close to *C. tyrobutyricum* [2], [3].

The protein sequences found in the lactate oxidation cluster present at least 38% of identity and 95% of «query cover» between *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237, *C. ljungdahlii* DSM 13528 and *A. woodii* DSM 1030 (Fig. 3).

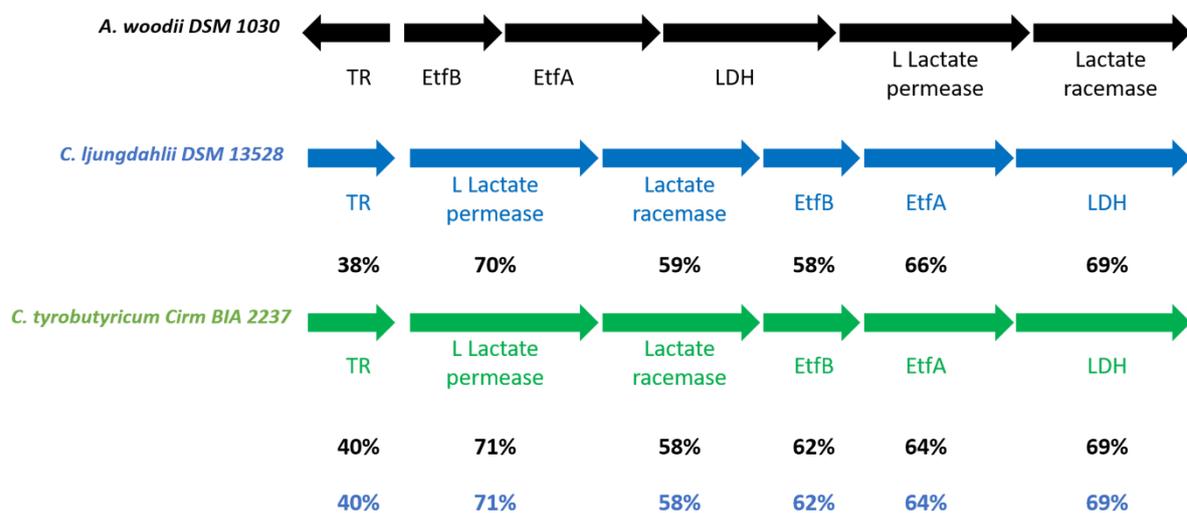


Fig. 3 Putative lactate oxidation cluster of *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237. Its identity percentage compared with those from *C. ljungdahlii* DSM 13528 et *A. woodii* DSM 1030

TR: Transcriptional regulator (EZN00_RS08600, CLJU_RS10615, AWO_RS0440); L-Lactate permease (EZN00_RS08605, CLJU_RS10610, AWO_RS04425); Lactate racemase (EZN00_RS08610, CLJU_RS10605, AWO_RS04430); EtfB (EZN00_RS08615, CLJU_RS10600, AWO_RS04410); EtfA (EZN00_RS08620, CLJU_RS10595, AWO_RS04415); LDH: Lactate dehydrogenase (EZN00_RS08625, CLJU_RS10590, AWO_RS04420).

As already observed in other studies, the latter is related to the EtfAB complexes associated with an Acyl-CoA dehydrogenase gene (Detman et al., 2019). Concerning EtfAB complexes associated with a gene coding for a GlcD or GlcD/LctP, two distinct additional groups are observable. The first forms a cluster involving the EtfAB complex associated with GlcD/LctP in *A. woodii* and *C. tyrobutyricum* with 100% bootstrap support, and the second group together with the EtfAB GlcD_LctP complexes of *C. butyricum* KNU-L09 and *C. beijerenckii* DSM 791 as well as that associated with GlcD in *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237.

Our results are in agreement with those of Garcia Costas et al. and Detman et al. [30][34]. The two G2 subgroups of EtfAB are found in this phylogenetics analysis. EtfAB protein sequences encoded by *etfA* and *etfB* associated with *hbd* or acyl-CoA DH belonging to subgroup G2A are involved in butyrate production. Those with the gene encoding for GlcD and/or LldP_GlcD including *A. woodii* formed subgroup G2B involved in lactate oxidation. The results of this phylogenetic analysis are in agreement with those obtained with the comparisons of the protein sequences with *A. woodii* and *C. ljungdahlii*.

Metabolic scheme with enzyme machinery of lactate and acetate transformation to butyrate

Considering the previous results about the butyric acid fermentation scheme in *C. tyrobutyricum*, the KEGG metabolic pathway database (Kanehisa et al., 2017; J. Lee et al., 2016) and knowledge of flavin-based electron bifurcation (Buckel & Thauer, 2018) and regulation of energy conversion mechanisms, an update of the metabolic scheme involving the oxidation of lactate in *C. tyrobutyricum* could be proposed (Fig. 1).

We constructed a model of central carbon metabolism in *C. tyrobutyricum* involving the conversion of lactate to pyruvate via a stable cytoplasmic complex formed of LDH with electron transferring flavoprotein (EtfAB) using flavin-based electron confurcation to lead endergonic lactate oxidation with NAD^+ as oxidant at the expense of exergonic electron flow from reduced ferredoxin to NAD^+ . The other metabolisms are homologous to those found in all butyrate-producing *Clostridium* species except for the last stage involving the conversion of butyrylCoA into butyrate.

Briefly, pyruvate is converted to acetylCoA by a pyruvate ferredoxin: oxidoreductase (PFOR) with the release of one molecule of CO_2 and reduced ferredoxin. The AcetylCoA pool may

enter into the acetate production branch or the butyrate production branch. Regarding acetate, a phosphotransacetylase (PTA) and an acetate kinase (ACK) with ATP production are involved.

For butyrate pathway, several reactions are involved allowing the conversion of two molecules of acetylCoA into butyrylCoA and the production of one molecule of H₂O via an acetylCoA acetyltransferase also called thiolase (THL), a 3-hydroxybutyrylCoA dehydrogenase (HBD), a crotonase (CRT), a butyrylCoA dehydrogenase (BCD) coupled with an electron transfer flavoprotein complex (EtfAB). The genes coding for these enzymes form a cluster known for the production of butyrate. This cluster is preceded by a redox-sensing transcriptional repressor gene (Rex) in response to the cellular NADH/NAD⁺ ratio (Hu et al., 2016). BCD coupled with EtfAB catalyzes the endergonic reduction of ferredoxin with NADH coupled with the exergonic reduction of crotonyl-CoA with NADH.

The synthesis of butyrate from butyrylCoA is carried out via a CoA-transferase involving re-assimilation of acetate and production of one mole of acetylCoA. As mentioned above, the conversion of butyrylCoA into butyrate is done only via a CoA-transferase (CAT) whereas other *Clostridium* species also have the possibility of producing butyrate via the genes encoding for phosphotransbutyrylase and butyrate kinase. The ATP required for biomass synthesis is generated mainly by ACK.

Two energy conservation mechanisms could be involved in the central metabolism of *C. tyrobutyricum*: the Rnf and NfnAB complex. The Rnf complex allows regenerating NADH and creating a proton gradient using reduced ferredoxin. This proton gradient can be used by F₀F₁ ATPase to produce ATP. Characterized for the first time in *C. kluyveri*, the genes coding for NfnAB are located in the butyrate production cluster. This complex generates two NADPH by the oxidation of an NADH and two reduced ferredoxins (Wang et al., 2010).

***In silico* model construction and verification**

To support the results obtained from the bioinformatics analyses, MFA model was build. The metabolic flux network of *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 was constructed from the scheme in Fig. 1 without including Rnf complex and NfnAB because previous work has shown that the genes coding for these complexes are poorly expressed during butyric fermentation (J. Lee et al., 2016). Thus, a first MFA with only Etf's complexes and hydrogenases was carried out. Lactate and acetate utilization and production of butyrate, three of the main substrates and products of fermentation, were followed during continuous culture (Table 1). These data were

used as constraints in the stoichiometric matrix (Eq. 4). Batch data from literature were also used as constraints in the MFA model as second verification (Bryant & Burkey, 1956). Carbon recovery and butyrate/acetate flux ratio were used as criteria to evaluate the agreement between stoichiometric matrix and experiments.

Table 1 Results of continuous culture and batch fermentation in media with Lactate and Acetate as carbons sources.

Condition or activity	Continuous culture (this study)	Batch culture (Bryant & Burkey, 1956)
Acetate consumed (mol.mol ⁻¹ Lactate)	0.30	0.37
Butyrate produced (mol.mol ⁻¹ Lactate)	0.65	0.63
CO ₂ produced (mol.mol ⁻¹ Lactate) ^a	1.00	0.97
Carbon recovery (%)	100	92
B/A ratio (mol.mol ⁻¹) ^b	2.17	1.7
Y _{ATP} (g DW.mol ⁻¹ ATP)	8.82	-

^aCO₂ produced in continuous culture was determined from the amount of lactate consumed, according to Fig. 1.

^bRatio of butyrate produced/acetate consumed.

As can be seen in Table 1, data from fermentations with two different strains and culture processes lead to similar acetate/lactate, butyrate/lactate, and CO₂/lactate ratios and consequently a butyrate/acetate ratio around 2, and a carbon recovery around 100%. Consequently, the following general equation of lactate-acetate co-metabolism in *C. tyrobutyricum* could be proposed:



MFA model allows to quantify intracellular metabolic fluxes (all expressed in % mM~C) (Fig. 5); starting from 83 mM~C of lactate and 17 mM~C of acetate external for a total of 100 mM~C, carbon flux distribution from lactate is majorly flowed until acetylCoA (55 mM~C) node with a production of CO₂ (28 mM~C). Flux from acetylCoA node bifurcated into acetic acid formation (19 mM~C) and butyric acid synthesis (72 mM~C) via butyrylCoA node. The assimilation of 17 mM~C of external acetate with the 19 mM~C of acetate formed justifies the 72 mM~C of the butyrate branch.

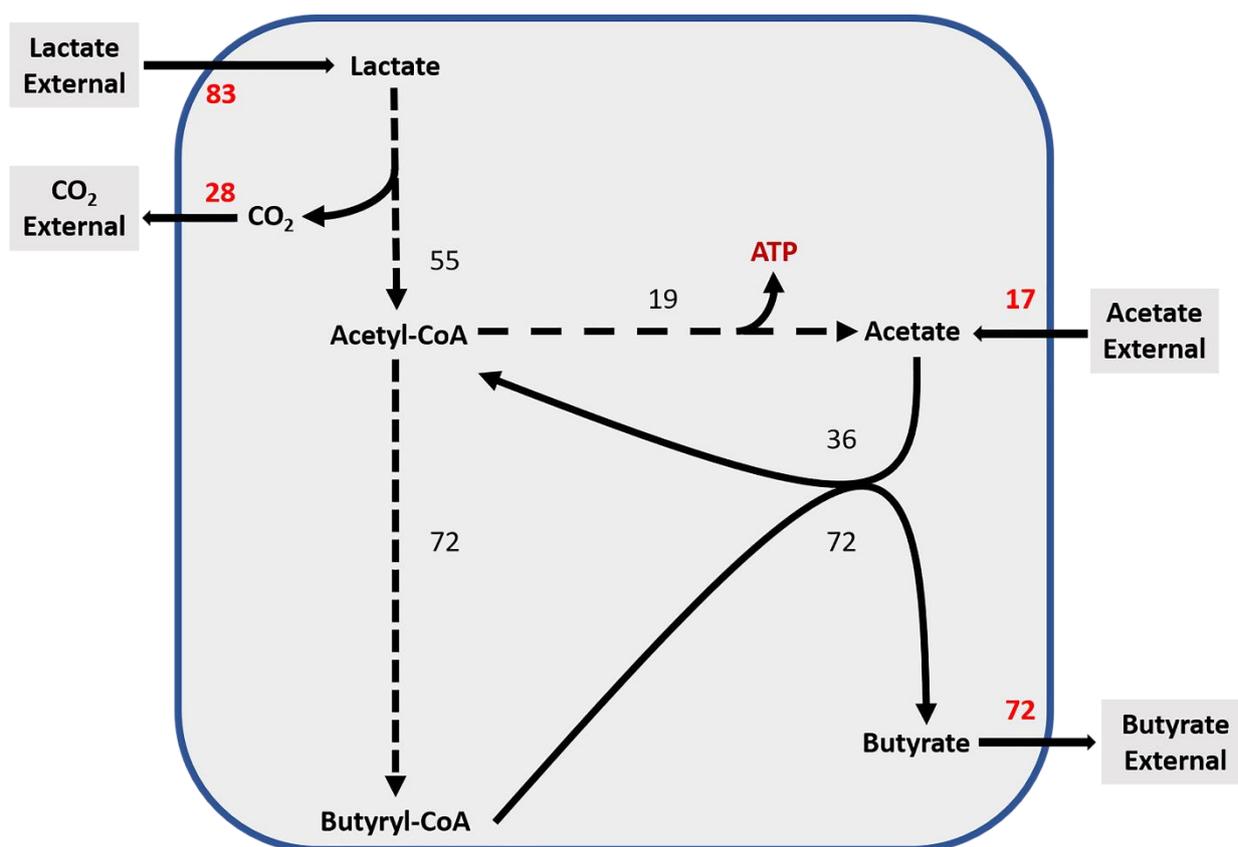


Fig. 5: Scheme of the metabolic flux distribution involving lactate and acetate conversion by *C. tyrobutyricum*

Using a MFA model with 100 mM C of substrates (83 mM~C from lactate and 17 mM~C from acetate). All values are expressed in % of total carbon. Hatched arrows represent multiple metabolic reactions.

Thus, butyrate production is possible by addition of external acetate carbons and re-assimilation of acetate carbons formed in metabolic pathways, respectively.

Fig. 5 is in agreement with equation 9; the sum of carbon fluxes giving acetylCoA at the origin of butyrate (72 mM~C) production respected a ratio of 3 coming from lactate (55 mM~C) and 1 from acetate (17 mM~C). Two acetylCoA are required for the production of one butyrylCoA. To confirm the consistency of these observations with a necessary recovery of both CoA~SH and NADH, a statement from this stoichiometric balance was performed from intracellular metabolic rates calculated by MFA (Table 2), the following routes were considered according to Fig. 1:

- For NAD/NADH ratio (Eq. 5 and 7): Ldh/EtfAB, Hbd and Bcd/EtfAB routes;

- For Fdox/Fdred ratio (Eq. 6 and 7): Ldh/EtfAB, Pfor, Bcd/EtfAB and Hyd routes;

A NADH ratio of 98% is obtained. However, without Hyd route, a 61% recovery could be calculated for ferredoxin ratio and causing an excess of 2.34 mM.h⁻¹ of reduced ferredoxin. This result can be explained because of the absence of the hydrogen produced value from the hydrogenase during fermentation (Fig. 1).

By respecting the reaction stoichiometry involving hydrogenase, 1.14 mM.h⁻¹ of hydrogen would be generated considering the results obtained with the calculation of intracellular fluxes (Table 2). In order to confirm this result, a second approach was carried out using oxidation state balance (Eq. 8). Considering intracellular fluxes, 0.03 of oxidation state balance was obtained instead of 0.53 without hydrogen value. The first value is closer to the neutrality, meaning that hydrogen production should be necessary to maintain redox homeostasis. Moreover, Hyd route improved the ferredoxin ratio to 100% and cofactors recovery to 99 % (Table 2). These results are close to full balance; it suggests a low expression of genes coding for the Rnf and NfnAB complexes on consumption of lactate and acetate. Moreover, with the agreement of these MFA results and intracellular redox ratio, the involving of LDH/EtfAB in lactate oxidation mechanism from *C. tyrobutyricum* would be metabolically possible.

Table 2 Results of NADH, Ferredoxin and intracellular redox ratios and Oxidation state balance without and with hydrogen.

Ratio and balance	<i>C. tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237	
	Without hydrogen	With hydrogen
NADH ratio, Eq. 5 (%)	98	98
Ferredoxin ratio, Eq. 6 (%)	61	100
Cofactors recovery, Eq. 7 (%)	75	99
Oxidation state balance, Eq. 8	0.53	0.03

Concerning ATP synthesis, an ATP yield at 0,35 mol.mol⁻¹ of substrates was calculated, this result is similar to those obtained with propionate fermentation from *C. homopropionicum* and *V. parvula* from lactate uptake (Seeliger et al., 2002). Moreover, 8.8 g DW. mol⁻¹ ATP yield is in agreement with 9 g DW. mol⁻¹ATP estimated from *C. kluyveri* with ethanol and acetate as substrates and similar or higher from *C. butyricum* (10,1 g DW. mol⁻¹ATP) and *E. coli* (7,9 g

DW. mol⁻¹ATP) with glucose as substrate, respectively further confirming our suggestion (Crabbendam et al., 1985; Riondet et al., 2000; Thauer et al., 1968).

Conclusion

Based on genes and proteins sequences databases and phylogenetics approach, the identification of Etf complex in the genome of *C. tyrobutyricum* compared with other species allowed us to propose a metabolic pathway of lactate oxidation with acetate by *C. tyrobutyricum*. Steady state continuous culture data combined with MFA have confirmed our assumptions about lactate oxidation mechanism from *C. tyrobutyricum*. In addition, the analysis of the flow balance with the ATP balance and the oxidation state balance allowed to confirm our updated proposal. Moreover, these results with a lactate/acetate ratio of 3:1 provide an explanation how acetate is used as co-substrate for the production of 2 butyrate molecules. The understanding of this metabolism could allow the development of new strategies against this bacterium known to be involved in late blowing defect in cheese or even exploit lactate and acetate as new resources to produce hydrogen or butyrate as molecules of interest.

List of abbreviations

Etf: electron transfer flavoprotein; FAD: flavin adenine dinucleotide; GlcD: domain of FAD-dependent lactate dehydrogenase, FAD/FMN-containing dehydrogenase; HPLC: high performance liquid chromatography; LDH: lactate dehydrogenase; LldP: lactate permease; OD: optical density; R&D: research and development; iNAD⁺ lactate dehydrogenase: Independent NAD⁺ lactate dehydrogenase; FBEB: Flavin-Based Electron Bifurcation; Etf: Electron transfer flavoprotein; Bcd: butyrylCoA dehydrogenase; HBD: 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; MFA: Metabolic Flux Analysis; RCM: Reinforced Clostridial Medium; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; DH: dehydrogenase; THL: thiolase; PTA: phosphotransacetylase; CRT: Crotonase; ACK: acetate kinase; PFOR: Pyruvate ferredoxin:oxidoreductase; Rnf: ferredoxin:NAD réductase; NfnAB: NADH-dependent ferredoxin:NADP reductase; Hyd: hydrogenase; DW: Dry weight.

Declarations:

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request and on the following website, <https://smart-biotech.online/research/mfa/Clostridium.tyrobotyricum.lactate>

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contributions

EM, RC, HL and EB planned the work, conceived and designed the experiments. EM performed the experiments and genome searching and phylogenetic analyses. EB performed analyses of short chain fatty acids. EM, RC, EB and HL analyzed the results. EM wrote the paper and EB, RC and HL revised it. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche Comté, the “Fonds Européen de Développement Régional (FEDER)” and we would like to thank Floriane Revardeau from INRAE – URTAL, Poligny, France for her help for short chain fatty acids analysis.

Author's information

¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, Institut Agro Dijon, PAM UMR A 02.102, Food Innovation and Biotechnology team, 1 esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France. ²URTAL, INRAE, Rue de Versailles BP 20089, 39801 Poligny Cedex 1, France.

V. Effet du pH et d'un potentiel redox réducteur sur la germination et/ou sur l'orientation des flux métaboliques chez *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237

Les résultats obtenus lors de la fabrication fromagère n'apportant pas d'information précise sur l'impact d'un E_h négatif et du pH sur la germination des spores de *C. tyrobutyricum*, nous avons réalisé une nouvelle expérience en utilisant des gaz afin d'obtenir des valeurs initiales de E_h plus ou moins réductrices et des valeurs de pH correspondant à celle du lait soit 6,6 et celle en fin de cinétique d'acidification au cours d'une fabrication type Emmental, soit 5,3 donnant les résultats du Tableau 37.

Tableau 38 : Impact du E_h sur la germination de *C. tyrobutyricum*. C_i : concentration initiale en spores ; E_{h7} : Valeur E_{h7} initiale ; pH_i : pH initial ; t_{lat} : temps de latence avant germination. Test ANOVA n=3, $\alpha=0,05$, comparaison tukey lecture par colonne.

Conditions	C_i spores (UFC.mL ⁻¹)	E_{h7} (mV)	pH _i	t_{Lat} (h)
N₂H₂_5,3	2,28 ± 0,39 .10 ⁶ ^a	-176 ± 4 ^b	5,31 ± 0,04 ^b	28 ± 0,47 ^b
N₂_5,3	2,45 ± 0,09 .10 ⁶ ^a	-106 ± 3 ^a	5,35 ± 0,01 ^b	26 ± 0,13 ^c
N₂_6,6	2,05 ± 0,39 .10 ⁶ ^a	-128 ± 23 ^a	6,65 ± 0,01 ^a	13 ± 1,46 ^d
N₂H₂_6,6	2,18 ± 0,3 .10 ⁶ ^a	-176 ± 3 ^b	6,67 ± 0,03 ^a	41 1,06 ^a

Nous pouvons déjà constater que les paramètres initiaux de réduction et d'acidification en fonction des différents conditionnements ainsi que les concentrations en spores sont identiques entre eux. Ce que nous observons également, c'est un clair impact des différents conditionnements sur le temps de latence t_{lat} correspondant au temps nécessaire avant une chute du potentiel redox dû aux spores de *Clostridium*. Dans le cas avec un pH de 6,6, les résultats montrent une augmentation significative du temps de latence entre les deux valeurs de E_{h7} avec une différence d'environ 17 heures. Tandis qu'au pH 5,3, cet effet serait atténué avec une différence uniquement de 2 heures entre les temps de latence. Afin de mieux exploiter et de comprendre, lequel de nos facteurs a le plus d'impact ou s'il s'agit d'une synergie, nous avons soumis ces données à une analyse par plan factoriel donnant l'équation suivante :

$$Y = 27 + 7,5a + 0b + 6,5ab$$

Où (a) représente l'effet de E_h , (b) l'effet du pH et (ab) l'effet combiné du E_h et du pH, donnant la surface en réponse suivante :

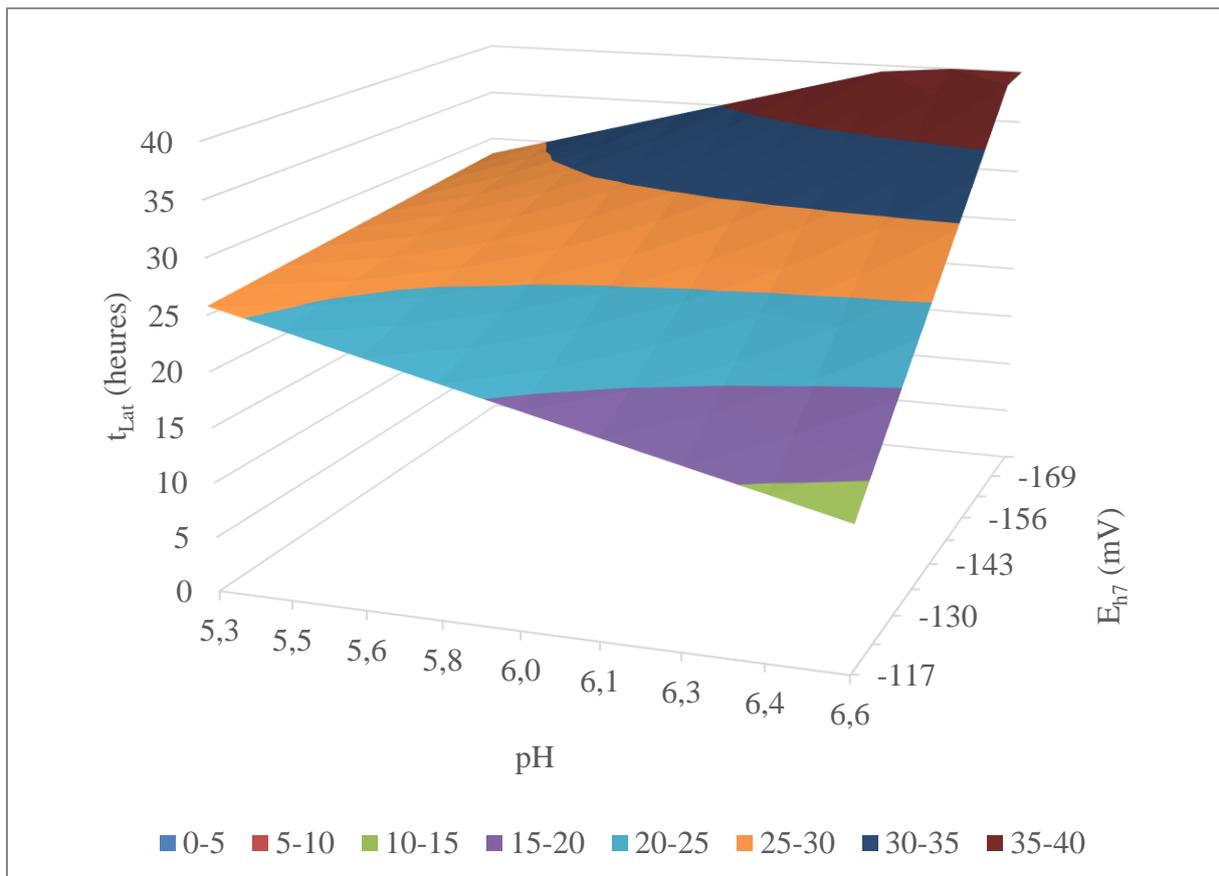


Figure 58 : Surface de réponse de l'impact du E_{h7} et pH sur le temps de latence avant germination des spores de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237.

Ainsi, d'après l'ensemble de ces résultats et analyses, nous pouvons déduire qu'il y a bien un effet d'une réduction du E_h , pouvant être plus au moins important en fonction du pH du milieu, sur le temps de latence avant une réduction du milieu par *C. tyrobutyricum*. En effet, les coefficients de l'équation du plan factoriel montrent bien un impact du E_h sur le temps de latence avant germination avec un coefficient de 7,5 et de 6,5 en combinaison avec le facteur pH tandis que ce dernier ne présente aucun effet seul. Ainsi, nous pouvons conclure et admettre qu'une valeur de E_h négative tend vers un retardement de l'initiation de la germination.

VI. Impact du potentiel redox sur l'orientation des flux métaboliques chez *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237

Après avoir validé le schéma impliquant le mécanisme d'oxydation du lactate, nous avons utilisé une matrice de flux pour comprendre l'impact du E_h du milieu sur les flux métaboliques chez *C. tyrobutyricum*. Dans le Tableau 39 sont regroupées les données de substrats et produits obtenues en condition réductrice basse (CRB) avec une valeur E_h de -319 mV et celles en condition réductrice haute (CRH) avec une valeur de -238 mV ainsi que les recouvrements carbones et cofacteurs et les rendements ATP.

Tableau 39 : Résultats des fermentations en culture continue de *C. tyrobutyricum* dans le milieu RCMLA avec le lactate et l'acétate comme seule source de carbone et un pH constant (5,75).

	Condition réduction basse (CRB)	Condition réduction haute (CRH)
Taux dilution (h^{-1})	0,016	0,016
E_h milieu (mV)	-319 ± 13	-238 ± 6
Biomasse (g [poids sec]. L^{-1})	0,46 ± 0,03	0,38 ± 0,01
Lactate consommé (mM)	112 ± 5,3	94 ± 1,1
Acétate consommé (mM)	34 ± 0,4	33 ± 0,2
Butyrate (mM)	73 ± 3,3	66 ± 0,1
CO₂ (mM)	112 ± 5,3	94 ± 1,1
Recouvrement carbone (%)	92	94
Recouvrement cofacteur (%)	99	101
Rendement ATP (mol.mol⁻¹ de substrats consommés)	0,3	0,2

En observant les données de ce tableau, nous pouvons clairement observer qu'une oxydation du milieu impacte la biomasse expliquant les différences de consommation de lactate et de production de butyrate, de CO₂ et une baisse du rendement d'ATP entre les conditions CRB et

CRH. Ces données, ajoutées à la matrice, ont permis d'obtenir les vitesses de flux métaboliques (Figure 59).

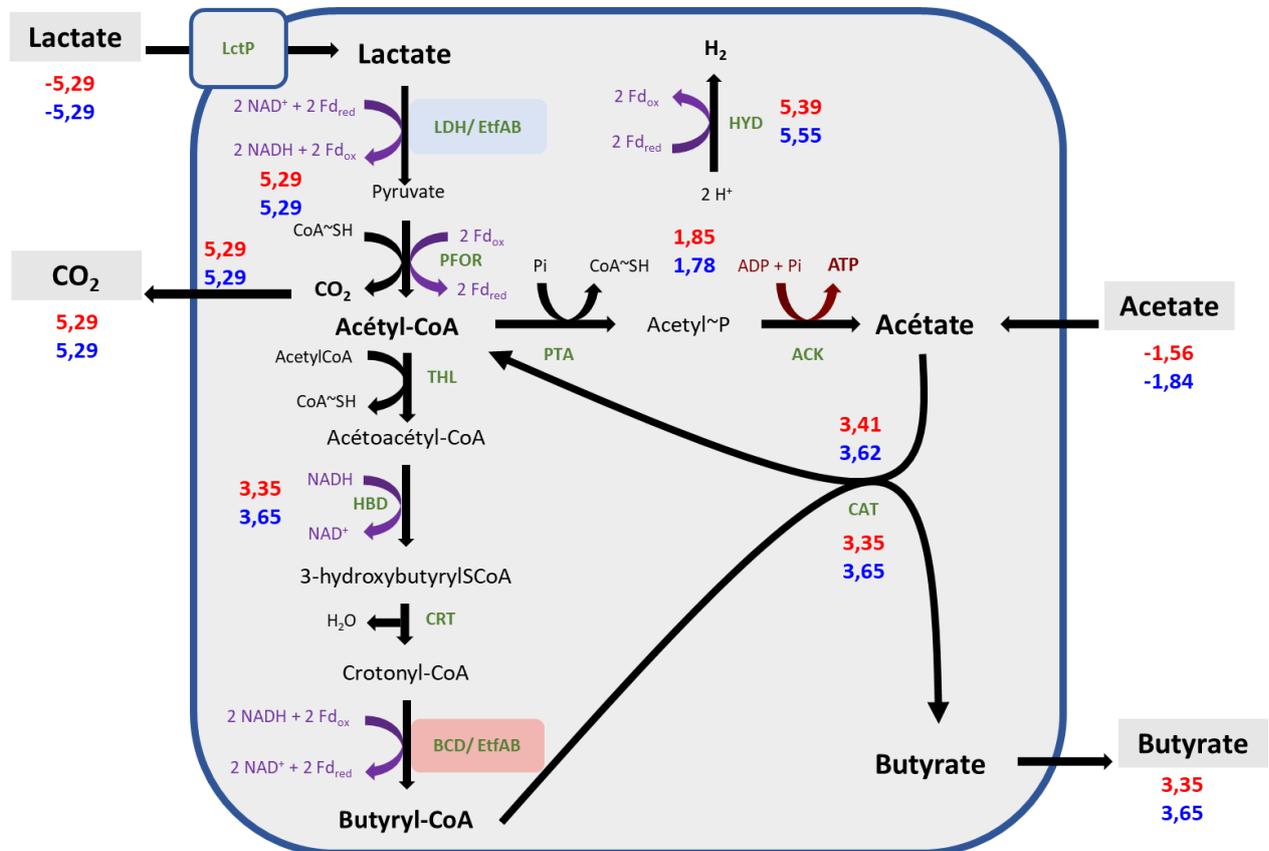


Figure 59 : Schéma métabolique de l'oxydation du lactate en présence d'acétate chez *C. tyrobutyricum* avec les vitesses de flux métaboliques sous différentes conditions de redox. En bleu: CRB et en rouge : CRH ; Flux exprimés en mM.h⁻¹.g [poids sec]⁻¹.

L'analyse des vitesses des flux métaboliques, dans le Tableau 40, ne montre aucune différence entre les valeurs des conditions CRB et CRH pour l'ensemble des vitesses de flux et des ratios sauf pour q_{acetate} consommée et le ratio Bu/Ac où des différences peuvent être observées.

Tableau 40 : Comparaison des flux métaboliques d'une culture de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 sous différentes conditions redox. Les valeurs de flux métaboliques sont exprimées en $\text{mM.h}^{-1}.\text{g} [\text{poids sec}]^{-1}$ Test ANOVA $n=3$, $\alpha=0,05$, comparaison tukey. Lecture par ligne.

Flux mesurés ($\text{mM.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ biomasse) & ratios	CRB	CRH
q_{lactate} consommée	-5,29 ^a	-5,29 ^a
q_{acetate} consommée	-1,56 ^a	-1,84 ^b
q_{CO2}	5,29 ^a	5,29 ^a
q_{Acetyl-CoA}	5,29 ^a	5,29 ^a
q_{acetate}	1,85 ^a	1,78 ^a
q_{butyrate}	3,35 ^a	3,65 ^a
q_{H2}	3,40 ^a	3,65 ^a
But/Ac (mol.mol^{-1})	2,16 ^b	1,99 ^a
H₂ (mol.mol^{-1} substrats)	0,50 ^a	0,51 ^a
CO₂ (mol.mol^{-1} substrats)	0,77 ^a	0,74 ^a
H₂/CO₂ (mol.mol^{-1})	0,64 ^a	0,69 ^a

Malgré ces différences significatives entre les valeurs q_{acetate} consommées et entre celles du ratio But/Ac, elles restent toutes proches numériquement et nous poussent à conclure qu'il n'aurait pas de changement de flux. Au final, à partir de nos données et l'utilisation de notre matrice, le E_h , dans notre gamme de variation, n'aurait aucun impact sur le métabolisme réorientant les flux métaboliques de la voie de l'oxydation du lactate.

Discussion générale & perspectives

L'objectif des travaux présentés dans ce manuscrit a été d'apporter des éléments de compréhension sur l'impact d'un E_h réducteur, obtenu par l'activité réductrice des bactéries lactiques, sur l'apparition du gonflement tardif induit par la fermentation butyrique de *Clostridium tyrobutyricum*, un accident que l'on peut observer au cours d'une fabrication fromagère de type pâte pressée cuite. Selon les résultats de l'ANR FoodRedox, l'utilisation de bactéries lactiques réductrices au cours d'une fabrication type Emmental sans bactérie propionique, a engendré un retard sur l'apparition du gonflement tardif ainsi qu'un ralentissement de l'activité métabolique de *Clostridium tyrobutyricum*. Ces observations ont conduit à l'hypothèse qu'une modulation du E_h , via la sélection de bactéries lactiques réductrices, permettrait d'empêcher l'apparition du défaut du gonflement tardif retrouvé dans les fromages à pâte pressée cuite.

I. Une modulation du E_h par les gaz d'un milieu modèle pour étudier son impact sur *C. tyrobutyricum*

Une partie des travaux de cette thèse avait pour but de comprendre précisément l'effet d'un E_h plus ou moins réducteur sur la capacité des spores de *C. tyrobutyricum* à germer et sur l'orientation des flux métaboliques lors de la fermentation butyrique.

L'environnement de la matrice fromagère étant complexe, nous avons choisi une approche en laboratoire avec un milieu modèle ne comportant que le lactate et l'acétate comme sources de carbone afin de pouvoir s'affranchir d'autres facteurs comme le pH, la température ou bien l'interaction avec les populations bactériennes indigènes ou des bactéries lactiques réductrices pouvant interférer avec la compréhension de l'impact du E_h sur *C. tyrobutyricum*. Le milieu modèle est basé sur le Reinforced Clostridium Medium modifié. Il a été obtenu en supprimant la cystéine (molécule réductrice) présente initialement dans le milieu et en changeant la source de carbone (remplacement du glucose par le lactate et suppression de l'amidon). Un milieu proche du lait et du fromage aurait été pertinent, mais malheureusement, ces derniers peuvent comporter des traces d'autres sources carbonées comme le glucose (Luquet et al., 1985).

Pour moduler l' E_h afin d'étudier l'impact d'une réduction sur la germination, l'oxygène dissous a été chassé par des gaz neutres (N_2) ou réducteurs (N_2/H_2). Cette approche a déjà permis d'étudier les impacts du E_h sur les caractéristiques organoleptiques de matrices laitières et sur l'orientation des flux métaboliques chez les microorganismes, dont *Clostridium* (Sridhar & Eiteman, 1999; Michelon et al., 2010; Ebel et al., 2011; Abraham et al., 2013; Larsen et al.,

2015). Cette approche de modulation du E_h par les gaz présente d'autres avantages : (i) ils sont autorisés en industrie alimentaire ; (ii) leur faible réactivité à la différence de l'ajout de molécules réductrices autorisées en alimentaire, comme l'acide ascorbique, la cystéine et le tocophérol, qui peuvent être métabolisées ou inhibitrices ; (iii) ils permettent d'obtenir une valeur du E_h initiale constante à la différence de l'approche électrochimique (Roussel et al., 2022). Les valeurs E_h avec N_2 ont permis d'obtenir un E_h de -117 mV et le mélange N_2H_2 , un E_h plus bas dû à l'incorporation d' H_2 réducteur avec une valeur de -176 mV. L'expérience a été réalisée également à différents pH, car une acidification, phénomène retrouvé en fabrication fromagère, peut-être également à l'origine de germination chez *C. tyrobutyricum* (Huchet et al., 1995). Un pH de 6,6, considéré comme optimal pour la bactérie et proche de celui du lait ainsi qu'un pH de 5,3 mimant celui retrouvé à l'étape de fin d'acidification (début d'affinage) lors d'une fabrication fromagère type Emmental, ont été choisis. Une des premières observations de cette étude concerne l'origine de la réduction du milieu modèle par *C. tyrobutyricum*. Selon nos résultats, les cinétiques de réduction obtenues seraient liées au phénomène de germination et non à l'activité métabolique des cellules de *C. tyrobutyricum* après germination. Par exemple, pour la condition -117 mV et à pH 6,6 (soit la condition $N_2_{6,6}$), le point d'initiation de la cinétique de réduction a été obtenu au bout de 13 h d'incubation alors qu'aucune différence de DO_{600nm} de la population bactérienne et d'évolution de pH n'a été observée avant 39 h d'incubation. Ce constat a été fait pour l'ensemble des conditions, ce qui nous a permis de corréler le premier point des cinétiques de réduction avec le déclenchement de la germination des spores de *C. tyrobutyricum*. La réduction du milieu lors de la germination pourrait s'expliquer d'une part par la dégradation des différentes couches, riches en cystéine, composant la spore comme par l'exemple l'exosporium ou encore des activités métaboliques comme la NADH déshydrogénase (Janganan et al., 2016; Ashok & Bauer, 2020). Concernant l'impact des facteurs pH et E_h , la condition avec $E_h -117 \pm 30$ mV et un pH de 6,6 serait la plus propice à la germination et à la croissance de *C. tyrobutyricum* avec un temps de latence de 13 h avant germination. *A contrario*, un E_h de -176 ± 30 mV et un pH de 6,6 sont les conditions les plus défavorables pour l'initiation de la germination en augmentant le temps de latence de 28 h à un temps de latence de 41 h. Concernant les résultats obtenus à pH 5,3, l'effet d'une réduction du milieu sur le temps de latence avant germination serait moins important qu'à pH 6,6, mais retarderait tout de même le phénomène de 2 heures selon nos résultats. L'interprétation de l'équation de la surface en réponse (Résultats, chapitre 3, XI), nous confirme qu'une réduction du E_h a un impact sur le temps de latence avant germination combiné ou non avec le pH. À notre connaissance, il n'existe aucune information sur le mécanisme de la germination chez *C.*

tyrobutyricum et de l'impact du potentiel redox sur l'initiation de ce phénomène. Avec nos résultats bio-informatiques sur l'analyse du mécanisme de germination chez *C. tyrobutyricum*, nous pouvons supposer que le potentiel redox pourrait avoir une influence comme pour le pH sur les récepteurs de germination Ger-type. Un shift métabolique a été également observé entre les deux valeurs de pH étudiées. Au pH 6,6, la croissance bactérienne était corrélée à une acidification du milieu alors qu'à partir du pH 5,3, une basification du milieu a été observée et quelle que soit la valeur E_h . Cette basification pourrait s'expliquer par une production d'acide gamma-aminobutyrique (GABA), un produit de la fermentation butyrique. Il s'agirait d'un mécanisme de protection contre un milieu acide déjà constaté en matrice fromagère (D'Incecco et al., 2018). Afin de confirmer cette hypothèse, un dosage de GABA par HPLC aurait été nécessaire au cours de l'expérience.

En résumé, une réduction du milieu entre les valeurs E_h -117 mV et -176 mV ne permet pas d'inhiber totalement la germination des spores de *C. tyrobutyricum*. Cependant, elle ralentirait *C. tyrobutyricum* avec une augmentation du temps de latence avant un déclenchement de la germination. De plus ce ralentissement, combiné avec le facteur pH proche de 6, permettrait d'accentuer davantage ce temps de latence avant germination. Il serait intéressant d'étudier l'impact des valeurs E_h inférieures à -250 mV voir même -300 mV afin de confirmer cette observation en utilisant des gaz réducteurs comme l' H_2 par exemple. En cas de confirmation, ceci pourrait être une stratégie d'inhibition en fabrication fromagère. Ainsi combiner cet effet à l'étape en cave froide (4°C) durant l'affinage dont la température est connue pour être inhibitrice de la germination de *C. tyrobutyricum* pourrait être une nouvelle approche pour lutter contre le DGT (Silveti et al., 2018; Morandi et al., 2021).

Concernant l'impact du E_h sur l'orientation des flux de la voie métabolique de la fermentation butyrique, une étude bio-informatique préliminaire a été nécessaire afin de clarifier la voie métabolique chez *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 avec le lactate comme seule source de carbone. À partir des données issues du séquençage du génome, nous avons pu identifier le complexe Lactate déshydrogénase couplée aux flavoprotéines ETFA et ETFB comme pouvant être impliquée dans l'oxydation du lactate. Ce complexe initialement découvert chez *A. woodii* avait également été retrouvé chez l'espèce *Clostridium butyricum* (Weghoff et al., 2015; Detman et al., 2019). C'est à partir de ce nouveau schéma que nous avons construit notre modèle d'analyse de flux. Nous avons également fait le choix de ne pas inclure les complexes NfnAB et le complexe Rnf, car nous n'avons pas assez d'information sur l'importance de leur rôle au cours de la fermentation butyrique mise à part en présence glucose où les gènes codant pour ces

complexes sont peu exprimés (Lee et al., 2016). Pour alimenter ce modèle, nous avons réalisé des fermentations en continu permettant d'obtenir des données de substrats consommés et des produits formés à l'état stationnaire dans le but de valider le schéma métabolique, ainsi que pour induire une modulation de E_h et comprendre son possible impact sur les flux.

Pour obtenir des données validant notre modèle, nous avons saturé le milieu modèle en N_2 pour chasser l' O_2 dissous par bullage. Puis à l'ensemencement, nous avons réorienté le flux d' N_2 vers l'espace de tête du bioréacteur à un débit faible, soit $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, afin d'éviter de perturber les dégagements gazeux issus de la fermentation butyrique tout en gardant une légère surpression pour prévenir toute incorporation d'air. À l'état stationnaire, une valeur de $E_h = -319 \text{ mV}$, caractéristique des fermentations anaérobies, a été obtenue. Les valeurs obtenues de butyrate produit, de lactate et acétate consommés sont cohérentes avec les rares données retrouvées dans la littérature comme celles obtenues en batch par Bryant & Burkey (1956). L'analyse des recouvrements carbone et des cofacteurs à partir de notre modèle d'analyse des flux a donné des valeurs cohérentes avec 94% et 99%, respectivement, et une balance redox proche de la neutralité soit 0,03. Ces résultats nous ont permis de valider notre modèle sur l'analyse de flux métaboliques ainsi que la cohérence de notre schéma métabolique avec ce nouveau complexe Lactate déshydrogénase / EtfAB avec un ratio lactate/acétate consommé = 3/1, avec une production proportionnelle de 2 butyrates et 3 CO_2 . Une production d' H_2 a pu être estimée à $0,5 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de substrats, ce qui est cohérent avec la valeur de $0,53 \text{ mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ de substrats retrouvés chez Bryant & Burkey (1956) et les celles de Cheng et al. (2013). Nous avons cherché à comprendre le rôle de l'acétate comme co-substrat. En enlevant l'acétate consommé du modèle, nous nous sommes aperçus que cela jouait sur l'équilibre des cofacteurs intracellulaires et plus précisément celui du NADH. En effet, sans acétate, le recouvrement de NADH passe 98% à 87 % soit une quantité NADH réduit plus importante dans ce cas. Ainsi la co-consommation d'acétate lors de l'oxydation du lactate par *C. tyrobutyricum* semble primordiale pour l'homéostasie redox intracellulaire. Cette importance dans l'équilibre intracellulaire a été également observée chez *Staphylococcus aureus* (Marshall et al., 2016).

Malgré une cohérence des flux métaboliques et de l'ensemble des bilans intracellulaires obtenus avec notre modèle, la limite de ce dernier se situe au niveau des produits gazeux, notamment l' H_2 . Autant les valeurs de recouvrement de carbones ont été calculées en incluant l'estimation de la production de CO_2 obtenue par le modèle de flux basé sur le ratio Lactate/ CO_2 1 :1 issu de l'équilibre stœchiométrique des réactions, ce qui est cohérent, autant la quantité d'hydrogène produite a été estimée à partir de l'excédent de ferrédoxines réduites obtenues par le calcul du

recouvrement ferrédoxine issu du modèle mathématique ; négligeant la possible implication d'autres complexes comme Rnf et NfnAB mentionnés plus haut. Il serait pertinent d'obtenir de nouvelles données de la fermentation butyrique, à partir de l'oxydation du lactate et présence d'acétate, de réacteur en continu incluant la quantification des gaz produits ainsi que de réaliser en parallèle une analyse transcriptomique ou protéomique pour venir confirmer l'implication des gènes ou protéines identifiés dans l'oxydation du lactate et des autres complexes (Lee et al., 2016).

Pour moduler le potentiel redox dans le bioréacteur continu, nous avons décidé d'utiliser à nouveau le N₂. En comparant l'ensemble des flux métaboliques rapportés à la biomasse sous deux valeurs E_h, aucune réorientation des flux métaboliques de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* n'a pu être observée. Par contre, une élimination de l'H₂ dissous du milieu de culture par dégazage a engendré une baisse de 17 % de la population de *C. tyrobutyricum*. Dans le cas d'une contamination en fabrication fromagère, ce constat n'apporte guère de solution, car, comme expliqué dans le paragraphe 4.1 du chapitre de 1 de la bibliographie, il suffit d'une petite concentration de spores de *Clostridium* dans le lait pour être à l'origine de l'apparition du défaut du gonflement tardif.

Dans la littérature, d'autres méthodes de modulation du E_h utilisant des molécules transporteuses artificielles d'électrons ou de cathodes ont permis d'observer des réorientations des flux de la fermentation butyrique chez *C. tyrobutyricum* sur glucose (Choi et al., 2012; Fu et al., 2020). Ainsi, ces résultats pourraient s'expliquer par la nature de la stratégie utilisée pour moduler le E_h. L'approche d'une modulation du E_h par l'élimination de l'H₂ produit avec un faible débit d'azote pour d'obtenir une valeur moins réductrice (-238 mV au lieu de -319mV), ne permettrait peut-être pas l'observation d'une réorientation des flux. La valeur E_h -238 mV pourrait être à l'origine des thiols exofaciaux au niveau des membranes des cellules végétatives de *C. tyrobutyricum* (Michelon et al., 2010). Il se pourrait également que l'écart entre les deux valeurs de E_h étudiées ne soient pas suffisantes pour observer une réorientation des flux métaboliques. Riondet et al. (2000) ont pu démontrer une réorientation des flux chez *E. coli* avec des valeurs E_h entre -80 mV et -320 mV. Il se pourrait également que le choix du pH à 5,8, valeur entre 5,3 et 6,6, ait eu une influence sur l'étude de l'impact. En effet, un pH plus acide diminuerait l'impact du E_h comme observé lors de l'étude de l'impact du pH et du E_h sur la germination des spores de *C. tyrobutyricum*, expliquée plus haut. Ainsi, il serait intéressant d'étudier à nouveau l'effet du E_h sur le métabolisme de la fermentation butyrique à partir du lactate et de l'acétate avec des modulations du E_h plus importantes et étudier également l'impact

combiné à un pH 5,3 correspondant à l'étape du démoulage ou bien à celui à l'entrée en cave chaude soit J+20 à un pH 5,5 (Bachmann et al., 2002). Afin d'obtenir de plus grands écarts entre les valeurs de E_h , différentes approches peuvent être envisagées : d'une part, celle des gaz, en augmentant le débit d'azote ou en utilisant de l'hydrogène pur et d'autre part, celle avec des bactéries, en réalisant des co-cultures avec des bactéries lactiques réductrices ou non en fermentation continue.

II. Une modulation du E_h par les bactéries lactiques d'un fromage type Emmental pour étudier son impact sur *C. tyrobutyricum*

Une autre partie de la thèse a été de comprendre l'impact du E_h à l'échelle pilote en fromagerie en utilisant un fromage type Emmental comme modèle et l'utilisation de différentes bactéries lactiques réductrices afin d'obtenir différents profils de réduction et de valeurs de E_{h7} au démoulage ($E_{h7 \text{ min}}$). Le modèle type Emmental a été choisi pour plusieurs raisons. D'une part, pour son temps d'affinage court et parce qu'il est soumis à un cahier des charges moins contraignant, surtout au niveau de l'alimentation des troupeaux de vaches laitières où ces dernières peuvent être alimentées avec de l'ensilage connu pour être un des vecteurs de contaminations des *Clostridium* butyriques (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt n° 46 -2015, 2015). D'autre part, il s'agissait du modèle utilisé dans l'ANR FoodRedox.

Concernant la sélection des bactéries lactiques, nous avons choisi des espèces isolées de différents fromages et connues pour leur utilisation en fabrication type Emmental comme starter ou bien retrouvées naturellement au cours de l'affinage. Plus précisément, nous avons opté pour une sélection de souche appartenant à l'espèce *L. lactis* utilisée comme co-starter avec *L. helveticus* et *S. thermophilus* et des souches appartenant aux espèces *L. rhamnosus* ou *L. paracasei*, se développant au cours de l'affinage dans les fromages type Emmental (Beresford et al., 2001; Bove et al., 2012). Lors de cette étape de sélection, nous avons mis au point une nouvelle méthode facilitant le criblage de banque de souches de bactéries lactiques en fonction de leurs activités réductrices. Les comparaisons entre les trois méthodes sont résumées dans le Tableau 41, ci-dessous :

Tableau 41 : Comparaison de la technique ABRA avec les autres techniques de la littérature.

Nom Méthode		PORA	ORCA	ABRA	
Source		Cachon et al. (2002)	Michelon et al. (2013)	Cette thèse	
Acquisition	Méthode	POtentiométrique	COlorimétrique	Spectrométrique (ABsorbance)	
	Durée	15 à 24 heures	24 à 48 heures	16 heures	
	Matériel	Interface + sondes + Flacon	Boîtes de Pétri + boîte à gants + gaz	Plaque 96 puits + spectro	
	Cout	+	++	-	
	Mise en œuvre	Longue et minutieuse	Rapide	Rapide	
Mesure	Définition	Activité Réductrice & acidification	CApacité Réductrice & acidification	Activité Réductrice	
	Type	Cinétique	Résultats binaires	Cinétique	
	Paramètres	pH & E _h	pH & E _h	E _h	
	Valeur	pH	Valeurs brutes + Vitesse maximale + Temps moyen pour atteindre la vitesse maximale	Observation visuelle Oui/ Non	∅
		E _h	Valeurs brutes+ Vitesse maximale + Temps moyen pour atteindre la vitesse maximale	Observation visuelle Oui/ Non engendrant un score numérique	Valeurs brutes + Vitesse maximale + Temps moyen pour atteindre la vitesse maximale
	Fiabilité	Répétable	Répétable	Répétable	
Différentiation	Inter et Intra-espèce	Inter-espèce	Intra-espèce		
Caractéristiques	Rendement	1 sonde / souche	8 boîtes de Pétri / souche	2 puits / souche	
	Reproductibilité	-	Expérimentateur dépendant	-	
	Contraintes	Etalonnage des sondes	Gaz & interprétation des résultats	Travail en puit (petit volume)	
	Risques	Sondes en verre	Gaz	-	

Au final, le milieu modèle et le sel de tétrazolium choisis permettent de différencier significativement les souches de lactocoques entre elles ainsi que celles des lactobacilles mésophiles entre eux tout en étant facile et rapide d'utilisation.

Bien que les lactocoques soient connus pour leur capacité à réduire rapidement le lait pendant l'étape de fabrication, les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (lactobacilles mésophiles) pourraient jouer un rôle dans le maintien d'un E_h bas au cours de l'affinage, justifiant notre stratégie de combiner deux espèces (Broadbent et al., 2002; Brasca et al., 2007).

À la différence des résultats obtenus durant la sélection des bactéries lactiques ou des cultures mixtes réductrices en laboratoire, ceux constatés pendant les étapes de fabrications fromagères n'ont montré aucune différence entre les témoins et les modalités réductrices au niveau de la vitesse de réduction (V_rmax). Ce critère, initialement d'intérêt pour étudier l'impact d'une

cinétique de réduction plus ou moins rapide sur *C. tyrobutyricum*, n'a ainsi pas pu être étudié. Il est difficile de penser que les V_r max aient été influencés par *L. helveticus* et *S. thermophilus* en raison de leur faible capacité à réduire le milieu (Cachon et al., 2002; Brasca et al., 2007; Michelon et al., 2013). Caldeo et McSweeney (2012) ont d'ailleurs démontré l'incapacité à réduire le lait par ces espèces lors d'une simulation de fabrication type Emmental en laboratoire. Cependant, ce constat pourrait s'expliquer par l'implication des populations de bactéries mésophiles indigènes ayant résisté à la pasteurisation. En effet, pour l'ensemble des laits utilisés au cours des différentes fabrications, une moyenne de 10^3 UFC. mL⁻¹ de bactéries mésophiles a été détectée après pasteurisation.

Afin d'éviter à nouveau ce problème, il aurait été intéressant d'ajouter une expérience complémentaire à celles déjà réalisées afin d'éviter de rencontrer ces changements de paramètres de réduction dus au scale-up entre l'échelle laboratoire à celle pilote en mini-fromagerie. Dans notre cas, il aurait été intéressant de reprendre notre démarche avec l'utilisation du cycle de température en cours de fabrication type Emmental et de venir la compléter avec l'utilisation d'un lait standardisé fromageable impliquant des analyses microbiologiques afin de suivre précisément l'évolution de la microflore bactérienne indigène et des starters.

Malgré l'absence de différences entre les V_r max au cours des fabrications, nous avons retrouvé des valeurs E_h finales ($E_{h7 \text{ min}}$) cohérentes entre les résultats obtenus en laboratoire et ceux en fabrication fromagère. En effet, les valeurs les plus réductrices ont été obtenues avec les bactéries lactiques les plus réductrices, que ce soit en laboratoire ou en fromagerie.

Au cours de l'affinage, aucune des modalités n'a pu empêcher l'apparition du défaut du gonflement tardif. Cependant, nous avons pu observer un ralentissement de la production du butyrate entre J+24 et J+31 avec la modalité la plus réductrice LcR+LbR ou le mixte avec *L. lactis* 8F8 et *L. rhamnosus* F9 5 60. Ce ralentissement supposerait un retardement de la germination et/ou bien un ralentissement de l'activité métabolique de *C. tyrobutyricum*. L'hypothèse d'un retardement de la germination serait cohérente avec les observations obtenues en laboratoire comme expliqué plus haut. De plus, les résultats des coupes transversales obtenues par imagerie scanner entre J+24 et J+31 nous ont confortés dans ces hypothèses, avec une absence nette de grosses cavités caractéristiques du gonflement tardif entre LcR+LbR et les autres modalités contaminées par *C. tyrobutyricum*.

Cependant, nous ne pouvons pas conclure clairement sur l'origine de ce ralentissement. Au premier abord, nous pourrions supposer qu'il s'agirait de l'activité réductrice de LbR maintenant une valeur de E_h négative qui en serait à l'origine. Cette hypothèse assume que la valeur de E_h obtenue au démoulage resterait inchangée au cours de l'affinage, comme proposé par Topcu et al. (2008). Malheureusement, les suivis des cinétiques de réduction réalisés au cours de l'affinage n'ont pas pu être exploités d'une part, en raison du choix du matériel et d'autre part, en raison des perturbations électriques venant des équipements de cave d'affinage. Un matériel plus adapté comme proposé par Abraham et al. (2013) aurait pu permettre d'éviter ces problèmes, comme l'utilisation des sondes à embout perforant et de plus petit diamètre. D'un autre point de vue, nous avons observé une consommation du citrate dès J+1 d'affinage pour la modalité LcR+LbR. Ce qui, d'une part, remet en question le choix de la méthode pour détecter une capacité à métaboliser le citrate par *L. rhamnosus* F9 5 60 et d'autre part, pose le doute sur l'impact du métabolisme du citrate sur l'activité métabolique de *C. tyrobutyricum*. L'utilisation du milieu KCA n'était pas adaptée pour détecter le métabolisme du citrate chez les lactobacilles par contre celui du milieu citrate de calcium aurait été plus approprié comme l'ont démontré Medina de Figueroa et al. (2000) avec la souche *L. rhamnosus* ATCC 11443. Concernant le métabolisme du citrate par les lactobacilles, il serait intéressant de l'étudier afin de déterminer son réel effet sur *C. tyrobutyricum*. Dans le cas où il y aurait un effet négatif, il serait également intéressant de connaître la nature de l'inhibition comme pour *P. freudenreichii* où Jimeno et al. (1995) ont pu démontrer leur inhibition due à l'interaction antagoniste avec *L. rhamnosus* au cours de l'affinage. Ces observations pourraient se faire en fermenteur en continu pour étudier, dans un premier temps, l'impact de ces produits sur *C. tyrobutyricum*, et dans un second temps l'interaction entre les deux espèces bactériennes.

Pour résumer, ces travaux de thèse ont pu apporter des éclaircissements sur la compréhension de l'impact du E_h sur *C. tyrobutyricum*. En effet, dans l'état actuel des résultats qui ne tendent vers aucun impact du E_h sur l'orientation des flux métaboliques chez *C. tyrobutyricum* obtenus en laboratoire, il est encore difficile de trancher sur l'influence réelle du potentiel redox sur l'orientation des flux métaboliques ou bien d'une interaction antagoniste avec des bactéries lactiques métabolisant le citrate au cours de l'affinage. Néanmoins, une réduction du milieu permettrait un retardement sur l'initiation du phénomène de germination en laboratoire et probablement en matrice fromagère. Elle a permis également d'apporter plus de connaissances sur le fonctionnement du métabolisme impliquant l'oxydation du lactate en présence d'acétate.

Valorisation des travaux

Articles

- **Munier E.**, Licandro-Séraut H., Achilleos C., Cachon R., Beuvier E. **2019**. Whole genome sequencing and annotation of *Clostridium tyrobutyricum* strain CIRM BIA 2237, isolated from silage. *Microbiology Resource Announcements* 8(30), e00492-19.
- Roussel C., Ebel B., **Munier E.**, Michelon D., Martin-Dejardin F., Beuvier E., De Coninck J., Gaudu P., Cachon R. **2022**. Green strategies to control redox potential in the fermented food industry. *Food Research International* 156, 111154.
- **Munier E.**, Licandro H., Beuvier E., Cachon R. **2023**. Bioinformatic and metabolic flux analysis highlights new mechanism involved in lactate oxidation in *Clostridium tyrobutyricum*. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00316-y>

Par ailleurs, certains de mes travaux ont fait l'objet d'une déclaration d'invention et de résultats valorisables (DIRV) auprès de l'INRAE, et le conseil scientifique du domaine d'innovation concerné a jugé que ces résultats pouvaient être brevetables.

Communications

- **Munier E.**, Buchin S., Achilleos C., Licandro-Séraut H., Beuvier E., Cachon R. **2018**. Maitrise de la fermentation butyrique par une microflore lactique réductrice. Forum des jeunes chercheurs, 14 et 15 juin 2018. Besançon, France. [Poster].
- **Munier E.** **2021**. Maitrise de la fermentation butyrique par la microflore lactique réductrice, Société française de Microbiologie (SFM), 03 octobre 2018. Paris, France [Orale].
- Fischer E., **Munier E.** **2021**. The use of biotechnology. Journée des doctorants de l'UMR PAM, 21 octobre 2021. [Orale].
- **Munier E.**, Licandro H., Buchin S., Achilleos C., Dufrene F., Beuvier E., Cachon R. **2021**. Screening of lactic acid bacteria based on their reduction kinetics. Cheese science and Technology Symposium, June7-11, online. [Poster].
- **Munier E.** **2021**. Le gonflement tardif : la parade de l'oxydo-réduction. Webinar Profession fromager, 12 octobre 2021, online. [Orale].
- **Munier E.** **2022**. Criblage des bactéries lactiques en fonction de leur cinétique de réduction : approche méthodologique, 8-10 juin 2022. Rennes, France [Orale].

- **Munier E.**, Licandro H., Buchin S., Achilleos C., Dufrene F., Beuvier E., Cachon R. **2022**. Screening of *Lactococcus lactis* starters with Absorbance Reduction Activity Method (ARAM). FoodMicro, August 28-31. Athens, Grece. [Poster].

Références

- Abgrall, B., Bourgeois, C., & Bourva, F. (1985). Dénombrement des spores de *Clostridium tyrobutyricum* par filtration sur membrane et culture sur milieu gélosé. *Lait*, 65(647-648), 45-53.
- Abraham, S., Cachon, R., Colas, B., Feron, G., & De Coninck, J. (2007). Eh and pH gradients in Camembert cheese during ripening: Measurements using microelectrodes and correlations with texture. *International Dairy Journal*, 17(8), 954-960. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.12.010>
- Abraham, S., Cachon, R., Jeanson, S., Ebel, B., Michelon, D., Aubert, C., Rojas, C., Feron, G., Beuvier, E., Gervais, P., & De Coninck, J. (2013). A procedure for reproducible measurement of redox potential (E h) in dairy processes. *Dairy Science & Technology*, 93(6), 675-690. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0134-5>
- Aguiar, P. H. N., Fernandes, N. M. G. S., Zani, C. L., & Mourão, M. M. (2017). A high-throughput colorimetric assay for detection of *Schistosoma mansoni* viability based on the tetrazolium salt XTT. *Parasites & Vectors*, 10(1), 300. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2240-3>
- Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J. H. J., & Ten Brink, B. (1998). Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. *Journal of applied Microbiology*, 84(4), 568-576.
- Al-Hinai, M. A., Jones, S. W., & Papoutsakis, E. T. (2015). The *Clostridium* Sporulation Programs : Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 19-37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-14>
- Alvenäs, A. (2015). Cheeses with blowing defect – *Problematics and preventable methods*. Bachelor thesis n°142, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, 33p..
- Anastasiou, R., Aktypis, A., Georgalaki, M., Papadelli, M., De Vuyst, L., & Tsakalidou, E. (2009). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasserli cheese production and ripening. *International Dairy Journal*, 19(5), 330-335. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.12.001>
- Ashok, N., & Bauer, C. E. (2020). Evidence of defined temporal expression patterns that lead a gram-negative cell out of dormancy. *PLOS Genetics*, 16(3), e1008660. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008660>

- Aubert, C., Cappelle, N., Jeanson, S., Eckert, H., Divies, C., & Cachon, R. (2002). Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Sciences des Aliments*, 22(1-2), 177-187. <https://doi.org/10.3166/sda.22.177-187>
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., & Garde, S. (2016). Application of high pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semi-hard cheese. *Food Microbiology*, 60, 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.008>
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., & Garde, S. (2017). Industrial-scale application of *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting *Clostridium tyrobutyricum* in semi-hard ewe milk cheese. *Food Microbiology*, 66, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.010>
- Bachmann, H.-P., Bütikofer, U., & Isolini, D. (2002). CHEESE | Swiss-Type Cheeses. In *Encyclopedia of Dairy Sciences* (p. 363-371). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00075-4>
- Bao, T., Feng, J., Jiang, W., Fu, H., Wang, J., & Yang, S.-T. (2020). Recent advances in n-butanol and butyrate production using engineered *Clostridium tyrobutyricum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(9), 138. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02914-2>
- Bassi, D., Cappa, F., & Cocconcelli, P. S. (2009). A combination of a SEM technique and X-ray microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. *Research in Microbiology*, 160(5), 322-329. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.04.003>
- Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S., & Cocconcelli, P. S. (2013). TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *International Dairy Journal*, 33(1), 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.008>
- Bassi, D., Puglisi, E., & Cocconcelli, P. S. (2015). Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiology*, 52, 106-118. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.004>
- Bédouet, L., Arnold, F., Robreau, G., Batina, P., Talbot, F., & Malcoste, R. (1998). Partial analysis of the flagellar antigenic determinant recognized by a monoclonal antibody to *Clostridium tyrobutyricum*. *Microbiology and immunology*, 42(2), 87-95.

- Bennett, G. N., & Rudolph, F. B. (1995). The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiology Reviews*, 17(3), 241-249. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1995.tb00208.x>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 259-274. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5)
- Bergère, J. L., & Favreau, B. (1987). Immuno detection des spores de *Clostridium tyrobutyricum* agent de gonflement butyrique des fromages. *Sciences des Aliments*, 7, 89.
- Bergère, J. L., Le Bars, D., & Commissaire, J. (1969). La bactofugation du lait et l'élimination des spores de *Clostridium tyrobutyricum*. *Lait*, 49(488), 507-519. <https://doi.org/10.1051/lait:196948820>
- Bergère, J.-L. (1985). Mise en évidence de deux groupes sérologiques principaux chez *Clostridium tyrobutyricum*. *Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie*, 136(1), 75-91. [https://doi.org/10.1016/S0769-2609\(85\)80008-9](https://doi.org/10.1016/S0769-2609(85)80008-9)
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology : New insights into their cellular reduction. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 11, p. 127-152). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bhattacharjee, D., McAllister, K. N., & Sorg, J. A. (2016). Germinants and Their Receptors in Clostridia. *Journal of Bacteriology*, 198(20), 2767-2775. <https://doi.org/10.1128/JB.00405-16>
- Bhupathiraju, V. K., Hernandez, M., Landfear, D., & Alvarez-Cohen, L. (1999). Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 37(3), 231-243. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(99\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00069-X)
- Bogovič Matijašić, B., Koman Rajšp, M., Perko, B., & Rogelj, I. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17(2), 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.011>
- Bolduc, M.-P., Raymond, Y., Fustier, P., Champagne, C. P., & Vuilleumard, J.-C. (2006). Sensitivity of bifidobacteria to oxygen and redox potential in non-fermented pasteurized

- milk. *International Dairy Journal*, 16(9), 1038-1048.
<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.030>
- Borreani, G., & Tabacco, E. (2008). Low Permeability to Oxygen of a New Barrier Film Prevents Butyric Acid Bacteria Spore Formation in Farm Corn Silage. *Journal of Dairy Science*, 91(11), 4272-4281. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1151>
- Bove, C. G., Angelis, M. D., Gatti, M., Calasso, M., Neviani, E., & Gobbetti, M. (2012). Metabolic and proteomic adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* strains during growth under cheese-like environmental conditions compared to de Man, Rogosa, and Sharpe medium. *Proteomics*, 12(21), 3206-3218. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200157>.
- Brändle, J., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. *Food Control*, 67, 96-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038>
- Brändle, J., Fraberger, V., Schuller, K., Zitz, U., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2017). A critical assessment of four most probable number procedures for routine enumeration of cheese-damaging clostridia in milk. *International Dairy Journal*, 73, 109-115. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.011>
- Brändle, J., Heinzle, L., Fraberger, V., Berta, J., Zitz, U., Schinkinger, M., Stocker, W., Kneifel, W., & Domig, K. J. (2018). Novel approach to enumerate clostridial endospores in milk. *Food Control*, 85, 318-326. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.017>
- Brasca, M., Hogenboom, J. A., Morandi, S., Rosi, V., D'Incecco, P., Silveti, T., & Pellegrino, L. (2016). Proteolytic Activity and Production of γ -Aminobutyric Acid by *Streptococcus thermophilus* Cultivated in Microfiltered Pasteurized Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(45), 8604-8614. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03403>
- Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., & Tamburini, A. (2007). Redox potential to discriminate among species of lactic acid bacteria : Redox potential of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1516-1524. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03392.x>
- Broadbent, J. R., Brotherson, C., Johnson, M. E., & Oberg, C. J. (2002). Cheese micro-ecology and the influence of adjunct/wash techniques. *Australian Journal of Dairy Technology*, 57(2), 137.
- Bryant, M. P., & Burkey, L. A. (1956). The characteristics of lactate-fermenting sporeforming anaerobes from silage. *Journal of bacteriology*, 71(1), 43.

- Buckel, W., & Thauer, R. K. (2013). Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(2), 94-113. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.07.002>
- Buckel W, Thauer RK (2018) Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin, and anaerobic respiration with protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as electron acceptors: A historical review. *Frontier in Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00401>
- Bulat, T., & Topcu, A. (2020). Oxidation-reduction potential of UF white cheese : Impact on organic acids, volatile compounds and sensorial properties. *LWT - Food Science and Technology*, 131, 109770. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109770>
- Cachon, R., Capelle, N., Divies, C., & Prost, L. (2002). *Procédé de culture de micro-organismes en conditions reductrices obtenues par un flux gazeux* (World Intellectual Property Organization Patent N° WO2002002748A1). <https://patents.google.com/patent/WO2002002748A1/fr?q=WO0202748>
- Cachon, R., & De Coninck, J. (2012). Potentiel d'oxydoréduction (Eh) des matrices alimentaires. *Agroalimentaire*. <https://doi.org/10.51257/a-v1-f4020>
- Cachon, R., Divies, C., Jeannot, P., & Prost, L. (2002). *Procédé pour le conditionnement de produits périssables sous atmosphère modifiée contenant de l'hydrogène et produits ainsi conditionnés* (World Intellectual Property Organization Patent N° WO2002002409A1). <https://patents.google.com/patent/WO2002002409A1/fr?q=WO0202409>
- Cachon, R., Jeanson, S., Aldarf, M., & Divies, C. (2002). Characterisation of lactic starters based on acidification and reduction activities. *Lait*, 82(3), 281-288. <https://doi.org/10.1051/lait:2002010>
- Cai, G., Jin, B., Saint, C. & Monis, P. (2010). Metabolic flux analysis of hydrogen production network by *Clostridium butyricum* W5: Effect of pH and glucose concentrations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(13), 6681–6690. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.097>
- Caldeo, V., Hannon, J. A., Hickey, D.-K., Waldron, D., Wilkinson, M. G., Beresford, T. P., & McSweeney, P. L. H. (2016). Control of oxidation-reduction potential during Cheddar cheese ripening and its effect on the production of volatile flavour compounds. *Journal of Dairy Research*, 83(4), 479-486. <https://doi.org/10.1017/S002202991600056X>

- Caldeo, V., & McSweeney, P. L. H. (2012). Changes in oxidation-reduction potential during the simulated manufacture of different cheese varieties. *International Dairy Journal*, 25(1), 16-20. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.02.002>
- Calligaris, S., Manzocco, L., Anese, M., & Nicoli, M. C. (2004). Effect of heat-treatment on the antioxidant and pro-oxidant activity of milk. *International Dairy Journal*, 14(5), 421-427. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.001>
- Cheng, H.-H., Whang, L.-M., Lin, C.-A., Liu, I.-C., & Wu, C.-W. (2013). Metabolic flux network analysis of fermentative hydrogen production: Using *Clostridium tyrobutyricum* as an example. *Bioresource Technology*, 141, 233-239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.141>
- Choi, O., Um, Y., & Sang, B.-I. (2012). Butyrate production enhancement by *Clostridium tyrobutyricum* using electron mediators and a cathodic electron donor. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(10), 2494-2502. <https://doi.org/10.1002/bit.24520>
- Choudhary, S., Arora, S., Kumari, A., Narwal, V., & Sharma, V. (2017). Effect of quality of milk on maillard reaction and protein oxidation during preparation of cow and buffalo milk khoa. *Journal of Food Science and Technology*, 54(9), 2737-2745. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2710-9>
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., & Comi, G. (2004). The late blowing in cheese : A new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 83-91. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00296-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00296-4)
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., & Farrow, J. A. E. (1994). The Phylogeny of the Genus *Clostridium* : Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 812-826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
- Corich, V., Soldati, E., & Giacomini, A. (2004). Optimization of fluorescence microscopy techniques for the detection of total and viable lactic acid bacteria in whey starter cultures. *Annals of Microbiology*, 54(3), 335-342.
- Cosentino, C, Paolino, R. & Freschi, P. (2015). Effect of jenny milk addition on the inhibition of late blowing in semihard cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5133-5142.
- Crabbendam, P.M., Neijssel, O.M., & Tempest, D.W. (1985) Metabolic and energetic aspects of the growth of *Clostridium butyricum* on glucose in chemostat culture. *Archives of Microbiology*, 142, 375–382. <https://doi.org/10.1007/BF00491907>

- Cremonesi, P., Vanoni, L., Silveti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2012). Identification of *Clostridium beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research*, 79(3), 318-323. <https://doi.org/10.1017/S002202991200026X>
- Cummins, C.S., & Johnson, J.L. (1971). Taxonomy of the Clostridia: Wall composition and DNA homologies in *Clostridium butyricum* and other butyric acid-producing Clostridia. *Journal of General Microbiology*, 67, 33–46. <https://doi.org/10.1099/00221287-67-1-33>
- Demarigny, Y., Beuvier, E., Dasen, A., & Duboz, G. (1996). Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. 1. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait*, 76(4), 371-387. <https://doi.org/10.1051/lait:1996428>
- Demarquilly, C. (1998). Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. *INRAE Productions Animales*, 11(5), 359-364. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1998.11.5.3964>
- Detman, A., Mielecki, D., Chojnacka, A., et al (2019). Cell factories converting lactate and acetate to butyrate: *Clostridium butyricum* and microbial communities from dark fermentation bioreactors. *Microbial Cell Factories*, 18, 36. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1085-1>
- Devoyod, J. J., Millet, L., & Keromnes, J. (1974). La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. II. - Les staphylocoques. *Lait*, 54(538), 528-536. <https://doi.org/10.1051/lait:197453826>
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., & Baek, K.-H. (2012). Production of gaba (γ - aminobutyric acid) by microorganisms : A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1230-1241. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400001>
- Diallo, M., Kengen, S. W. M., & López-Contreras, A. M. (2021). Sporulation in solventogenic and acetogenic clostridia. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11289-9>
- Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B., & Hunter, J. B. (1995). The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. *Archives of Microbiology*, 164(1), 36-42.
- Diez-Gonzalez, F., Russell, J. B., & Hunter, J. B. (1997). NAD-Independent Lactate and Butyryl-CoA Dehydrogenases of *Clostridium acetobutylicum* P262. *Current Microbiology*, 34(3), 162-166. <https://doi.org/10.1007/s002849900162>

- D'Incecco, P., Ong, L., Gras, S., & Pellegrino, L. (2018). A fluorescence in situ staining method for investigating spores and vegetative cells of Clostridia by confocal laser scanning microscopy and structured illuminated microscopy. *Micron*, *110*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2018.04.005>
- D'Incecco, P., Ong, L., Pellegrino, L., Faoro, F., Barbiroli, A., & Gras, S. (2018). Effect of temperature on the microstructure of fat globules and the immunoglobulin-mediated interactions between fat and bacteria in natural raw milk creaming. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 2984-2997. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13580>
- D'Incecco, P., Pellegrino, L., Hogenboom, J.A., et al (2018). The late blowing defect of hard cheeses: Behaviour of cells and spores of *Clostridium tyrobutyricum* throughout the cheese manufacturing and ripening. *LWT - Food Science and Technology*, *87*,134–141. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.083>
- Doyle, C. J., Gleeson, D., Jordan, K., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2015). Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, *197*, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022>
- Driehuis, F., & Elferink, S. J. W. H. O. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: A review. *Veterinary Quarterly*, *22*(4), 212-216. <https://doi.org/10.1080/01652176.2000.9695061>
- Driehuis, F., Hoolwerf, J., & Rademaker, J. L. W. (2016). Concurrence of spores of *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium beijerinckii* and *Paenibacillus polymyxa* in silage, dairy cow faeces and raw milk. *International Dairy Journal*, *63*, 70-77. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.08.004>
- Drinan, F. D., & Cogan, T. M. (1992). Detection of propionic acid bacteria in cheese. *Journal of Dairy Research*, *59*(1), 65-69. <https://doi.org/10.1017/s0022029900030259>
- Du, Y., Jiang, W., Yu, M., Tang, I.-C., & Yang, S.-T. (2015). Metabolic process engineering of *Clostridium tyrobutyricum* $\Delta ack - adhE2$ for enhanced n-butanol production from glucose: Effects of methyl viologen on NADH availability, flux distribution, and fermentation kinetics: Metabolic Process Engineering of *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(4), 705-715. <https://doi.org/10.1002/bit.25489>
- Dürre, P. (2014). Physiology and Sporulation in *Clostridium*. *Microbiology Spectrum*, *2*(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012>
- Dwidar M, Park J-Y, Mitchell RJ, Sang B-I (2012). The future of butyric acid in industry. *Scientific World Journal*, 2012 :1–10. <https://doi.org/10.1100/2012/471417>

- Ebel, B., Martin, F., Le, L. D. T., Gervais, P., & Cachon, R. (2011). Use of gases to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential in fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2185-2191. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3850>
- Fox, P. F. (Éd.). (2004). *Cheese : Chemistry, physics, and microbiology* (3rd ed). Elsevier.
- Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2006a). Indigenous enzymes in milk : Overview and historical aspects—Part 1. *International Dairy Journal*, 16(6), 500-516. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.013>
- Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2006b). Indigenous enzymes in milk : Overview and historical aspects—Part 2. *International Dairy Journal*, 16(6), 517-532. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.017>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., O'Mahony, J. A., & Fox, P. F. (2015). *Dairy chemistry and biochemistry* (2nd edition). Springer.
- França-Neto, J. de B., & Krzyzanowski, F. C. (2019). Tetrazolium : An important test for physiological seed quality evaluation. *Journal of Seed Science*, 41(3), 359-366. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3223104>
- Francis, M. B., Allen, C. A., & Sorg, J. A. (2015). Spore Cortex Hydrolysis Precedes Dipicolinic Acid Release during *Clostridium difficile* Spore Germination. *Journal of Bacteriology*, 197(14), 2276-2283. <https://doi.org/10.1128/JB.02575-14>
- Fu, H., Lin, M., Tang, I., Wang, J., & Yang, S. (2020). Effects of benzyl viologen on increasing NADH availability, acetate assimilation and butyric acid production by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnology and Bioengineering*, bit.27602. <https://doi.org/10.1002/bit.27602>
- Fu, H., Yu, L., Lin, M., et al (2017). Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production from glucose and xylose. *Metabolic of Engineering* 40, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.12.014>
- Galster, H. (1991). PH measurement. *VCH (Verlagsgesellschaft), New York*.
- Galster, H. (2000). Technique of measurement, electrode processes and electrode treatment. In *Redox* (p. 13-23). Springer.
- Garcia Costas, A.M., Poudel, S., Miller, A.-F., et al (2017). Defining electron bifurcation in the electron-transferring flavoprotein family. *Journal of Bacteriology* 199:e00440-17. <https://doi.org/10.1128/JB.00440-17>
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., & Nuñez, M. (2011). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect : Identification and characterization

- of isolates. *International Dairy Journal*, 21(4), 272-278. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.11.003>
- Garde, S., Ávila, M., Gómez, N., & Nuñez, M. (2013). *Clostridium* in late blowing defect of cheese : Detection, prevalence, effects and control strategies. In H. Castelli & L. du Vale (Éds.), *Handbook on Cheese : Production, Chemistry and Sensory Properties* (p. 503-518). New York: Nova Science Publishers.
- Garde, S., Calzada, J., Sánchez, C., Gaya, P., Narbad, A., Meijers, R., Mayer, M. J., & Ávila, M. (2020). Effect of *Lactococcus lactis* expressing phage endolysin on the late blowing defect of cheese caused by *Clostridium tyrobutyricum*. *International Journal of Food Microbiology*, 329, 108686. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108686>
- Gésan-Guiziu, G. (2010). Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques. In *Improving the Safety and Quality of Milk* (p. 349-372). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781845699420.4.349>
- Gómez-Torres, N., Dunne, M., Garde, S., Meijers, R., Narbad, A., Ávila, M., & Mayer, M. J. (2018). Development of a specific fluorescent phage endolysin for *in situ* detection of *Clostridium* species associated with cheese spoilage. *Microbial Biotechnology*, 11(2), 332-345. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12883>
- Gómez-Torres, N., Garde, S., Peirotén, Á., & Ávila, M. (2015). Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics : Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control*, 56, 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.025>
- Gottschalk, G. (1979). *Bacterial Metabolism*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-0465-4>
- Goudkov, A. V., & Sharpe, M. E. (1966). A preliminary investigation of the importance of clostridia in the production of rancid flavour in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research*, 33(02), 139. <https://doi.org/10.1017/S002202990001181X>
- Green, M. L., & Manning, D. J. (1982). Development of texture and flavour in cheese and other fermented products. *Journal of Dairy Research*, 49(4), 737-748. <https://doi.org/10.1017/S002202990002286X>
- Greenbank, G. R., & Wright, P. A. (1951). The Deaeration of Raw Whole Milk before Heat Treatment as a Factor in Retarding the Development of the Tallowy Flavor in its Dried Product. *Journal of Dairy Science*, 34(8), 815-818. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(51\)91786-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(51)91786-9)
- Grosch, W., & Wieser, H. (1999). Redox Reactions in Wheat Dough as Affected by Ascorbic Acid. *Journal of Cereal Science*, 29(1), 1-16. <https://doi.org/10.1006/jcrs.1998.0218>

- Hansen, E. B. (2018). Redox reactions in food fermentations. *Current Opinion in Food Science*, 19, 98-103. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.004>
- Hassan, H., St-Gelais, D., Gomaa, A., & Fliss, I. (2021). Impact of Nisin and Nisin-Producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* on *Clostridium tyrobutyricum* and Bacterial Ecosystem of Cheese Matrices. *Foods*, 10(4), 898. <https://doi.org/10.3390/foods10040898>
- Hu, L. Huang, H., Yuan, H., et al (2016). Rex in *Clostridium kluyveri* is a global redox-sensing transcriptional regulator. *Journal of Biotechnology* 233, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.06.024>
- Huchet, V., Thuault, D., & Bourgeois, C. M. (1995). Modélisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycérol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture. *Lait*, 75(6), 585-593.
- Huchet, V., Thuault, D., & Bourgeois, C. M. (1997). The stereoselectivity of the use of lactic acid by *Clostridium tyrobutyricum*. *Food microbiology*, 14(3), 227-230.
- Huggins, A. R., & Sandine, W. E. (1984). Differentiation of Fast and Slow Milk-Coagulating Isolates in Strains of Lactic Streptococci. *Journal of Dairy Science*, 67(8), 1674-1679. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81491-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81491-5)
- Jang, Y.-S., Im, J.A., Choi, S.Y., et al (2014). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for butyric acid production with high butyric acid selectivity. *Metabolic Engineering* 23, 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2014.03.004>
- Jang, Y.-S., Woo, H.M., Im, J.A., et al (2013). Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for enhanced production of butyric acid. *Applied Microbiology Biotechnology*, 97, 9355–9363. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5161-x>
- Janganan, T. K., Mullin, N., Tzokov, S. B., Stringer, S., Fagan, R. P., Hobbs, J. K., Moir, A., & Bullough, P. A. (2016). Characterization of the spore surface and exosporium proteins of *Clostridium sporogenes*; implications for *Clostridium botulinum* group I strains. *Food Microbiology*, 59, 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.003>
- Jiang L, Song P, Zhu L, et al (2013) Comparison of metabolic pathway for hydrogen production in wild-type and mutant *Clostridium tyrobutyricum* strain based on metabolic flux analysis. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38, 2176–2184. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.11.050>
- Jimeno, J., Lazaro, M. J., & Sollberger, H. (1995). Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*, 75(4-5), 401-413. <https://doi.org/10.1051/lait:19954-530>

- Jo, J.H., Jeon, C.O., Lee, S.Y., et al (2010). Molecular characterization and homologous overexpression of [FeFe]-hydrogenase in *Clostridium tyrobutyricum* JM1. *International Journal of Hydrogen Energy* 35, 1065–1073. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.102>
- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., & Madden, T. L. (2008). NCBI BLAST: A better web interface. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server), W5-W9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn201>
- Jonsson, A. (1990). Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, d-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. *Journal of Dairy Science*, 73(3), 719-725.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., & Morishima, K. (2017). KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D353-D361. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1092>
- Kieronczyk, A., Cachon, R., Feron, G., & Yvon, M. (2006). Addition of oxidizing or reducing agents to the reaction medium influences amino acid conversion to aroma compounds by *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1114-1122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02999.x>
- Kim, B. H., & Gadd, G. M. (2008). *Bacterial Physiology and Metabolism* (Vol. 1). www.cambridge.org/9780521846363
- Klijn, N., Nieuwenhof, F. F., Hoolwerf, J. D., Van Der Waals, C. B., & Weerkamp, A. H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2919-2924.
- Kobayashi, T., Mito, T., Watanabe, N., Suzuki, T., Shiraishi, A., & Ohashi, Y. (2012). Use of 5-Cyano-2,3-Ditoly-1-Tetrazolium Chloride Staining as an Indicator of Biocidal Activity in a Rapid Assay for Anti-Acanthamoeba Agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(5), 1606-1612. <https://doi.org/10.1128/JCM.06461-11>
- Korenekova, B., Kottferova, J., & Korenek, M. (2000). The fate of added nitrate used in the manufacture of Emmental cheese. *Food Additives and Contaminants*, 17(5), 373-377. <https://doi.org/10.1080/026520300404770>
- Kristoffersen, T. (1985). Development of flavor in cheese. *Milchwissenschaft*, 40(4), 197-199.
- Langeveld, L. P. M., & Galesloot, T. E. (1971). Estimation of the oxidation-reduction potential as an aid in tracing the cause of excessive openness in cheese. *Nederlands Melk- En*

- Larsen, N., Moslehi-Jenabian, S., Werner, B. B., Jensen, M. L., Garrigues, C., Vogensen, F. K., & Jespersen, L. (2016). Transcriptome analysis of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during milk acidification as affected by dissolved oxygen and the redox potential. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.03.002>
- Larsen, N., Werner, B. B., Vogensen, F. K., & Jespersen, L. (2015). Effect of dissolved oxygen on redox potential and milk acidification by lactic acid bacteria isolated from a DL-starter culture. *Journal of Dairy Science*, 98(3), 1640-1651. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8971>
- Lavilla, M., De Luis, R., Pérez, M. D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2009). Selection of high affine peptide ligands for detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores. *Journal of Microbiological Methods*, 79(2), 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.008>
- Lavilla, M., de Luis, R., Conesa, C., Pérez, M. D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2008). Production of polyclonal antibodies against spores of *Clostridium tyrobutyricum*, a contaminant affecting the quality of cheese : Characterisation of the immunodominant protein. *Food and Agricultural Immunology*, 19(1), 77-91. <https://doi.org/10.1080/09540100801956653>
- Lavilla, M., Marzo, I., de Luis, R., Perez, M. D., Calvo, M., & SÁñchez, L. (2010). Detection of *Clostridium tyrobutyricum* spores using polyclonal antibodies and flow cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 488-498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04435.x>
- Le Bourhis, A.-G., Doré, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., & Tholozan, J.-L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113(2), 154-163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.027>
- Le Bourhis, A.-G., Saunier, K., Dore, J., Carlier, J.-P., Chamba, J.-F., Popoff, M.-R., & Tholozan, J.-L. (2005). Development and Validation of PCR Primers To Assess the Diversity of *Clostridium* spp. In Cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 29-38. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.29-38.2005>

- Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Microbiological Spoilage of Dairy Products. In W. H. Sperber & M. P. Doyle (Éds.), *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages* (p. 41-67). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_2
- Ledon, H. J., & Ibarra, D. (2009). *Method for modifying hygienic, physico-chemical and sensory properties of cheese by controlling the redox potential* (United States Patent N° US20090214705A1). <https://patents.google.com/patent/US20090214705A1/en>
- Lee, J., Jang, Y.-S., Han, M.-J., et al (2016). Deciphering *Clostridium tyrobutyricum* metabolism based on the whole-Genome sequence and proteome analyses. *MBio* 7:e00743-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00743-16>
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., et al (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, 101, 209–228. <https://doi.org/10.1002/bit.22003>
- Leistner, L., & Mirna, A. (1959). Das redoxpotential von Pökellaken. *Die Fleischwirtschaft*, 8, 659-666.
- Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., et al (2008). Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. *Journal of Bacteriology* 190, 843–850. <https://doi.org/10.1128/JB.01417-07>
- Liu, C.-G., Xue, C., Lin, Y.-H., & Bai, F.-W. (2013). Redox potential control and applications in microaerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology Advances*, 31(2), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.005>
- Liu, J., Chan, S. H. J., Chen, J., Solem, C., & Jensen, P. R. (2019). Systems Biology – A Guide for Understanding and Developing Improved Strains of Lactic Acid Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10, 876. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00876>
- Liu, X., Zhu, Y., Yang, S.-T. (2006). Butyric acid and hydrogen production by *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 and mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 521–528. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.008>
- Luquet, F. M., Bonjean-Linczowski, Y., & Société scientifique d’hygiène alimentaire (France) (Éds.). (1985). *Laits et produits laitiers : Vache, brebis, chèvre*. Technique et documentation-Lavoisier : APRIA.
- Magnusson, M., Christiansson, A., Svensson, B., & Kolstrup, C. (2006). Effect of Different Premilking Manual Teat-Cleaning Methods on Bacterial Spores in Milk. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 3866-3875. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72429-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72429-8)

- Marshall, D. D., Sadykov, M. R., Thomas, V. C., Bayles, K. W., & Powers, R. (2016). Redox Imbalance Underlies the Fitness Defect Associated with Inactivation of the Pta-AckA Pathway in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Proteome Research*, *15*(4), 1205-1212. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b01089>
- Martin, F., Cachon, R., Pernin, K., De Coninck, J., Gervais, P., Guichard, E., & Cayot, N. (2011). Effect of oxidoreduction potential on aroma biosynthesis by lactic acid bacteria in nonfat yogurt. *Journal of Dairy Science*, *94*(2), 614-622. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3372>
- Martin, F., Cayot, N., Vergoignan, C., Journaux, L., Gervais, P., & Cachon, R. (2010). Impact of oxidoreduction potential and of gas bubbling on rheological properties of non-fat yoghurt. *Food Research International*, *43*(1), 218-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.032>
- Matsumoto, M., & Nishimura, Y. (2007). Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *103*(3), 236-241. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.236>
- Matteuzzi, D., Trovatielli, L. D., Biavati, B., & Zani, G. (1977). Clostridia from Grana Cheese. *Journal of Applied Bacteriology*, *43*(3), 375-382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1977.tb00763.x>
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*, *57*(2-3), 127-144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00147.x>
- McSweeney, P. L. H., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, *80*(3), 293-324. <https://doi.org/10.1051/lait:2000127>
- Medina de Figueroa, R., Alvarez, F., Pesce de Ruiz Holgado, A., Oliver, G., & Sesma, F. (2000). Citrate utilization by homo- and heterofermentative lactobacilli. *Microbiological Research*, *154*(4), 313-320. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80005-1](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80005-1)
- Melin, M., Wiktorsson, H., & Christiansson, A. (2002). Teat cleaning efficiency before milking in DeLaval VMSTM versus conventional manual cleaning, using *Clostridium tyrobutyricum* spores as marker. *First North American Conference on Robotic Milking, Toronto, Canada, 20-22 March, 2002*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20023108830>
- Michelon, D., Abraham, S., Ebel, B., De Coninck, J., Husson, F., Feron, G., Gervais, P., & Cachon, R. (2010). Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of

- Lactococcus lactis* : Thiol groups in the reducing activity of *L. lactis*. *FEBS Journal*, 277(10), 2282-2290. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07644.x>
- Michelon, D., Tachon, S., Ebel, B., De Coninck, J., Feron, G., Gervais, P., Yvon, M., & Cachon, R. (2013). Screening of lactic acid bacteria for reducing power using a tetrazolium salt reduction method on milk agar. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(2), 229-232. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.09.010>
- Michel-Savin, D., Marchal, R., & Vandecasteele, J.P. (1990). Butyrate production in continuous culture of *Clostridium tyrobutyricum*: effect of end-product inhibition. *Applied Microbiology Biotechnology*, 34(2), 172-177. <https://doi.org/10.1007/BF00176512>
- Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt n° 46 -2015. (2015). *Cahier des charges de la dénomination « Emmental de Savoie »*. <https://info.agriculture.gouv.fr/>.
- Moir, A., & Cooper, G. (2015). Spore Germination. *Microbiology Spectrum*, 3(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0014-2012>
- Morandi, S., Battelli, G., Silvetti, T., Tringali, S., Nunziata, L., Villa, A., Acquistapace, A., & Brasca, M. (2021). Impact of salting and ripening temperatures on late blowing defect in Valtellina Casera PDO cheese. *Food Control*, 120, 107508. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107508>
- Morandi, S., Silvetti, T., Tamburini, A., & Brasca, M. (2016). Changes in oxidation-reduction potential during milk fermentation by wild lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Research*, 83(03), 387-394. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000339>
- Moro, A., Librán, C. M., Berruga, M. I., Carmona, M., & Zalacain, A. (2015). Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), 1507-1513. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6853>
- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. (2018). Silage review : Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 3980-4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>
- Munier, E., Licandro-Séraut, H., Achilleos, C., et al (2019). Whole-genome sequencing and annotation of *Clostridium tyrobutyricum* strain CIRM BIA 2237, isolated from silage. *Microbiol Resource Announcements*, 8:e00492-19, /mra/8/30/MRA.00492-19.atom. <https://doi.org/10.1128/MRA.00492-19>
- Nickels, C., & Leesment, H. (1964). Method for the differentiation and qualitative determination of starter bacteria. *Milchwissenschaft*, 19, 374-378.

- Nogueira Viçosa, G., Vieira Botelho, C., Botta, C., Bertolino, M., Fernandes de Carvalho, A., Nero, L. A., & Cocolin, L. (2019). Impact of co-cultivation with *Enterococcus faecalis* over growth, enterotoxin production and gene expression of *Staphylococcus aureus* in broth and fresh cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 308, 108291. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108291>
- Nouaille, S., Rault, L., Jeanson, S., Loubière, P., Le Loir, Y., & Even, S. (2014). Contribution of *Lactococcus lactis* Reducing Properties to the Downregulation of a Major Virulence Regulator in *Staphylococcus aureus*, the *agr* System. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 7028-7035. <https://doi.org/10.1128/AEM.02287-14>
- Olguín-Araneda, V., Banawas, S., Sarker, M. R., & Paredes-Sabja, D. (2015). Recent advances in germination of *Clostridium* spores. *Research in Microbiology*, 166(4), 236-243. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.017>
- Orth, J. D., Thiele, I., & Palsson, B. Ø. (2010). What is flux balance analysis? *Nature Biotechnology*, 28(3), 245-248. <https://doi.org/10.1038/nbt.1614>
- Ouvry, A., Waché, Y., Tourdot-Maréchal, R., Diviès, C., & Cachon, R. (2002). Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters*, 214(2), 257-261. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)00886-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)00886-8)
- Paiano, P., Menini, M., Zeppilli, M., Majone, M., & Villano, M. (2019). Electro-fermentation and redox mediators enhance glucose conversion into butyric acid with mixed microbial cultures. *Bioelectrochemistry*, 107333. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.107333>
- Petitdemange, H., Cherrier, C., Raval, G., & Gay, R. (1976). Regulation of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductases in Clostridia of the butyric group. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 421(2), 334-347. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(76\)90300-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(76)90300-7)
- Petitdemange, H., Marczak, R., & Gay, R. (1979). NADH-flavodoxin oxidoreductase activity in *Clostridium tyrobutyricum*. *FEMS Microbiology Letters*, 5(4), 291-294. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1979.tb03323.x>
- Podrzaj, L., Burtscher, J., Küller, F., & Domig, K. J. (2020). Strain-Dependent Cheese Spoilage Potential of *Clostridium tyrobutyricum*. *Microorganisms*, 8(11), 1836. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111836>

- Qian, C., Martin, N. H., Wiedmann, M., & Trmčić, A. (2022). Development of a risk assessment model to predict the occurrence of late blowing defect in Gouda cheese and evaluate potential intervention strategies. *Journal of Dairy Science*, *105*(4), 2880-2894. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21206>
- Riondet C, Cachon R, Wache Y, et al (2000) Extracellular oxidoreduction potential modifies carbon and electron flow in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *182*, 620–626. <https://doi.org/10.1128/JB.182.3.620-626.2000>
- Rodriguez, G. G., Phipps, D., Ishiguro, K., & Ridgway, H.F. (1992). Use of a Fluorescent Redox Probe for Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria. *Applied and environmental Microbiology*, *58*(6), 1801-1808.
- 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*(2), 257-265. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90114-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90114-U)
- Roelof Van Der Meer, J., Ludwig, W., & De Vos, W. M. (1993). Characterization of a Ribosomal RNA Gene Cluster from *Clostridium tyrobutyricum*: Phylogenetic Positioning Based on the 16S and 23S Nucleotide Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, *16*(2), 201-207. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80468-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80468-6)
- Roussel, C., Ebel, B., Munier, E., Michelon, D., Martin-Dejardin, F., Beuvier, E., De Coninck, J., Gaudu, P., & Cachon, R. (2022). Green strategies to control redox potential in the fermented food industry. *Food Research International*, *156*, 111154. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111154>
- Roux, C., & Bergere, J. L. (1977). [Taxonomic characters of « *Clostridium tyrobutyricum* » (author's transl)]. *Annales de Microbiologie (Paris)*, *128A*(3), 267-276.
- Ruusunen, M., Surakka, A., Korkeala, H., & Lindström, M. (2012). *Clostridium tyrobutyricum* Strains Show Wide Variation in Growth at Different NaCl, pH, and Temperature Conditions. *Journal of Food Protection*, *75*(10), 1791-1795. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-109>
- Schreyer, A., Britten, M., Chapuzet, J.-M., Lessard, J., & Bazinet, L. (2008). Electrochemical modification of the redox potential of different milk products and its evolution during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(3), 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.07.001>
- Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Bruggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeyer, C., Thauer, R. K., & Gottschalk,

- G. (2008). The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2128-2133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711093105>
- Seeliger, S., Janssen, P. H., & Schink, B. (2002). Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acrylyl-CoA. *FEMS Microbiology Letters*, 211(1), 65-70. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11204.x>
- Setlow, P. (2019). Observations on research with spores of Bacillales and Clostridiales species. *Journal of Applied Microbiology*, 126(2), 348-358. <https://doi.org/10.1111/jam.14067>
- Sheehan, J. j. (2011). Avoidance of Gas Blowing. In: Fuquay JW, Fox PF and McSweeney PLH (eds.) *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, vol. 1, San Diego: Academic Press. pp.661-666.
- Silvetti, T., Morandi, S., & Brasca, M. (2018). Growth factors affecting gas production and reduction potential of vegetative cell and spore inocula of dairy-related *Clostridium* species. *LWT - Food Science and Technology*, 92, 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.014>
- Soto, R. I., Jiménez-Munguía, M. T., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2019). Growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495, *Lactobacillus casei* NRRL B-1922 and *Lactobacillus plantarum* NRRL B-4496 in milk supplemented with cysteine, ascorbic acid and tocopherols. *International Dairy Journal*, 97, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.003>
- Sridhar, J., & Eiteman, M. A. (1999). Influence of Redox Potential on Product Distribution in *Clostridium thermosuccinogenes*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 82(2), 91-102. <https://doi.org/10.1385/ABAB:82:2:91>
- Sridhar, J., & Eiteman, M. A. (2001). Metabolic Flux Analysis of *Clostridium thermosuccinogenes*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 94(1), 51-70. <https://doi.org/10.1385/ABAB:94:1:51>
- Storari, M., Kulli, S., Wüthrich, D., Bruggmann, R., Berthoud, H., & Arias-Roth, E. (2016). Genomic approach to studying nutritional requirements of *Clostridium tyrobutyricum* and other Clostridia causing late blowing defects. *Food Microbiology*, 59, 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.013>
- Su, Y.-C., & Ingham, S. C. (2000). Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. In Gouda cheese. *International journal of food microbiology*, 54(3), 147-154.

- Suo, Y., Fu, H., Ren, M., et al (2018a). Enhanced butyric acid production in *Clostridium tyrobutyricum* by overexpression of rate-limiting enzymes in the Embden-Meyerhof-Parnas pathway. *Journal of Biotechnology*, 272–273, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.012>
- Suo, Y., Liao, Z., Qu, C., et al (2019). Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production from undetoxified corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology*, 271, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.095>
- Suo, Y., Ren, M., Yang, X., et al (2018b). Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production with high butyrate/acetate ratio. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(10), 4511–4522. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8954-0>
- Tachon, S., Brandsma, J. B., & Yvon, M. (2010). NoxE NADH Oxidase and the Electron Transport Chain Are Responsible for the Ability of *Lactococcus lactis* To Decrease the Redox Potential of Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1311–1319. <https://doi.org/10.1128/AEM.02120-09>
- Thauer RK, Jungermann K, Henninger H, et al (1968). Energy metabolism of *Clostridium kluveri*. *European Journal of Biochemistry*, 4, 173–180. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1968.tb00189.x>
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 579–591. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1931>
- The UniProt Consortium. (2019). UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Thuault, D., Beliard, E., Le Guern, J., & Bourgeois, C.-M. (1991). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by Bacteriocin-Like Substances Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 74(4), 1145–1150. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78266-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78266-0)
- Thylin, I., Schuisky, P., Lindgren, S., & Gottschal, J. C. (1995). Influence of pH and lactic acid concentration on *Clostridium tyrobutyricum* during continuous growth in a pH-auxostat. *Journal of Applied Bacteriology*, 79(6), 663–670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb00952.x>
- Thylin, I. (2000). Methods of preventing growth of *Clostridium tyrobutyricum* and yeasts in silage. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae. Agraria (Sweden)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SE2000022134>

- Topcu, A., McKinnon, I., & McSweeney, P. L. H. (2008). Measurement of the Oxidation–Reduction Potential of cheddar Cheese. *Journal of Food Science*, 73(3), C198-C203. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00692.x>
- Touraille, C., & Bergère, J.-L. (1974). La germination de la spore de *Clostridium tyrobutyricum*. *Biochimie*, 56(3), 405-422. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(74\)80149-5](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(74)80149-5)
- Tsai, S. P., & Lee, Y. H. (1988). Application of metabolic pathway stoichiometry to statistical analysis of bioreactor measurement data. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(5), 713-715. <https://doi.org/10.1002/bit.260320517>
- Tsukatani, T., Suenaga, H., Higuchi, T., Akao, T., Ishiyama, M., Ezoe, K., & Matsumoto, K. (2008). Colorimetric cell proliferation assay for microorganisms in microtiter plate using water-soluble tetrazolium salts. *Journal of Microbiological Methods*, 75(1), 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.05.016>
- van Der Meer, J.R., Ludwig, W., & De Vos, W. M. (1993). Characterization of a Ribosomal RNA Gene Cluster from *Clostridium tyrobutyricum*: Phylogenetic Positioning Based on the 16S and 23S Nucleotide Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(2), 201-207. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80468-6](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80468-6)
- Velasco, R., Ordóñez, J. A., Cabeza, M. C., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2011). Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. *International Dairy Journal*, 21(7), 493-500. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.011>
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., & Lankveld, J. M. G. (2006). Improving Farm Management by Modeling the Contamination of Farm Tank Milk with Butyric Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*, 89(3), 850-858. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72148-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72148-8)
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., & Lankveld, J. M. G. (2007a). Concentrations of Butyric Acid Bacteria Spores in Silage and Relationships with Aerobic Deterioration. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 928-936. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71576-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71576-X)
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., & Lankveld, J. M. G. (2007b). Minimizing the Level of Butyric Acid Bacteria Spores in Farm Tank Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3278-3285. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-798>
- Wang, S., Huang, H., Moll, J., Thauer, R.K. (2010). NADP⁺ reduction with reduced ferredoxin and NADP⁺ reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*. *Journal of Bacteriology*, 192, 5115–5123. <https://doi.org/10.1128/JB.00612-10>

- Weghoff, M. C., Bertsch, J., & Müller, V. (2015). A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria : A novel mode of lactate metabolism in anaerobes. *Environmental Microbiology*, *17*(3), 670-677. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12493>
- Yoo, M., Croux, C., Meynial-Salles, I., & Soucaille, P. (2017). Metabolic flexibility of a butyrate pathway mutant of *Clostridium acetobutylicum*. *Metabolic Engineering*, *40*, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.01.011>
- Yu L, Zhao J, Xu M, et al (2015) Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production: effects of CoA transferase. *Applied Microbiology Biotechnology*, *99*, 4917–4930. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6566-5>
- Yu, M., Zhang, Y., Tang, I.-C., & Yang, S.-T. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production. *Metabolic Engineering*, *13*(4), 373-382. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2011.04.002>
- Zeng, K., & Zhang, D. (2010). Recent progress in alkaline water electrolysis for hydrogen production and applications. *Progress in Energy and Combustion Science*, *36*(3), 307-326. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2009.11.002>
- Zhang, Y., Yu, M., & Yang, S.-T. (2012). Effects of ptb knockout on butyric acid fermentation by *Clostridium tyrobutyricum*. *Biotechnology Progress*, *28*(1), 52-59. <https://doi.org/10.1002/btpr.730>
- Zhou, J.-J., Shen, J.-T., Wang, X.-L., Sun, Y.-Q., & Xiu, Z.-L. (2020). Metabolism, morphology and transcriptome analysis of oscillatory behavior of *Clostridium butyricum* during long-term continuous fermentation for 1,3-propanediol production. *Biotechnology for Biofuels*, *13*(1), 191. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01831-8>
- Zhu, Y., Liu, X., & Yang, S.-T. (2005). Construction and characterization of pta gene-deleted mutant of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *90*(2), 154-166. <https://doi.org/10.1002/bit.20354>
- Zhu Y, Yang S-T (2004) Effect of pH on metabolic pathway shift in fermentation of xylose by *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Biotechnology*, *110*, 143–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.02.006>
- Zucali, M., Bava, L., Colombini, S., Brasca, M., Decimo, M., Morandi, S., Tamburini, A., & Crovetto, G. M. (2015). Management practices and forage quality affecting the contamination of milk with anaerobic spore-forming bacteria : Management practices, forage quality and milk anaerobic spore contamination. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(6), 1294-1302. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6822>

Annexes

Annexe 1 : Résultats de l'ensemble de souches de bactéries lactiques avec le criblage ORCA

est sur milieu MTA + différents sels de triphényltétrazolium												
Travail sous PSM et dans le Bactron											Témoin +	
DO prélèvement	souche	Espèce	Répétition	BT		TTC		TV		Score	MTA + BP	MRS
				Air	N2	Air	N2	Air	N2		Air/N2	Air/N2
1,128	8F3	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,996			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,966			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,077	1F5	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,047			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,963			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,945/1,02	7F5	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,008/1,08			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,023/1,137			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,056/1,002	6F6	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,170/0,980			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,023/1,176			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,107/1,113	1F7	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,981/1,089			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,011/1,056			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,083/1,086	3F8	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,068/1,143			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,002/1,023			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,050	2F12	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,969			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,077			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,119	1F14	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,951			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,960			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,038	3F15	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,020			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,053			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,948	6F15	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,960			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,987			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,026	1F16	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,047			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,053			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,987	1F19	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,023			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,011			3	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
1,005	2F21	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,984			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,999			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,017	4F22	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,999			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,032			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,203	3F24	Lcl	1	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/0
1,134			2	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/0
1,104			3	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/0
1,065	6F25	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,128			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,098			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,254	2F26	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,215			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,149			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0

DO prélèvement	souche	Espèce	Répétition	BT		TTC		TV		Score	Témoïn +	
				Air	N2	Air	N2	Air	N2		Air/N2	MRS
1,200	6F29	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,107			2	1	1	1	1	1	1	63	1f/1f	1/0
1,242			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
0,990	1F30	Lcl	1	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/0
0,975			2	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/0
0,960			3	0	0	1	1	1	1	1	15	1/1
0,972	2F30	Lcl d	1	0	0	1	1	1	0	14	1/1	1/0
0,972			2	0	0	1	1	1	0	14	1/1	1/0
0,974			3	0	0	1	1	1	0	14	1/1	1/0
1,017	1F40	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,044			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,975			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
0,994	1F44	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,990			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,994			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
1,044	3F46	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	+/+ff	+/1ff
0,999			2	0	1	1	1	1	1	31	+/+ff	+/1ff
1,053			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+/+ff
0,993	13F52	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/0	1/0
1,059			2	0	1	1	1	1	1	31	+/+ff	1/1
1,104			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/0
1,029	3L23	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,113			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,011			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
1,023	2L19	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1f
1,026			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1f
1,119			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
0,981	8L30	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1f	1/0
1,113			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1f	1/0
0,990			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1f
0,993	4F31	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1f	1/1ff
1,098			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1f	1/1ff
1,053			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1f
1,090	8F42	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1f	1/0
1,095			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1f	1/0
1,032			3	1	1	1	1	1	1	1	63	1/1f
1,098	4F29	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,107			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,143			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
1,062	9F29	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,044			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,996			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
1,014	1L24	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,015			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,053			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
1,032	3F42	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,993			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,990			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1
1,068	4F9	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,972			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,002			3	0	1	1	1	1	1	1	31	1/1

DO prélèvement	souche	Espèce	Répétition	BT		TTC		TV		Score	Témoïn +	
				Air	N2	Air	N2	Air	N2		Air/N2	MRS
0,990	6F30	Lcl	1	0	1	0	1	0	1	21	1/0	1/1
0,996			2	0	1	0	1	0	1	21	1/0	1/1
1,047			3	0	1	0	1	0	1	21	1/0	1/0
0,972	4F33	Lcl	1	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
0,966			2	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
1,035			3	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
0,990	4F35	Lcl	1	0	1	0	1	0	1	21	1/0	1/1
0,969			2	0	1	0	1	0	1	21	1/0	1/1
1,038			3	0	1	0	1	0	1	21	1/0	1/1
0,999	3F37	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,997			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,978			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,179	2F51	Lcl	1	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
1,056			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,041			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,014	3L17	Lcl	1	0	1	1	1	0	1	29	1/1	1/1
1,110			2	0	1	1	1	0	1	29	1/1	1/1
1,014			3	0	1	1	1	0	1	29	1/1	1/1
1,263	1F37	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,176			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,155			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,996	5S6	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,945			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,951			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,012	1S21	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,132			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,041			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,993	1F21	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,038			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,999			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,999	16S3	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,011			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,032			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,023	8F8	Lcl	1	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
1,068			2	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
0,993			3	1	1	1	1	1	1	63	1/1	1/1
1,047	6F41	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,018			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,945			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,017	5F44	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,020			2	0	1	0	1	1	1	23	1/1	1/1
1,011			3	0	1	0	1	0	1	21	1/1	1/1
1,107	5S3	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1f
1,089			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1f
1,004			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1f
0,993	3L14	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,192			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,969			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,257	2S9	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,969			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,257			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0

DO prélèvement	souche	Espèce	Répétition	BT		TTC		TV		Score	Témoïn +	
				Air	N2	Air	N2	Air	N2		Air/N2	MRS
				Air/N2	Air/N2	Air/N2	Air/N2	Air/N2	Air/N2			
0,969	4L22	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1F	1/0
1,011			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1F	1/0
1,071			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1F	1/0
1,098	2F26	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,966			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,978			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,137	2F7	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/0	1/0
1,026			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,036			3	0	1	1	1	1	1	31	1/0	1/0
987	7F7	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,026			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,005			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,044/0,966	5F9	Lcl d	1	0	1	0	1	1	0	22	1/1	1/1
0,987/0,975			2	0	1	0	1	1	0	22	1/1	1/1
0,985/0,966			3	0	1	0	1	1	0	22	1/1	1/1
1,107/1,038	8F9	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,137/1,149			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,999/1,029			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,068	5F21	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,996			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,017			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,966	8F30	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,918			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,89			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,017	1F47	Lcl	1	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1f
0,999			2	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1f
0,948			3	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1f
?	11F49	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,017			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
?			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,029	6F52	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,020			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,020			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,984	5F33	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,071			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,990			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,993	11S3	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,963			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,107			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,062	1S10	Lc raffinos e	1	0	1	0	1	0	1	21	0/1	1f/1
1,074			2	0	1	0	1	0	1	21	0/1	1f/1
1,020			3	0	1	1	1	1	1	31	0/1	1f/1
1,026	4F6	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,030			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,029			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,017	1F9	Lcl	1	0	1	0	1	1	1	23	1/1	1/1
1,026			2	0	1	0	1	1	1	23	1/1	1/1
0,966			3	0	1	0	1	1	1	23	1/1	1/1
1,056	1F24	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,056			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,089			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1

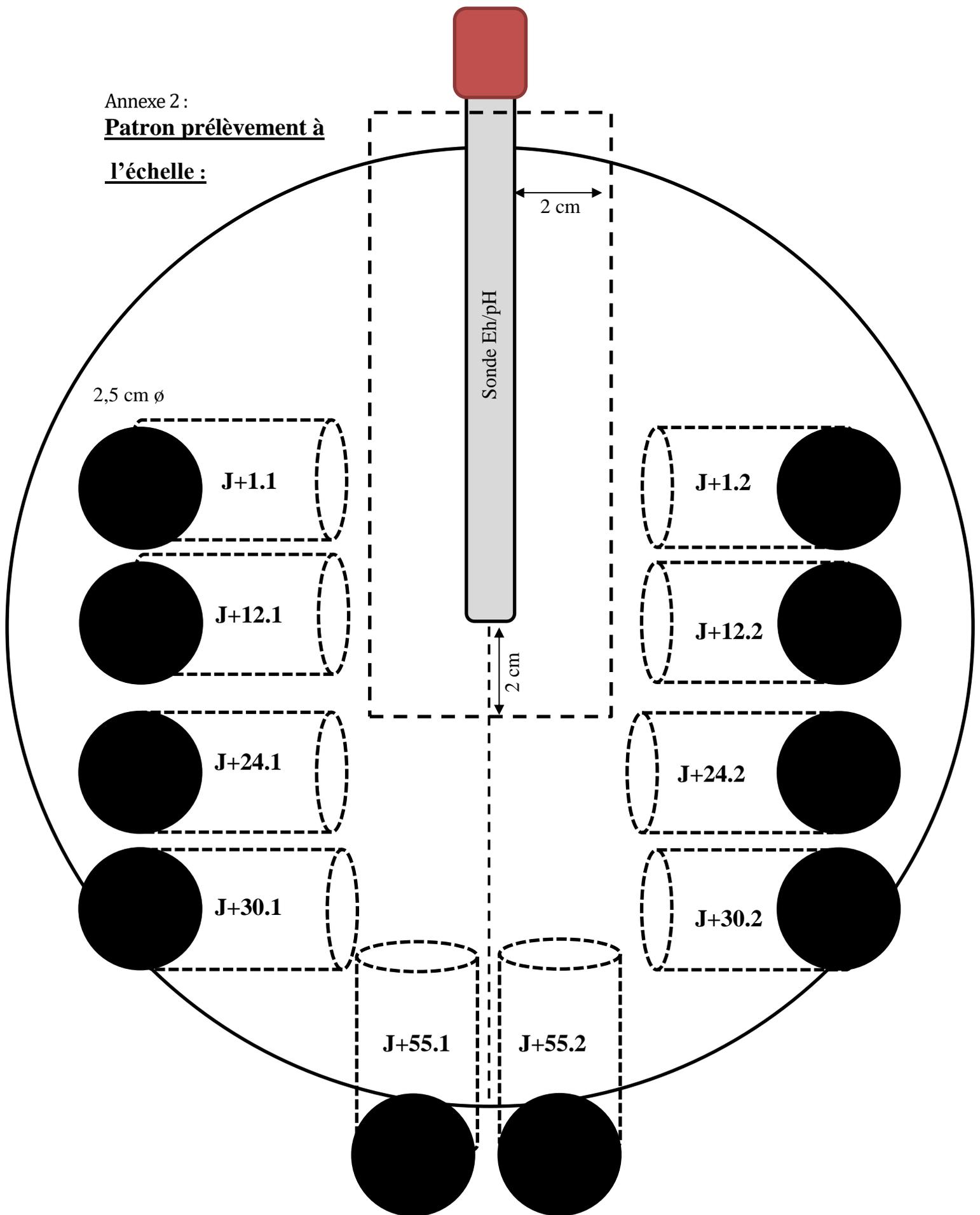
DO prélèvement	souche	Espèce	Répétition	BT		TTC		TV		Score	Témoign +	
				Air	N2	Air	N2	Air	N2		Air/N2	MRS
				Air/N2	Air/N2	Air/N2	Air/N2	Air/N2	Air/N2			
1,041	2F5	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,008			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,051			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,101	3F16	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,113			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,987			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,014	2F19	Lcl d	1	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
0,960			2	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
1,107			3	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
1,146	1L10	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,017			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,119			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,056	1L25	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,966			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,015			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,960	8L32	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,029			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,984			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,029	1S6	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,053			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,026			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,080	2S10	Lcl d	1	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
1,134			2	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
1,116			3	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
1,125	3S10	Lcl d	1	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
0,990			2	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
1,002			3	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
0,993	7S25	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,068			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,004			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,005	1S24	Lcl	1	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
1,035			2	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
0,99			3	0	0	1	1	1	1	15	1/1	1/1
0,999	2S24	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,978			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
-			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,029	1F1	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,038			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,089			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
0,996	2F1	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,044			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,993			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,191	7F1	Lcl d	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,143			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,122			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/1
1,023	2F2	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,083			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,987			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,978	7F2	Lcl	1	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
1,047			2	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0
0,981			3	0	1	1	1	1	1	31	1/1	1/0

DO prélèvement	souche	Espèce	Répétition							Témoign +					
				BT		TTC		TV		Score	MTA + BP		MRS		
				Air	N2	Air	N2	Air	N2		Air	N2	Air	N2	
0,992	10S3	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	-	-	+	
0,980			2	1	1	1	1	1	0	62	+	-	-	+	
0,990			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	-	-	+
1,038	1S4	<i>L. casei</i>	1	1	0	1	0	1	1	43	+	-	+	+	
1,086			2	1	0	1	0	1	1	43	+	-	+	+	
1,122			3	1	0	1	0	1	1	1	43	+	-	+	+
1,060	3S4	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,004			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,104			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
1,016	1F10	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,920			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,188			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
1,000	3F10	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,116			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,080			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
0,968	2L2	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,968			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,960			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
?	3L30	<i>L. casei</i>	1	1	0	1	1	1	1	47	+	+	+	+	
?			2	1	0	1	1	1	1	47	+	+	+	+	
?			3	1	0	1	1	1	1	1	47	+	+	+	+
1,032	3F20	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,064			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,944			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
	1F31	<i>L. casei</i>	1							0					
			2								0				
			3								0				
1,056	5F31	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	-	-	+	-	
0,992			2	1	1	1	1	1	1	63	-	-	+	-	
1,040			3	1	1	1	1	1	1	1	63	-	-	+	-
0,980	1F36	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,976			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,100			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
1,040	4F43	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,992			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,024			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
	6F43	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	-	
			2	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	-
			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	-
1,004	3F45	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,960			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,940			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
1,104	5F45	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,024			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,948			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
0,904	6L25	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
1,012			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	
0,996			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+
0,948	1F20	<i>L. casei</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	-	+	+	
0,984			2	1	1	1	1	1	1	63	+	-	+	+	
0,928			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	-	+	+

DO	souche	Espèce	Répétition	BT		TTC		TV		Score	Témoïn +				Citrate dil au 1/1000	Bactétiocine
				Air*	N2	Air	N2	Air	N2		MTA + BP		MRS			
											Air	N2	Air	N2		
1,100	F9 5 2	<i>L. rhamnosus</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
0,916			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
0,932			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
1,024	F9 5 27	<i>L. rhamnosus</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-	
0,928			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-	
1,112			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-
1,040	F9 5 60	<i>L. rhamnosus</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-	
0,980			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-	
1,004			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-
1,092	F10 2 63	<i>L. rhamnosus</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
0,952			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
0,916			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
0,952	F10 7 64	<i>L. rhamnosus</i>	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-	
1,012			2	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-	
1,096			3	1	1	1	1	1	1	1	63	+	+	+	+	-
0,952	F9 2 68	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,036			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
0,980			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
1,112	F9 2 52	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,056			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,132			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
1,000	F9 1 53	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,000			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,044			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
0,992	F9 5 70	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,072			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
0,956			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
1,100	F9 10 69	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,052			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,068			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
0,968	F10 3 59	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,068			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,084			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
1,028	F10 5 60	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,096			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
0,960			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
0,976	F10 7 55	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	+
1,126			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	+
1,028			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
1,112	F10 11 57	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,092			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,044			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-
0,988	F10 11 55	<i>L. paracasei</i>	1	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,048			2	0	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-	
1,024			3	0	1	1	1	1	1	1	31	+	+	+	+	-

Annexe 2 :
Patron prélèvement à

l'échelle :



Annexe 3 : Planning de décalage entre les cuves au cours d'une fabrication Emmental

N°fabrication	i	ii	iii	vi
N°cuve	Cuve 1	Cuve 2	Cuve 3	Cuve 4
Modalité	A	B	C	Témoin
07:00	Maturation			Maturation
07:05				
07:10				
07:15				
07:20				
07:25				
07:30		Maturation		
07:35				
07:40				
07:45				
07:50			Maturation	
07:55				
08:00	Coag			Coag
08:05				
08:10				
08:15				
08:20				
08:25				
08:30		Coag		
08:35				
08:40				
08:45	Décaillage			Décaillage
08:50	Brassage			Brassage
08:55				
09:00	Dé lactos			Dé lactos
09:05	Chauff			Chauff
09:10	Chauff			Chauff
09:15	Chauff	Décaillage		Chauff
09:20	Chauff	Brassage		Chauff
09:25	Chauff			Chauff
09:30	Chauff	Dé lactos		Chauff
09:35	Brassage	Chauff	Décaillage	Brassage
09:40		Chauff	Brassage	
09:45		Chauff		
09:50		Chauff	Dé lactos	
09:55		Chauff	Chauff	
10:00		Chauff	Chauff	
10:05	Soutirage	Brassage	Chauff	Soutirage
10:10			Chauff	
10:15	Press1		Chauff	Press1
10:20			Chauff	
10:25			Brassage	
10:30				
10:35		Soutirage		
10:40	Press 2	Press1		Press 2
10:45				
10:50			Soutirage	
10:55				
11:00			Press1	
11:05				
11:10		Press 2		
11:15				
11:20			Press 2	
11:25				
11:30				
11:35				
11:40				
11:45				
11:50				
11:55				
12:00				
12:05				
12:10				
12:15				
12:20		C5		
12:25				
12:30				
12:35				
12:40				
12:45				
12:50				
12:55				
13:00				
13:05			C5	
13:10				
13:15				
13:20				
13:25				
13:30				

Annexe 4: Résultats des acides organiques dosés au cours de l'affinage.

Acides organiques & Jour d'affinage	Modalités								
	LCL		LCR		LCR+LBR		LCR+LBI		T-
Lactate (g.kg-1)	J+1	9,49 ± 0,17 ^{ab}	9,33 ± 0,07 ^{ab}	9,65 ± 0,18 ^a	9,34 ± 0,24 ^{ab}	9,08 ± 0,15 ^b	9,34 ± 0,02 ^{ab}	9,08 ± 0,15 ^b	9,34 ± 0,02 ^{ab}
	J+12	9,47 ± 0,38 ^a	9,32 ± 0,43 ^a	9,73 ± 0,16 ^a	9,47 ± 0,27 ^a	9,06 ± 0,28 ^a	9,32 ± 0,38 ^a	9,06 ± 0,28 ^a	9,32 ± 0,38 ^a
	J+24	8,30 ± 1,22 ^a	8,09 ± 0,77 ^a	9,51 ± 0,34 ^a	8,46 ± 0,22 ^a	8,66 ± 0,61 ^a	8,25 ± 0,60 ^a	8,30 ± 1,22 ^a	8,25 ± 0,60 ^a
	J+31	3,11 ± 2,02 ^b	2,81 ± 1,13 ^b	8,00 ± 0,85 ^a	2,66 ± 1,60 ^b	5,61 ± 0,25 ^{ab}	2,67 ± 2,24 ^b	3,11 ± 2,02 ^b	2,67 ± 2,24 ^b
	J+55	0,86 ± 0,09 ^a	0,85 ± 0,09 ^a	0,82 ± 0,16 ^a	0,81 ± 0,05 ^a	1,05 ± 0,72 ^a	0,91 ± 0,04 ^a	0,86 ± 0,09 ^a	0,91 ± 0,04 ^a
Acétate (g.kg-1)	J+1	0,37 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,01 ^b	0,77 ± 0,09 ^a	0,36 ± 0,02 ^b	0,38 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,02 ^b	0,37 ± 0,01 ^b	0,37 ± 0,02 ^b
	J+12	0,42 ± 0,03 ^c	0,41 ± 0,02 ^c	1,18 ± 0,00 ^a	0,46 ± 0,02 ^b	0,45 ± 0,02 ^{bc}	0,43 ± 0,01 ^{bc}	0,42 ± 0,03 ^c	0,43 ± 0,01 ^{bc}
	J+24	0,62 ± 0,06 ^b	0,57 ± 0,05 ^b	1,22 ± 0,05 ^a	0,71 ± 0,07 ^b	0,60 ± 0,05 ^b	0,65 ± 0,16 ^b	0,62 ± 0,06 ^b	0,65 ± 0,16 ^b
	J+31	1,23 ± 0,31 ^a	1,15 ± 0,19 ^a	1,19 ± 0,20 ^a	1,39 ± 0,09 ^a	1,28 ± 0,05 ^a	1,31 ± 0,28 ^a	1,23 ± 0,31 ^a	1,31 ± 0,28 ^a
	J+55	2,58 ± 0,39 ^a	2,53 ± 0,35 ^a	2,29 ± 0,40 ^a	2,71 ± 0,27 ^a	3,20 ± 0,14 ^a	2,62 ± 0,52 ^a	2,58 ± 0,39 ^a	2,62 ± 0,52 ^a
Butyrate (g.kg-1)	J+1	0,25 ± 0,00 ^a	0,29 ± 0,03 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,01 ^a
	J+12	0,28 ± 0,03 ^a	0,27 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,01 ^a	0,28 ± 0,02 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,03 ^a	0,27 ± 0,02 ^a
	J+24	0,57 ± 0,15 ^{ab}	0,58 ± 0,05 ^{ab}	0,45 ± 0,07 ^{bc}	0,63 ± 0,13 ^a	0,35 ± 0,00 ^b	0,54 ± 0,08 ^{ab}	0,57 ± 0,15 ^{ab}	0,54 ± 0,08 ^{ab}
	J+31	1,40 ± 0,18 ^{ab}	1,52 ± 0,19 ^{ab}	0,95 ± 0,03 ^{bc}	2,15 ± 0,54 ^a	0,42 ± 0,02 ^c	1,55 ± 0,33 ^{ab}	1,40 ± 0,18 ^{ab}	1,55 ± 0,33 ^{ab}
	J+55	2,54 ± 0,32 ^{bc}	2,46 ± 0,03 ^c	3,32 ± 0,22 ^a	3,02 ± 0,21 ^{ab}	0,84 ± 0,02 ^d	2,60 ± 0,23 ^{bc}	2,54 ± 0,32 ^{bc}	2,60 ± 0,23 ^{bc}
Propionate (g.kg-1)	J+1	0,21 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,00 ^a	0,21 ± 0,01 ^a	0,21 ± 0,00 ^a
	J+12	0,26 ± 0,02 ^a	0,27 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,01 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,03 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,03 ^a
	J+24	0,62 ± 0,22 ^a	0,59 ± 0,11 ^a	0,31 ± 0,00 ^a	0,46 ± 0,03 ^a	0,46 ± 0,03 ^a	0,57 ± 0,15 ^a	0,62 ± 0,22 ^a	0,57 ± 0,15 ^a
	J+31	2,33 ± 0,90 ^a	2,27 ± 0,52 ^a	0,55 ± 0,36 ^b	1,90 ± 0,41 ^{ab}	1,67 ± 0,33 ^{ab}	2,39 ± 0,98 ^a	2,33 ± 0,90 ^a	2,39 ± 0,98 ^a
	J+55	4,25 ± 0,37 ^b	4,32 ± 0,25 ^b	3,66 ± 0,17 ^b	3,97 ± 0,19 ^b	5,22 ± 0,49 ^a	4,23 ± 0,21 ^b	4,25 ± 0,37 ^b	4,23 ± 0,21 ^b
Citrate (g.kg-1)	J+1	1,17 ± 0,03 ^a	1,18 ± 0,02 ^a	0,55 ± 0,10 ^b	1,14 ± 0,02 ^a	1,11 ± 0,04 ^a	1,15 ± 0,04 ^a	1,17 ± 0,03 ^a	1,15 ± 0,04 ^a
	J+12	1,26 ± 0,04 ^a	1,25 ± 0,08 ^a	0,20 ± 0,00 ^c	1,10 ± 0,00 ^b	1,20 ± 0,06 ^{ab}	1,26 ± 0,06 ^a	1,26 ± 0,04 ^a	1,26 ± 0,06 ^a
	J+24	1,31 ± 0,05 ^a	1,27 ± 0,08 ^a	0,23 ± 0,01 ^c	0,87 ± 0,09 ^b	1,24 ± 0,06 ^a	1,21 ± 0,18 ^a	1,31 ± 0,05 ^a	1,21 ± 0,18 ^a
	J+31	1,34 ± 0,05 ^a	1,29 ± 0,08 ^a	0,28 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,04 ^b	1,28 ± 0,08 ^a	1,16 ± 0,34 ^a	1,34 ± 0,05 ^a	1,16 ± 0,34 ^a
	J+55	1,70 ± 0,09 ^a	1,68 ± 0,09 ^a	0,61 ± 0,01 ^b	0,55 ± 0,03 ^b	1,57 ± 0,11 ^a	1,38 ± 0,59 ^a	1,70 ± 0,09 ^a	1,38 ± 0,59 ^a

Annexe 5 : Résultats BLAST entre génomes de *C. tyrobutyricum* CIRM BIA 2237 et de différents gènes codant pour des protéines retrouvées dans les différentes couches d'une spore

Blast Germination								
Classe	Type Blast	Gènes	Protéines	Références	Fonction	Espèces	Query cover	<i>C. tyrobutyricum</i>
Cortex								
	Blastn/Blastp	pdaA	PdaA	936136	polysaccharide deacetylase PdaA (synthétise les MAL du cortex)	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	40%/ 84%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
Protéine immunitaire								
	Blastn	sdpI	SdpI	936238	immunity protéine	B. subtilis strain 168	51%	KCTC 5387
CLEs								
	Blastn/Blastp	htrC	YyxA	937779	sérine protéase (régule YpeB)	B. subtilis strain 168	8%/ 92%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	ypeB	YpeB	938981	sporulation protein YpeB (inhibiteur de SleB)	B. subtilis strain 168	25%/ 98%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn	sleB	SleB	938979	spore cortex-lytic enzyme	B. subtilis strain 168	31%	KCTC 5387
	Blastp	CAC_C0686	spore-SleB (Domain SleB)	NP_347323.1	spore cortex-lytic protein	C. acetobutylicum ATCC 824	97%	KCTC 5387
	Blastn		YpmB (TseB)	939035	hypothetical protein (semble avoir une fonction protéase inhibiteur)	B. subtilis strain 168	34%	KCTC 5387
	Blastn	tepA	YmfB (TepA)	936370	translocation-enhancing protein elle est active pendant la sporulation et est conservé dans la spore jusqu'à germination dégradation des SASPs	B. subtilis strain 168	60%/95%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	cwI	CwI	938399	spore cortex-lytic enzyme localisée sur la surface externe du cortex de la spore	B. subtilis strain 168	5%/86%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	ywdL	GerQ	937241	spore coat protéin, protéase inhibitrice protéine de CwI	B. subtilis strain 168	27%/ -	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn	CPF_RS01860	SleM	29572506	autolytic lysozyme, dégrade les muropeptides générés par SleC pendant la germination	Clostridium perfringens ATCC 13124	57%	KCTC 5387
	Blastn/Blastp	sleC	SleC	NC_009089.1	spore cortex-lytic protein	Clostridioides difficile 630	50%/ pas d'indentique protéine	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum

Blast Germination								
Classe	Type Blast	Gènes	Protéines	Références	Fonction	Espèces	Query cover	<i>C. tyrobutyricum</i>
IM protéine								
	Blastn/Blastp	gerA	GerAA	935953	gerAA spore germination protein A1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	23%/86%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerA	GerAB	935948	gerAB spore germination protein A2	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	41%/83%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerA	GerAC	935951	gerAC spore germination protein A3	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	30%/ 93%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerB	GerBA	936814	gerBA spore germination protein B1	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	16%/99%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerB	GerBB	936827	gerBB spore germination protein B2	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	39%/86%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerB	GerBC	936819	gerBC spore germination protein B3	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	34%/97%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerK	GerKA	1119482	gerKA spore germination protein GerKA	Clostridium acetobutylicum ATCC 824	74%/94%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerK	GerKB	1119483	gerKB spore germination protein GerKB	Clostridium acetobutylicum ATCC 824	66%/100%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerK	GerKC	1119484	gerKC spore germination protein GerKC	Clostridium acetobutylicum ATCC 824	47%/98%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	spoVA	SpoVAA	938734	spoVAA stage V sporulation protein AA	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	26%/-	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	spoVA	SpoVAB	938933	spoVAB stage V sporulation protein AB	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	21%/-	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	spoVA	SpoVAC	938733	spoVAC stage V sporulation protein AC	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	80%/98%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	spoVA	SpoVAD	938932	spoVAD stage V sporulation protein AD	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	57%/97%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	spoVA	SpoVAEa	8303022	spoVAEA stage V sporulation protein AE	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	6%/-	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	spoVA	SpoVAEb	8303020	spoVAEB stage V sporulation protein AEB	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	36%/99%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	spoVA	SpoVAF	938936	spoVAF stage V sporulation protein AF	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	6%/98%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerP	GerPA	936348	spore germination protein GerPA	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	30%/28%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerP	GerPB	939781	spore germination protein GerPB	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	37%/-	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerP	GerPC	939327	spore germination protein GerPC	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	31%/ 14%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerP	GerPD	936349	spore germination protein GerPD	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	29%/-	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerP	GerPE	939782	spore germination protein GerPE	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	16%/-	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerP	GerPF	939326	spore germination protein GerPF	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	39%/-	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerF	GerF	14272207	spore germination protein GerF	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	25%/ 90%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	lipC	LipC	938249	spore germination (phospho)lipase LipC (influence sur la quantité d'AG de la spore)	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	16%/ 20%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum

Blast Germination								
Classe	Type Blast	Gènes	Protéines	Références	Fonction	Espèces	Query cover	<i>C. tyrobutyricum</i>
Coat spore								
	Blastn/Blastp	gerE	GerE	937462	spore germination protein GerE	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	36% / -	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	gerT	GerT	2914248	spore germination protein GerT	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	33% / -	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	cotB	CotB	936870	spore coat protein B	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	26% / -	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	cotE	CotE	939508	spore coat protein E	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	41% / 37%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	cotH	CotH	936858	inner spore coat protein H	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	21% / 19%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	cotG	CotG	936865	spore coat protein G	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	21% / -	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
	Blastn/Blastp	yhzE	SscA	8303205	permet l'assemblage des protéines des couches externes de la spores	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	65% / 89%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum
Exosporium								
	Blastp	-	CsxA		Exosporium protéin A	Clostridium sporogenes ATCC 15579	87%	Espèce C. tyrobutyricum
	Blastp	-	CsxB		Exosporium protéin B	Clostridium sporogenes ATCC 15579	-	Espèce C. tyrobutyricum
	Blastp	-	BlcA		Collagen like repeat protein	Bacillus anthracis strain Amers	77%	Espèce C. tyrobutyricum
	Blastp	-	BlcB		Collagen like repeat protein	Bacillus anthracis strain Amers	77%	Espèce C. tyrobutyricum
Autres								
	Blastn/Blastp	lipC	lipC	938249	spore germination lipase LipC (permet la présence des ger(X) C et gerD prelipoprotéines)	Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168	16% / 20%	KCTC 5387/ Espese C. tyrobutyricum

	<i>C. tyrobutyricum</i> CRM BIA 2237					Bio-informatique complémentaire					
	Gène	Nom	Fonction	Taille (pb)	Cluster	Espèce comparaison	Gène/Protéine	Nom	Fonction	Blast	Query cover (%)
Sporulation											
SigV	gene_00019	sigV	RNA Polymerase	182	-	<i>B. subtilis</i> str 128	SigV	RNA polymerase sigma factor SigV	Sigma factors	Uniprot	-
SigE ou sigF	gene_00124	sigE_1	RNA Polymerase	193	-	-	-	-	-	-	-
SigG	gene_00326	sigF_1	Sigma factors	257	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79662,1	sigG	Sigma factors	n	99
SigE	gene_00327	sigE_2	Sigma factors	235	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79661,1	sigE	Sigma factors	n	97
sigK	gene_00333	sigK	Sigma factors	235	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79655,1	sigK	Sigma factors	n	86
spoIM	gene_00378	spoIM	stage II sporulation protein m	275	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80027,1	CA_C2068	spoIM,	n	79
Spo0A	gene_00381	spo0A	Sporulation	291	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80030,1	CA_C2071	Spo0A	n	98
spoIVB	gene_00382	spoIVB	Stage IV sporulation protein B	397	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80031,1	CA_C2072	SpoIVB	n	88
SpoIIAH	gene_00393	gene_00393	stage III sporulation protein AH	176	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80045,1	CA_C2086	Stage III sporulation protein AH, SpoIIAH	n	84
SpoIIAG	gene_00394	gene_00394	stage iii sporulation protein ag	208	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80046,1	CA_C2087	SpoIIAG	n	71
SpoIIAF	gene_00395	gene_00395	Stage III sporulation protein af	194	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80047,1	CA_C2088	soIIAF	n	83
SpoIIAE	gene_00396	spoIIAE	stage III sporulation protein ae	407	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80048,1	CA_C2089	spoIIAE	n	90
SpoIIAD	gene_00397	gene_00397	Stage iii sporulation protein ad	128	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80049,1	CA_C2090	Stage III sporulation protein AD, spoIIAD	n	95
SpoIIAC	gene_00398	gene_00398	Stage III sporulation protein AC	65	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80050,1	CA_C2091	spoIIAC	n	93
SpoIIAB	gene_00399	gene_00399	Stage iii sporulation protein	164	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80051,1	CA_C2092	SpoIIAB	n	89
SpoIIAA	gene_00400	gene_00400	stage iii sporulation protein aa	308	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80052,1	CA_C2093	spoIIAA	n	93
spoVD	gene_00437	spoVD_2	penicillin-binding protein	730	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80088,1	spoVD	Stage V sporulation protein D	n	87
sigD	gene_00450	sigD	Sigma factors are initiation factors that promote the attachment of RNA polymerase to specific initiation sites and are then released (By similarity)	242	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80101,1	sigD	Sigma factor of SigD/WhiG family	n	93
YtxC	gene_00722	gene_00722	sporulation protein YtxC	288	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80319,1	CA_C2363	YtxC	n	81
YTFJ	gene_00816	gene_00816	Sporulation protein YtfJ (Spore_YtfJ)	126	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81198,1	CA_C3264	YTFJ <i>B. subtilis</i> ortholog	n	95
Spo0E	gene_01038	gene_01038	Spo0E like sporulation regulatory protein	58	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	-	-	-	n	77
spoIVA	gene_01108	spoIVA	ATPase. Has a role at an early stage in the morphogenesis of the spore coat (By similarity)	492	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79679,1	CA_C1713	Coat protein spoIVA	n	99
YLBj	gene_01132	ybj	Sporulation integral membrane protein Ybj	389	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79706,1	CA_C1740	YLBj <i>B. subtilis</i> ortholog	n	88
YLMC	gene_01187	gene_01187	Sporulation protein, YlnC YmxH	90	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79774,1	CA_C1809	Uncharacterized conserved protein, YLMC <i>B. subtilis</i> ortholog	n	97
spoIII	gene_01190	spoIII	cell division protein FtsK	757	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79777,1	CA_C1812	Sporulation protein spoIII	n	86
spoVS	gene_01195	spoVS	stage V sporulation protein S	86	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79782,1	CA_C1817	Stage V sporulation protein, spoVS	n	100

	<i>C. tyrobutyricum</i> CIRM BIA 2237					Bio-informatique complémentaire					
	Gène	Nom	Fonction	Taille (pb)	Cluster	Espèce comparaison	Gene/Protéine	Nom	Fonction	Blast	Query cover (%)
Sporulation											
YTFJ ?	gene_01277	ytJ	sporulation protein ytfj	143	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80018,1	CA_C2059	Uncharacterized protein, YTFJ <i>Bacillus subtilis</i> ortholog	n	98
yvcL = whiA	gene_01440	whiA	May be required for sporulation (By similarity)	317	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK78493,1	CA_C0513	similar to <i>B. subtilis</i> yvcL	n	100
SigF	gene_01636	sigF_3	Sigma factors	251	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80262,1	CA_C2306	sigma factor F	n	98
spoIIAB	gene_01637	spoIIAB	Binds to sigma F a	142	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80263,1	CA_C2307	Sigma factor F inhibitor spoIIAB	n	99
spoIIAA	gene_01638	spoIIAA	stage II sporulation protein	111	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80264,1	spoIIAA	Anti-sigma factor (antagonist of spoIIAB)	n	89
spoVAC	gene_01743	gene_01743	Stage v sporulation protein ac	159	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80261,1	SpoVAC	Stage V sporulation AC, spoVAC	n	85
spoVAD	gene_01744	spoVAD	stage V sporulation protein ad	333	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80260,1	SpoVAD	Stage V sporulation AD, SpoVAD	n	83
spoVAE	gene_01745	gene_01745	Stage v sporulation protein ae	117	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	-	-	-	n	87
sigH	gene_01879	sigH	RNA polymerase	213	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81089,1	CA_C3152	Sigma factor	n	90
SpoOE	gene_01970	gene_01970	SpoOE like sporulation regulatory protein	55	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	-	-	-	n	97
spoIIP	gene_02025	gene_02025	stage ii sporulation protein p	355	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79247,1	spoIIP	Stage II sporulation protein P	n	90
YABG	gene_02241	yabG	sporulation peptidase YabG	294	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80847,1	CA_C2905	YABG B. <i>subtilis</i> ortholog	n	85
spoIIR	gene_02249	gene_02249	stage ii sporulation protein r	237	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80840,1	spoIIR	Stage II sporulation protein R	n	75
spoIID	gene_02284	spoIID	Sporulation transcriptional regulator spoIID	84	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80802,1	spoIID	Stage III sporulation protein D, SpoIID	n	100
YYAC	gene_02286	gene_02286	Sporulation protein YyaC	180	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80800,1	CA_C2857	YYAC B. <i>subtilis</i> ortholog	n	91
ytvi	gene_02326		Sporulation integral membrane protein ytvi	351	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	-	-	-	n	71
YYAC	gene_02327	gene_02327	Sporulation protein YyaC	197	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81647,1	CA_C3727	Uncharacterized protein, YYAC B. <i>subtilis</i> homolog	n	78
spoIVFB	gene_02355	spoIVFB	Peptidase M50	282	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79224,1	CA_C1253	Sporulation protein IVFB	n	99
YqfC	gene_02387	gene_02387	sporulation protein YqfC	93	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	-	-	-	n	80
YQFD ?	gene_02388	gene_02388	sporulation protein yqfD	395	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79262,1	CA_C1291	related spoIV gene product	n	71
sigA	gene_02400	sigA	Sigma factors are initiation factors that promote the attachment of RNA polymerase to specific initiation sites and are then released (By similarity)	354	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK79271,1	sigA	RNA polymerase factor RPOD	n	99
spoVG	gene_02420	spoVG	Could be involved in septation (By similarity)	95	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81159,1	spoVG	Stage V sporulation protein G	n	99
spoVT (AbrB)	gene_02429	spoVT	stage v sporulation protein t	181	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81150,1	CA_C3214	Stage V sporulation protein T	n	100
spoVB	gene_02430	spoVB_1	Polysaccharide Biosynthesis Protein	511	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81149,1	CA_C3213	Possible stage V sporulation protein B	n	91
yabP	gene_02434	yabP	sporulation protein yabp	96	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81145,1	CA_C3209	YABP B. <i>subtilis</i>	n	93
spoIIE	gene_02443	spoIIE	stage ii sporulation protein e	795	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK81141,1	spoIIE	Stage II sporulation protein E	n	92
spoVD	gene_02482	spoVD_3	penicillin-binding protein	577	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK80088,1	spoVD	Stage V protein D, spoVD.	n	93
spoVB	gene_02645	spoVB_2	Polysaccharide Biosynthesis Protein	533	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK78992,1	CA_C1016	SpoVB related membrane protein	n	90
spoVB	gene_02646	spoVB_3	Stage V sporulation protein B	443	-	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	AAK78993,1	CA_C1017	SpoVB membrane protein	n	79