



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de La recherche Scientifique

Université Abbas Laghrou – Khenchela

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département De Biologie

Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de


Master académique

Option : Microbiologie Cellulaire et Moléculaire

Par

SLIMANE-BOUHRAM Malika & MEZAZNA Walid

Thème



**Impact des sels à base de nitrate sur la
méthanogenèse ruminale *in vitro***

Devant le jury:

*** Présidente : M^{elle} HALASSI I.**

MAB univ. Khenchela

*** Examinatrice : M^{elle} YAKHLEF W.**

MAB univ. Khenchela

*** Examinatrice : M^{elle} CHORFI K.**

*** Promotrice: M^{elle} KHEDDOUMA A.**

MAB univ Khenchela



REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé aux laboratoires pédagogiques de l'université de **KHENCHÉLA** et de l'université d'**OUMELBOUAGHI**, avec l'aide des ingénieurs de laboratoires qu'elles trouvent ici le témoignage de nos profondes reconnaissances et nos sincères gratitudes.

Nos remerciements s'adressent également à **M^{eme}. HALASSI I.** qui nous fait l'honneur de présider le jury.

Nous remercions sincèrement **M^{elle} CHORFI K.** et **M^{elle}. YAKHLEF W.** pour leur précieuse assistance technique et de faire partie de ce Jury.

Nous remercions également notre promotrice, **M^{elle}. KHEDDOUMA A.** pour avoir initié ce sujet de recherche et pour son soutien et sa gentillesse qui va être pour nous un exemple à suivre.

Nous remercions aussi Monsieur **ARHAB R.** pour ses compétences scientifiques, son ouverture d'esprit, son soutien et sa gentillesse.

Ce travail n'aurait pu avancer sans l'aide précieuse de Monsieur **MRAH I.** et **Dr. MEZAZENA W.**, qu'ils trouvent ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Nous remercions également l'équipe des abattoirs de **KAIS** et de **KHENCHÉLA**, pour leurs aides durant les périodes de prélèvements.

Enfin, Un grand merci du fond du cœur s'adresse à **M. ALMI A** O. et **M. DIB A.** pour l'aide qu'ils nous ont apporté.



Dédicace

A celle qui me doit toute la gratitude, signe d'affection et de courage, de m'avoir soutenue pendant toute ma vie, sans elle je ne peux survivre ni avoir gout à la vie ma très chère mère.

A celui qui m'a toujours encouragé et soutenu moralement mon très cher père.

A mes chers frères qui m'ont énormément aidé et à qui je témoigne mon affection et ma profonde reconnaissance "Farouk, Hamza et Salah"

A tout mes amis, ma famille.

*A mon binôme **Mezazena Walid**.*

*A qui m'a donné toujours de l'espoir et à qui m'a poussé de faire mon mieux, à mon cher et tendre marié **Dorbani Hamdi** qui a su me soutenir et être toujours présent à mes côtés.*

A tous mes enseignants et mes collègues de ma promotion 2014



Dédicace

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail dédié à:

Mes parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance.

*Mes frères : **Saber, Lahbib, Salah** et **Mahdi**.*

*Mon binôme **Malika**.*

*Mon oncle **Sebti** et sa femme.*

*Mon cher cousin **Housseem**.*

*Mes collègues de travail au niveau de la pharmacie de **Djellel**.*

*Mes collègues de travail au niveau de l'hôpital de **Tawazyanet**.*

*Mes collègues de promotion de Master II microbiologie (**Université de***

***Khenchela**).*

A tout mes amis

Walid

Figure 01. Structure de la molécule du méthane.....	03
Figure 02. Conformation extérieure du rumen.....	06
Figure 03. Schéma de la chaîne trophique de la méthanogenèse et ses différentes étapes	16
Figure 04. Arbre phylogénétique des trois domaines du monde vivant.....	17
Figure 05. Arbre phylogénétique des <i>Archaea</i> méthanogènes.....	18
Figure 06. Fonctionnement du rumen et modifications induites par l'ajout de nitrate dans la ration.....	27
Figure 07. Photographie de prélèvement de jus rumen de l'animale fistule.....	29
Figure 08 Photo de prélèvement de jus rumen pour le dosage du méthane.....	30
Figure 09. Photographie de l'isolement bactérien.....	33
Figure 10. Différentes étapes de préparation de la salive artificielle.....	36
Figure 11. Photographie du système de fermentation en batch.....	37
Figure12. Photographies des boitesensemencées après 24h (gélose nutritive).....	39
Figure13. Photographies des boitesensemencées après 24h (gélose Chapman).....	40
Figure14. Photographies des boitesensemencées après 24h (gélose Hektoen).....	40
Figure15. Photographies des boitesensemencées après 24h (gélose au sang).....	41
Figure 16. Les valeurs de la matière sèche du liquide ruminal de différents essais.....	41
Figure 17. La production du gaz dans l'essai blanc en fonction du temps d'incubation	43
Figure 18. La production du gaz <i>in vitro</i> , en présence de 0,2 ; 0,5 et 1M de tryptophane	43
Figure 19. La production du gaz <i>in vitro</i> , en présence de 0,2 ; 0,5 et 1M de KNO_3^- .	44
Figure 20. La production du gaz <i>in vitro</i> , en présence de 0,2 ; 0,5 et 1M de l'urée.	45
Figure 21. La production du gaz <i>in vitro</i> en présence de trois additifs différents (l'urée, le tryptophane et le KNO_3^-).	46
Figure 22. La production de CH_4 et de CO_2 en présence de différents additifs	47

Tableau I. Les propriétés du méthane.....	03
Tableau II. Sources anthropogènes du méthane atmosphérique (106 tonnes/an).....	04
Tableau III. Caractéristiques de quelques bactéries du rumen.....	10
Tableau IV. Principales espèces de champignons anaérobies isolés du tube digestif des Ruminants.....	14
Tableau V. Méthanogènes isolés de rumen	15
Tableau VI. Influence de différents régimes sur le profil fermentaire (mol/kg MOF) Obtenus à partir du contenu de rumen des moutons.....	22
Tableau VII. Les solutions utilisées dans la préparation de la salive artificielle.....	31
Tableau VIII. Les valeurs de la température de jus de rumen de deux ovens différent....	42
Tableau IX. Les valeurs de pH du jus de rumen.....	43

CH₄	Méthane
MS	Matière sèche
IR	Infrarouge
GES	Global expérience spécialistes
AGS	Acides gras volatils
PR	Potentiel redox
ATP	Adénosine triphosphate
AND	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
INRA	Institut national de la recherche agronomique
BES	Acide 2-bromoethanesulfonique
CO₂	Dioxyde de carbone
H₂S	Sulfure d'hydrogène
AGV	Acides gras volatils
PTG	Production total de gaz
mV	millivolts
mOsm/l	Milliosmoles par litre

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique	
I. Le méthane.....	3
I.1.Généralité.....	3
I.2. Propriétés physico-chimiques du méthane	3
I.3. Les sources du méthane.....	4
I.4. Le méthane et l'effet de serre.....	4
II. La physiologie ruminale.....	5
II.1. Anatomie du rumen.....	5
II.2. Conditions physicochimiques du milieu ruminal.....	7
II.2.1. L'anaérobiose	7
II.2.2. Le pH.	7
II.2.3. La température	8
II.2.4.Potentiel d'oxydo-réduction.....	8
II.2.5. La pression osmotique.....	8
II.3. Les microorganismes ruminales.....	8
II.3.1. Les bactéries.....	8
II.3.1.1. Les bactéries cellulolytique.....	9
II.3.1.2. Les bactéries amylolytiques.....	9
II.3.1.3. Les bactéries libres	9
II.3. 1.4. Les bactéries adhérentes.....	9
II.3.1.5. Autres bactéries.....	11

SOMMAIRE

II.3.2. Les protozoaires.....	11
II.3.3. Les champignons.....	12
II.3.4. Les méthanogènes.....	14
II.3.4.1. Différentes origines de la méthanogènèse.....	15
III. Les microorganismes producteurs du méthane.....	16
III.1. Le domaine <i>Archea</i>	16
III.2. Le groupe des <i>Archea</i> méthanogènes.....	19
III.3. Le génome méthanogène.....	19
III.4. Population méthanogène du rumen.....	20
III.5. Les facteurs influençant la méthanogènèse dans le rumen.....	21
III.5.1. Influence de l'animal.....	21
III.5.2. Influence de l'animal	23
IV. La réduction des émissions du méthane chez les ruminants.....	23
IV.1. L'utilisation des antibiotiques.....	23
IV.2. Manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal.....	24
IV.2.1. L'élimination des protozoaires du rumen.....	24
IV.2.2. Les agents biologiques.....	24
IV.3. L'utilisation des additifs chimiques.....	25
IV.4. L'utilisation des extraits de plantes.....	26
V. La réduction du méthane par l'utilisation des produits nitreux.....	26
V.1. L'utilisation du nitrate.....	27

SOMMAIRE

V.2. L'utilisation du nitrate et le sulfate.....	27
Chapitre II Matériel & méthodes	
I. Le matériel	29
I.1. L'échantillonnage	29
I.1.1. Echantillonnage pour l'isolement bactérien.....	29
I.1.2. Echantillonnage pour le dosage du méthane.....	30
I.2. Les milieux de culture	30
I.2.1. Les milieux d'isolement bactérien.....	30
I.2.2. La salive artificielle.....	30
II. L'étude expérimentale.....	32
II.1. Etudes physicochimiques de jus de rumen.....	32
II.1.1. Mesure de la température.....	32
II.1.2. Mesure du pH.	32
II.1.3. Mesure de la matière sèche.....	32
II.2. L'isolement bactérien.....	33
III. Réduction du méthane.....	34
III.1. Mesure de la production de gaz <i>in vitro</i>	34
III.1.2. Principe de la technique.....	34
III.1.3. Préparation de la salive artificielle.....	35
III.1.3.1.Méthode de préparation.....	36
III.1.3.2.Incubation.....	37
III.1.3.Analyse quantitative de la phase gazeuse.....	37
III.1.4.Analyse qualitative de la phase gazeuse.....	37

Chapitre III : Résultats et Discussion

SOMMAIRE

I.L'isolement des bactéries ruminales.....	38
I.1. L'isolement sur la gélose nutritive (GN).....	38
I.2. L'isolement sur la gélose Chapmann (Chap.).....	38
I.3. L'isolement sur la gélose Hektoen.....	39
I.4. L'isolement sur la gélose au sang.....	40
II. Etudes physicochimiques de jus de rumen.....	41
II.1. La température de jus de rumen.....	41
II.2. pH de jus de rumen.....	41
II.3. La matière sèche de jus de rumen.....	42
III. Dosage des gaz <i>in vitro</i>	43
III.1. Dosage des gaz dans l'essai blanc.....	43
III.2. Dosage des gaz en présence des additifs.....	44
III.2.1. Dosage des gaz en présence de tryptophane.....	44
III.2.2. Dosage des gaz en présence de KNO_3^-	45
III.2.3. Dosage des gaz en présence de l'urée.....	46
IV. Analyse qualitative des gaz produits <i>in vitro</i>	48
CONCLUSION GENERALE	49
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
RESUMES.	

La production de méthane (CH_4) par les animaux est d'origine digestive, c'est le résultat de la dégradation anaérobie de la biomasse végétale ingérée par les microorganismes présents dans les rumens. Tous les animaux d'élevage produisent donc du CH_4 et du CO_2 . Cependant, les ruminants (bœufs, mouton et chèvre) excrètent des quantités plus grandes des gaz que les monogastriques (les volailles). Le méthane ainsi produit est rejeté dans l'atmosphère par voie orale (95%), au cours d'éruclations régulières et par les poumons après passage dans le sang, mais très peu par flatulences (5%) contrairement à une affirmation courante.

Le méthane est un puissant gaz à effet de serre, qui contribue au réchauffement climatique, il a un impact sur l'effet de serre environ 25 fois plus puissant que le CO_2 . Les niveaux atmosphériques de méthane ont brutalement augmenté en 2006, passant de 25,4 millions de tonnes entre juin 2006 et octobre 2007 à plus de 5,6 milliards de tonnes en 2008. Outre l'aspect environnemental, le méthane éruclé constitue pour le ruminant une perte en énergie sous forme gazeuse estimée à environ 6-10% de l'énergie brute ingérée. La réduction de la méthanogenèse présente donc non seulement un intérêt environnemental pour l'homme et la planète, mais aussi un intérêt nutritionnel pour le ruminant (**Lindau, 1993**).

Pour cela, diverses voies sont explorées dans le but de réduire la production de méthane : additifs qui inhibent les micro-organismes méthanogènes et/ou modifient les orientations métaboliques du rumen ; manipulations biotechnologiques (sélection des microorganismes du rumen ou vaccination contre les micro-organismes méthanogènes).

Peu de travaux ont été réalisés sur des molécules substituant fixatrices de l' H_2 , tels que les composés azotés (nitrates et/ou nitrites). Les nitrates peuvent efficacement réduire la production de CH_4 par le microbiote ruminal. Parce que l'ajout de nitrate augmente la production d'ammoniac dans le rumen et de la synthèse microbienne d'azote.

C'est dans ce contexte que nous avons entamé l'étude de la réduction du méthane des ruminants par le changement de la voie métabolique bactérienne. Ce procédé se base sur l'utilisation des sels à base de nitrate (l'urée, le tryptophane et le nitrate de potassium)

Pour cela, ce travail est composé de trois parties principales et d'une conclusion générale. Le premier chapitre est l'étude bibliographique consacrée à l'étude des propriétés générales du méthane et les techniques utilisés pour réduire le méthane des ruminants en concentrant sur les techniques biologiques.

Le deuxième chapitre est une présentation des moyens, des appareillages et les méthodes spécifiques utilisés lors de l'expérimentation

Le dernier chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus avec différentes séries d'expériences pour l'étude de la réduction, en utilisant différents sels à base de nitrate comme un substrat dans la culture bactérienne inoculée par le jus de rumen.

En dernier lieu, on rendra compte de façon synthétique des principaux résultats obtenus, résumant les buts atteints et les perspectives à atteindre par l'approfondissement de cette étude.

I. Le méthane

I. 1. Généralité

Le méthane est le composant principal du gaz naturel (**Jean-Claude, 2011**), il a été découvert et isolé par Alessandro Volta entre 1776 et 1778, c'est aussi le principal constituant du bio-gaz issu de la fermentation de matières organiques animales ou végétales en absence d'oxygène (**Atreya, 2007**). Sa molécule possède 1 atome de carbone (C) et 4 atomes d'hydrogène (H), dont sa formule est CH₄ (**figure 01**).

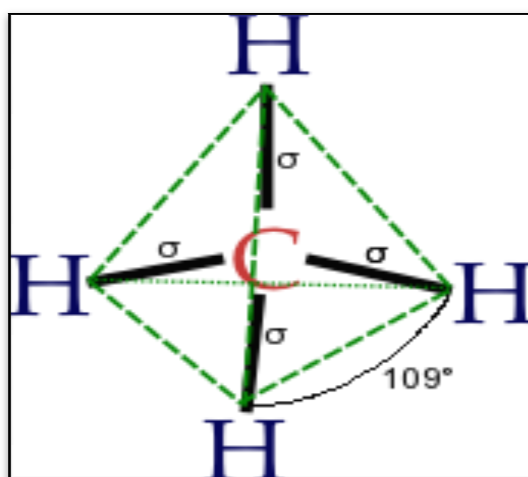


Figure 01. Structure de la molécule du méthane.

I.2. Propriétés physico-chimiques du méthane

Aux conditions normales de température et de pression, le méthane est un gaz incolore et inodore. Plus léger que l'air, le méthane en milieu non confiné s'échappe vers la haute atmosphère et n'a pas la tendance des gaz plus lourds que l'air (propane, butane) à former des nuages explosifs. Le méthane est un combustible qui compose jusqu'à 90 % le gaz naturel. Sa température d'auto-inflammation dans l'air est de 540°C (**ICSCs, 2014**).

Tableau I. Les propriétés du méthane.

Formule	CH ₄
Densité	0,66 kg/m ³
Masse molaire	16,04 g/mol
Point d'ébullition	-164 °C
Point de fusion	-182 °C
Solubilité	Eau

I.3. Les sources de méthane

Généralement, il y a trois grands types de sources qui peuvent être identifiés :

- Les sources anaérobies qui produisent du CH₄ en absence d'oxygène (70%). Elles font appel à des processus bactériens, d'une part liés à la dégradation de la matière organique et d'autre part faisant intervenir la réduction du CO₂ ou la fermentation de l'acétate soit dans les marais, les rizières, les décharges ou dans l'estomac des ruminants.
- Les sources liées à la production d'énergies fossiles telles que le charbon, le pétrole et le gaz naturel (20%). Les émissions proviennent des pertes pouvant intervenir lors de l'exploitation, du transport et de la transformation de ces matières.

Les sources liées à la combustion incomplète de biomasse et de matière organiques fossiles par la raison de l'existence des microorganismes peuvent soit dégrader du CH₄, soit en consommer et le transformer en CO₂ (**Jean-Claude, 2011**).

Tableau II. Sources anthropogènes du méthane atmosphérique (106 tonnes/an) (**Boussaada, 2011**).

Sources	Estimation(tonnes/an)
Mines de charbon, gaz naturel, industries pétrolière	100
Rizières	60
Elevage	80
Déchets d'élevage	25
Epuration des eaux usées	25
Remplissage de terres	30
Combustion de biomasse	40
Total	360

I.4. Le méthane et l'effet de serre

La température annuelle moyenne de la terre est de 15°C. En absence de gaz à effet de serre dans son atmosphère, la terre serait environ 34°C plus froide. A cette température, l'eau n'existerait pas sous sa forme liquide. L'effet de serre est donc un phénomène naturel essentiel au maintien de la biosphère (**Rochette, 2003**). Cet effet est dû à l'accumulation dans l'atmosphère de gaz qui absorbent le rayonnement infrarouge (IR), issu de l'émission de rayons de grandes longueurs d'onde par la surface terrestre (**Demeyer et al., 2000**).

Le méthane est un gaz à effet de serre qui influe sur le climat. Il absorbe une partie du rayonnement infrarouge émis par la terre, et l'empêche ainsi de s'échapper vers l'espace. Ce phénomène contribue au réchauffement de la terre (**Jean-Claude, 2011**).

Le méthane, un des principaux gaz à effet de serre, est majoritairement produit et consommé par l'activité métabolique de microorganismes affiliés aux domaines des *Archaea* et des *Bacteria*.

Depuis le début de l'ère industrielle, la concentration atmosphérique des GES a augmenté à cause des activités humaines. La teneur du CO₂ atmosphérique a augmenté de 30% (**IPCC, 2001**). Cette augmentation est principalement due à la combustion d'énergies fossiles et aux changements d'usage des sols. La teneur en méthane a augmenté de 150% du fait de l'intensification de l'élevage des ruminants (fermentation entérique).

II. La physiologie ruminale

II.1. Anatomie du rumen

L'estomac des ruminants occupe les 4/5 de la cavité abdominale, en dehors de la gestation. Il présente un proventricule énorme, divisé en trois compartiments : le rumen, le réticulum et l'omasum, et une portion réellement peptique, équivalente à l'estomac des monogastriques : l'abomasum (**Sauret, 1988**).

La paroi du rumen est formée d'une tunique musculaire qui constitue l'essentiel de sa masse. Ce sont les contractions de ces muscles qui assurent le brassage continu des aliments.

Le rumen est tapissé d'une muqueuse assurant l'absorption des nutriments solubles (**Gouet et al., 1985**). Les différentes poches du rumen communiquent par un bourrelet de deux saillies qui est la goutte oesophagienne (**Gouet, 1975**).

Le rumen, encore appelé panse, est de loin le plus volumineux des réservoirs gastriques des ruminants. Il contient autour de 150 litres chez un bovin adulte, pour un poids vide proche de 7 kilogrammes (**Barone, 1997**).

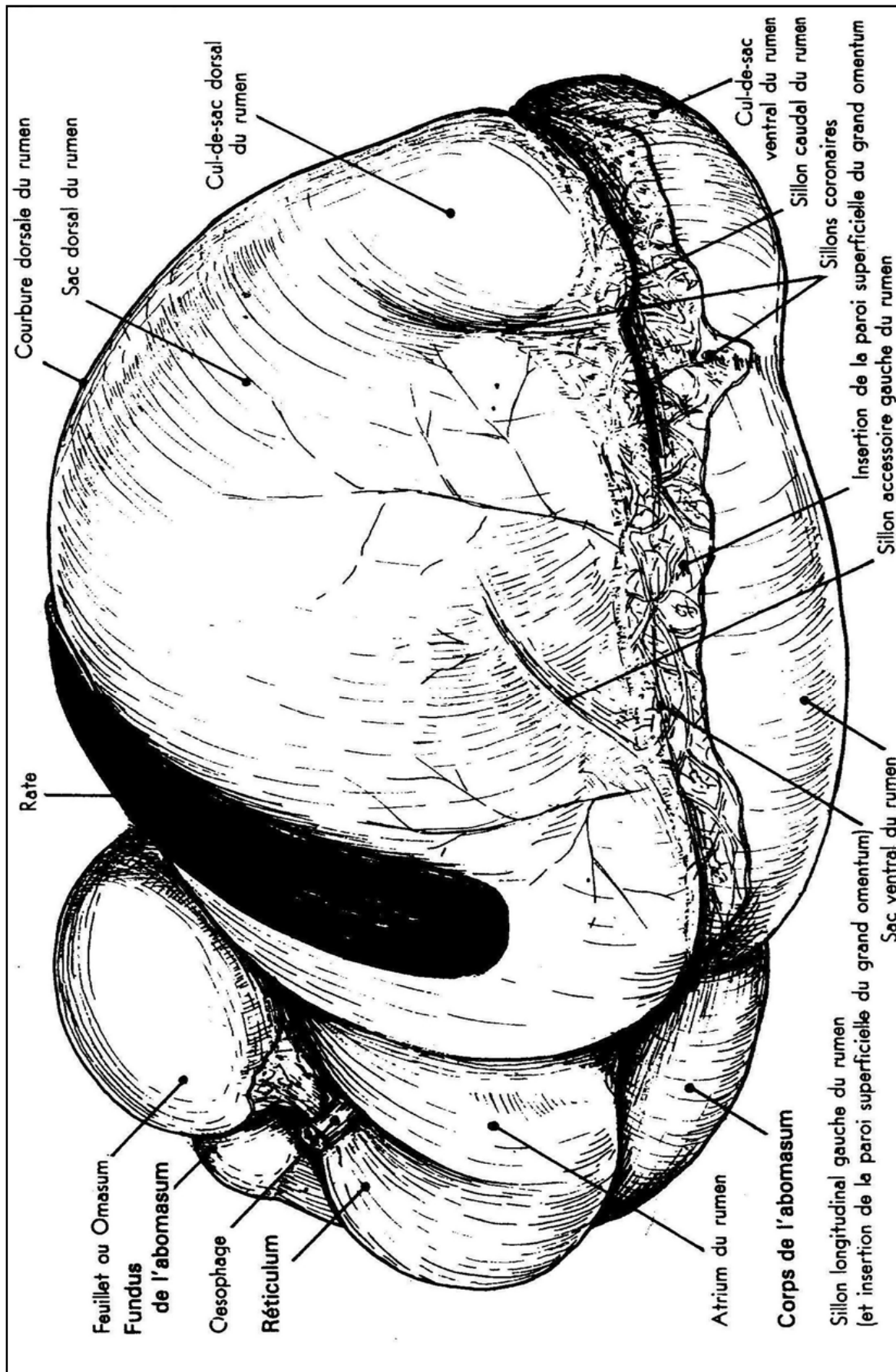


Figure 02. Conformation extérieure du rumen. (Belbis, 2007)

II.2. Conditions physicochimiques du milieu ruminal

Le développement des microorganismes du rumen est directement dépendant des conditions physicochimiques du milieu.

II.2.1. L'anaérobiose

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie. Les apports d'oxygène sont faibles (déglutition, diffusion à partir des vaisseaux des parois). Des souches de bactéries aérobies facultatives le font disparaître. Par exemple, bien qu'étant généralement strictement anaérobie, certaines souches de *Selenomonas ruminantium* sont connues pour tolérer une exposition à de faibles quantités d'oxygène (**Brugère, 2005**). **Stewart et Bryant** rapportent que **Samah & Wimpenny** ont démontré la présence d'une NADH-oxydase soluble, supposée réduire l'oxygène en eau ou en H₂O₂ (**Stewart et al., 1988**).

Le superoxyde produit dans cette réaction serait par la suite métabolisé par une superoxyde dismutase, de sorte que l'O₂ ne représente pas 1% des gaz du sac dorsal. La teneur en CO₂ est toujours élevée (60% de la poche des gaz), celles en CH₄ de 27%, 7% en N₂, et 0.2% en H₂ (**Tiret, 2001**). La majeure partie est éliminée par éructation. Une partie est incorporée dans divers métabolismes bactériens.

II.2.2. Le pH

Le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. La valeur du pH du rumen est normalement comprise entre 5,5 et 7,3 (**Brugère, 1983**). Mais une fermentation rapide peut baisser le pH à moins de 5, ce qui est favorable à la croissance des micro-organismes qui produisent essentiellement le propionate et le lactate (**Soltner, 1994**). Cette marge est cependant un peu large. Le pH normal ne correspond pas à la neutralité au sens physico-chimique (7,0). Dans le rumen en fonctionnement, il apparaît des acides gras volatils (AGV), et il est normal que la réaction soit légèrement acide (par exemple de 6 à 6,8). Autour de ces valeurs, le pH peut varier sans qu'il y ait parallèlement de troubles, mais cela n'est pas pour autant la normalité. Les causes de variations les plus fréquentes du pH sont les fluctuations alimentaires. Le pH baisse dans la période postprandiale et s'élève pendant le jeûne.

Compte tenu des quantités de ces éléments et de la valeur du pH, le pouvoir tampon est assuré essentiellement par les bicarbonates. Ceux-ci sont apportés par la salive (un bovin adulte sécrète chaque jour environ 100 litres de salive riche en bicarbonates, à pH = 8). Le pouvoir tampon n'est pas une constante ; il dépendra en grande partie de l'alimentation (qui

stimule plus ou moins la production salivaire). Le pouvoir tampon est maximal dans la zone de pH <6, ce qui indique que le contenu ruminal est plus apte à maintenir sa constance dans la zone de légère acidité où il se trouve dans les conditions habituelles (**Hungate, 1966**).

II.2.3. La température

La température ruminale est supérieure d'au moins un degré par rapport à la température centrale, c'est-à-dire comprise entre 39,5°C et 40°C.

Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide : de 5 à 10°C pour une à deux heures (**Jondéy et al., 1989**).

II.2.4. Potentiel d'oxydo-réduction

Le rumen constitue un écosystème fortement anaérobie, son potentiel d'oxydoréduction moyen est de -350 mv. La zone proche de l'épithélium est très vascularisée, il s'y fixe une population microbienne facultativement aérobie qui contribue à l'élimination des traces d'oxygène ce qui permet de maintenir l'écosystème en anaérobiose (**Crapelet et al., 1974**).

II.2.5. La pression osmotique

De l'ordre de grandeur de celle du sang, la pression osmotique varie dans une plus grande gamme de 200 à 400 mosm/l.

Elle est identique à celle du sang dans les conditions normales d'alimentation (**Hungate 1966**). Après absorption d'eau, la pression osmotique diminue, mais étant donné la perméabilité de la paroi du rumen, elle atteint l'équilibre au bout de dix heures. La pression osmotique de la salive est plus faible que celle du sang, son arrivée continue dans le rumen, affecte peu la pression du milieu.

II.3. Les microorganismes ruminaux

La micro population du rumen se caractérise par son extrême diversité car l'on y trouve un important nombre de bactéries, de protozoaires, de champignons, et de bactériophages.

II.3.1. Les bactéries

La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité, le nombre d'espèces bactériennes colonisant le rumen étant important, et présentant des activités enzymatiques variées. Le rumen d'un adulte contient environ 10^{12} cellules bactériennes /ml, les bactéries

seules représentent environ 50% de la biomasse microbienne. Elle est composée essentiellement de bactéries anaérobies strictes non sporulées (**Tableau III**).

La colonisation du tractus digestif des ruminants par les bactéries est rapide. Dès le premier jour, les premières bactéries s'installent : *Escherichia coli* et des *Streptocoques*, alors que les bactéries cellulolytiques apparaissent au 4^{ème} jour chez 75% des jeunes des ruminants (**Fonty et al., 1988**). Celles-ci peuvent être regroupées selon le type de substrat rassemblant attaqué dans le rumen. Les substrats fermentés par les espèces bactériennes ruminales étant multiples, celles-ci peuvent donc être retrouvées dans différentes niches écologiques (dégradation de la cellulose, de l'amidon, de protéines, ...etc.).

II.3.1.1. Les bactéries cellulolytique

C'est le groupe des bactéries le plus important. Les principales bactéries cellulolytiques isolées du rumen sont : *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Bactérioides succinogènes*, *Fibrobacter succinogènes*. Ces souches ruminales sont capables d'hydrolyser complètement la cellulose cristalline telle que le coton (**Fonty et al., 1995**).

II.3.1.2. Les bactéries amylolytiques

Les espèces représentatives de ce groupe sont : *Selenomonas ruminantium* et *Streptococcus bovis*, la plupart des bactéries hydrolysant l'amidon son incapable d'utiliser la cellulose. *S. bovis* produit de l'acétate et de l'éthanol, quand sa croissance est normale. *Bactérioides annylophilus* ne fermente que l'amidon, les dextrans et le maltose (**Boussaada, 2011**).

II.3.1.3. Les bactéries libres

Le 1/3 des bactéries se trouvent à l'état libre dans le liquide ruminale, elles utilisent les substances libérées dans le milieu ruminal en se développant vers les régions de forte concentration en substrats préférentiels (**Rachedi, 2005**).

II.3. 1.4. Les bactéries adhérentes

Elles adhèrent soient aux particules alimentaires (70%), soient à la paroi ruminale (**Boussaada, 2011**).

Tableau III. Caractéristiques de quelques bactéries du rumen (Dawson *et al.*, 1988).

<i>Espèce</i>	<i>Gram</i>	<i>Morpho</i>	<i>%G+C</i>	<i>Produits: majeurs et mineurs</i>	<i>Type</i>
<i>Prevotella ruminicata</i>	-	Bâtonnet	49-50	Acétate, succinate (Formate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovolérate, lactate)	Hémicellulose, protéines
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	-	Bâtonnet	40-42	Formate, acétate, succinate (lactate)	Amidon
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	-	Bâtonnet	47-49	Acétate, succinate (formate, propionate, isovolérate)	Cellulose
<i>Setenomonas ruminantium</i>	-	Croissant	54	Lactate, propionate, acétate, H ₂ , Co ₂	Protéines sucres
<i>Butyrivibrio Fibrisolvens</i>	-	Bâtonnet courbé	36-41	Formate, butyrate, acétate, H ₂ , Co ₂ (Lactate, succinate)	Répondue cellulolytique
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	-	Bâtonnet		Propionate, succinate, acétate H ₂ , Co ₂ (lactate)	Lipides
<i>Vibrio (wolinnella) succinogenes</i>	-	Vibrion	47	Succinate H ₂ , Co ₂	Baisse H ₂
<i>Succinivibrio dextinosolvans</i>	-	Vibrion		Acétate, succinate (Formate, lactate)	Dextrines
<i>Treponema bryantii</i>	-	Hélice	35-37	Formate, acétate, succinate	Sucres
<i>Veillonella parvula</i>	-	Coque	38-41	Acétate, propionate, H ₂ (Lactate)	Lactate
<i>Succinomonas amylolytica</i>	-	Coque ou bâtonnet		Succinate (acétate, propionate)	Amidon
<i>Ruminococcus albus</i>	+	Coque	42-46	Acétate, éthanol, Co ₂ (formate, lactate)	Cellulose
<i>Ruminococcus flavifaciens</i>	+	Coque	39-44	Acétate, succinate, H ₂ (formate, lactate)	Cellulose
<i>Streptococcus bovis</i>	+	coque	37-39	Lactate, Co ₂ (formate, acétate, éthanol)	Amidon
<i>Lachnospira multiparus</i>	+	Bâton		Formate, acétate, lactate, H ₂ (succinate, éthanol)	Pectine
<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	Bâtonnet		Formate, butyrate, lactate, Co ₂ (succinate, éthanol)	Xylanes, sucres
<i>Lactobacillus ruminis</i>	+	Bâtonnet	44-47	Lactate	Sucres

II.3.1.5. Autres bactéries

- **Bactéries pectinolytiques**

Leurs principales espèces sont *Lachnospira multipara*, *Pervotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis* et quelques souche de *Spirochetes*, mais seulement quelques unes d'entre elles ont été isolées à partir de milieu sélectif contenant de la pectine purifiée comme seul substrat énergétique (Yaakoub, 2006).

- **Bactéries protéolytiques**

Plusieurs espèces telles que *Mesgaphaera elsedinil*, peuvent croître à partir des acides aminés en absence de glucides comme source d'énergie (Wallace, 1996).

II.3.2. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes cellulaires. On distingue 02 types dans le rumen : les flagellés et les ciliés. Les ciliés représentent près de la moitié de la biomasse microbienne et leur concentration varie de 10^4 à 10^6 cellules /ml, elle est distribuée entre les particules solides et la phase liquide.

La majorité des protozoaires retrouvés dans le rumen appartiennent à l'embranchement des ciliés, et représentés par deux groupes, tous les deux de la sous-classe des *Trichostomatia*. Les « *holotriches* » appartiennent à l'ordre des *Vestibuliferida*, et les « *Entodiniomorphes* » à l'ordre des *Entodiniomorphides*, sous ordre des *Entodiniomorphines*, et famille des *Ophryoscolecidae*.

Au sein des *Entodiniomorphidés*, on retrouve un nombre important de genres : les genres *Entodinium* (un genre difficile à classifier sur la base de l'aspect morphologique, *Eodinium* (dont l'espèce type est *Eodinium lobatum*), *Diplodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Polyplastron*, *Diploplastron*, *Metadinium*, *Epidinium*, *Enoploplastron*, *Ophryoscolex*, *Epiplastron*, *Elytroplastron* (Williams, 2001).

Concernant les Holotriches, les genres rencontrés dans le rumen sont majoritairement *Isotricha* et *Dasytricha*, ainsi que, en moindre nombre, les genres *Oligoisotricha*, *Microcoetus*, *Buetschliidae*, *Parabundleia*, *Polymorphella*, *Blepharoconus* et *Paraisotricidae*.

Le type de la ration alimentaire conditionne fortement les populations des protozoaires (Jouany *et al.*, 1998). Et sont très sensibles à la non nutrition et peuvent disparaître en 2 à 3 jours de diète.

Les *Entodiniomorphes* digèrent les parois cellulaires et les chloroplastes, des enzymes cellulolytiques étant retrouvées chez tous les protozoaires de cet ordre. Néanmoins, la présence de cellulases d'origine bactériennes ne permet pas d'apporter la preuve sans ambiguïté d'une origine ciliée plutôt que bactérienne (**Taniguchi et al., 1979**). Les plus gros protozoaires peuvent également dégrader l'hémicellulose. D'autre part, les protozoaires jouent un rôle important dans l'hydrolyse de l'amidon en ingérant les granules d'amidon et les sucres solubles en diminuant de ce fait l'accessibilité de ces substrats aux bactéries amylolytiques.

L'ingestion a lieu par phagocytose dans la zone apicale non ciliée, la digestion s'effectuant dans les vacuoles ou vésicules qui en dérivent.

II.3.3. Les champignons

Les champignons du rumen n'ont été découverts que tardivement (**Orskou et al., 1990**). La population fongique est estimée à 10^3 et 10^5 cellules/ml soit environ 10 % de la biomasse microbienne (**Fonty et al., 1991**) (**Tableau IV**). Les zoospores s'attachent sur les particules des plantes déjà abimées.

L'activité protéolytique est assurée par des *Métallospores*, ils hydrolysent l'extensine des parois. Ils contiennent beaucoup d'acides aminés, dont le contenu en adénine et en thymine est important, et à ce titre, les protéines des champignons sont très digestibles (**Stewart et al., 1997**).

Les champignons produisent une importante quantité de H_2 et sont donc associés, dans les réactions métaboliques, aux bactéries méthanogènes, bactéries consommatrices de dihydrogènes. Les bactéries cellulolytiques diminuent l'activité des champignons, l'élimination des champignons diminue la digestibilité et augmente la proportion de propionate (**Tiret, 2001**).

Les champignons apparaissent 8 à 10 jours après la naissance chez l'agneau, donc avant l'ingestion de nourriture solide. Ils disparaissent chez 80% des agneaux nourris par des aliments concentrés, mais se stabilisent si la nourriture est peu hydratée. Chez l'adulte, le nombre augmente si l'alimentation est riche en fibres.

Les champignons ne sont pas indispensables, parfois absents, et prennent toute leur importance avec les fourrages de mauvaise qualité.

Ils colonisent les tissus lignifiés qui restent dans le rumen, diminuent la taille des particules, cassent les structures, et dégradent des tissus mêmes très lignifiés. Les enzymes nécessaires sont extra-cellulaires.

Tableau IV. Principales espèces de champignons anaérobies isolés du tube digestif des ruminants (Stewart *et al.*, 1997).

Type de thalle	Nombre des flagelles	Genre/ Espèce	Origine
Monocentrique avec rhizoïdes filamenteux	>4	<i>Neocallimastix frantalis</i>	Rumen
		<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Rumen
		<i>Neocallimastix harleyensis</i>	Rumen, caecum de cheval. Caecum d'éléphant Fèces d'âne....
		<i>Piromyces communis</i>	
		<i>Piromyces mae</i>	
		<i>Piromyces dumbonica</i> <i>Piromyces rhizinflata</i>	
Monocentrique avec rhizoïde bulbeux	>4	<i>Caecomyces communis</i>	Rumen, caecum de cheval
		<i>Caecomyces equi</i>	
Polycentrique	>4	<i>Orpinomyces joyonii</i>	Rumen
		<i>Orpinomyces bovis</i>	
	>4	<i>Anaeromyces micronatus</i> <i>Ruminomyces elegaris</i>	Rumen

II.3.4. Les méthanogènes

Ce sont essentiellement *Methanobactérium ruminantium* et *M. mobile*. Elles produisent du méthane ce qui permet d'éliminer les ions H^+ en excès. D'où le rôle d'exutoire aux éléments réducteurs H^+ en milieu anaérobie. En orientant la fermentation vers la production d'acétate, elles potentialisent l'activité des bactéries cellulosiques et la croissance fongique mais cette production de CH_4 constitue une perte d'énergie pour les ruminants (Chevallier, 2001).

La méthanogenèse biologique est le résultat des microorganismes strictement anaérobies et très primitifs ; les *Archaea* qui se distinguent des bactéries par une génétique très différente. Il s'agit des bactéries anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes des ruminants (tableau V) (Yanagita *et al.*, 2000) et peuvent être aisément distinguées des autres organismes car ils produisent tous du méthane comme principale produit de fermentation.

La présence dans la paroi cellulaire de glycéride entérique au lieu de glycéride sous forme d'esters. La présence d'une chaîne d'enzymes et de cofacteur unique, assurant la

méthanogène comme dépôt final d'hydrogène gazeux libéré dans des consortia de réducteur de proton.

Tableau V. Méthanogènes isolés de rumen (Yanagita *et al.*, 2000).

Microorganismes	La source d'énergie
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	H ₂ /formate
<i>Methanobrevibacter sp.</i>	H ₂ /formate
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H ₂ /methanol méthylamines/acétate
<i>Methanosarcina mazei</i>	H ₂ /methanol méthylamines/acétate
<i>Methanobacterium formicicum</i>	H ₂ /formate
<i>Methanomicrobium mobile</i>	H ₂ /formate

II.3.4.1. Différentes origines de la méthanogène

La production du méthane dans le rumen a un effet sur les produits terminaux de la fermentation, ainsi que sur le rendement en ATP. Si les méthanogènes sont présents, les nucléotides réduites peuvent être ré-oxydés par l'hydrogénase, plutôt que par un alcool ou une lactate-déshydrogénase.

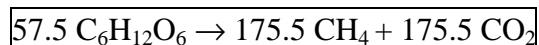
Les substrats des différentes espèces sont l'acétate, le méthanol, l'hydrogène/CO₂, le formiate, les méthylènes. On trouve ces organismes dans deux systèmes avec des taux de renouvellement très différents : le tube digestif et les marais qui ont des temps de rétention de quelques jours et au moins de quelques semaines respectivement. Les systèmes avec rétention longue permettant la transformation complète des substances en CO₂ et en CH₄ avec transformation d'intermédiaires qui s'accumulent dans les fermentations du tube digestif.

La stœchiométrie générale des fermentations dans les deux systèmes est illustrée dans la **figure 03**.

- **Incomplète** (tube digestif)



- **Complète** (marais, rizières, épuration anaérobique)



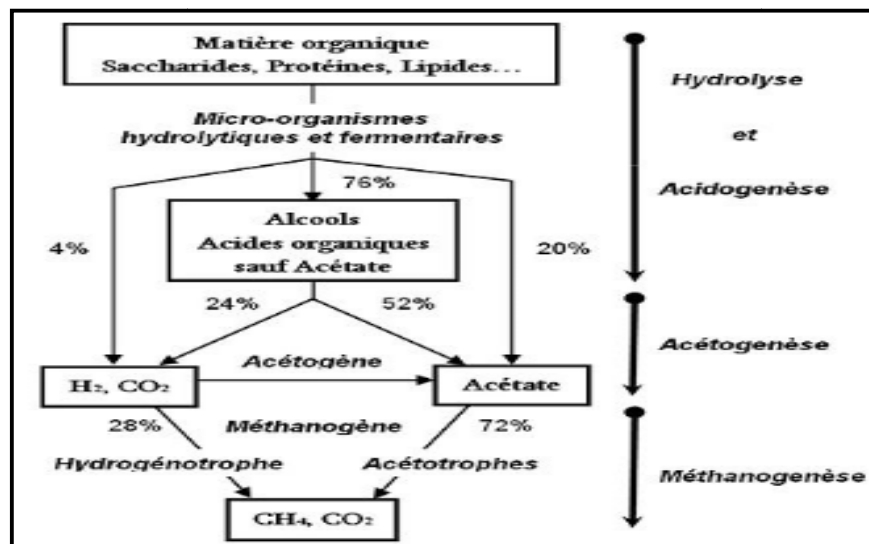


Figure 03. Schéma de la chaîne trophique de la méthanogenèse et ses différentes étapes

La méthanogenèse implique la consommation d'hydrogène et la réduction par paliers du dioxyde de carbone. Un certain nombre de substrats peut être utilisé pour la méthanogenèse (acétate, formate, alcools de petite taille issus de la dégradation des pectines), mais le dioxyde de carbone et l'hydrogène sont néanmoins les principaux substrats impliqués. Ainsi, la majorité du dihydrogène provenant de la dégradation des glucides termine en méthane (Boussaada, 2011).

III. Les microorganismes producteurs du méthane

La complexité anatomique des réservoirs gastriques des ruminants est associée à la présence d'une flore et faune microbiennes denses qui vivent en symbiose avec l'animal hôte.

La mise en place et le maintien de cette population microbiennes sont dus aux conditions physico-chimiques propices à la croissance anaérobie, mais également à la présence d'une séparation physique entre la zone de sécrétion acide (abomasum) et le reste des pré-estomacs où la digestion microbienne du tube digestif microbienne peut avoir lieu en permanence (Papova *et al.*, 2011).

La population microbienne du tube digestif des ruminants est très diverse et variée comptant des bactéries, des protozoaires, des champignons et des *Archaea*.

III.1. Le domaine *Archea*

Les *Archaea* ont été longtemps considérés comme des bactéries extrêmophiles (Liu & Whitman 2008). Le travail de Woese *et al.*, 1990 a permis de poser les bases de la

phylogénie moderne et a montré que les *Archaea* sont aussi différents des bactéries (**Figure 04**).

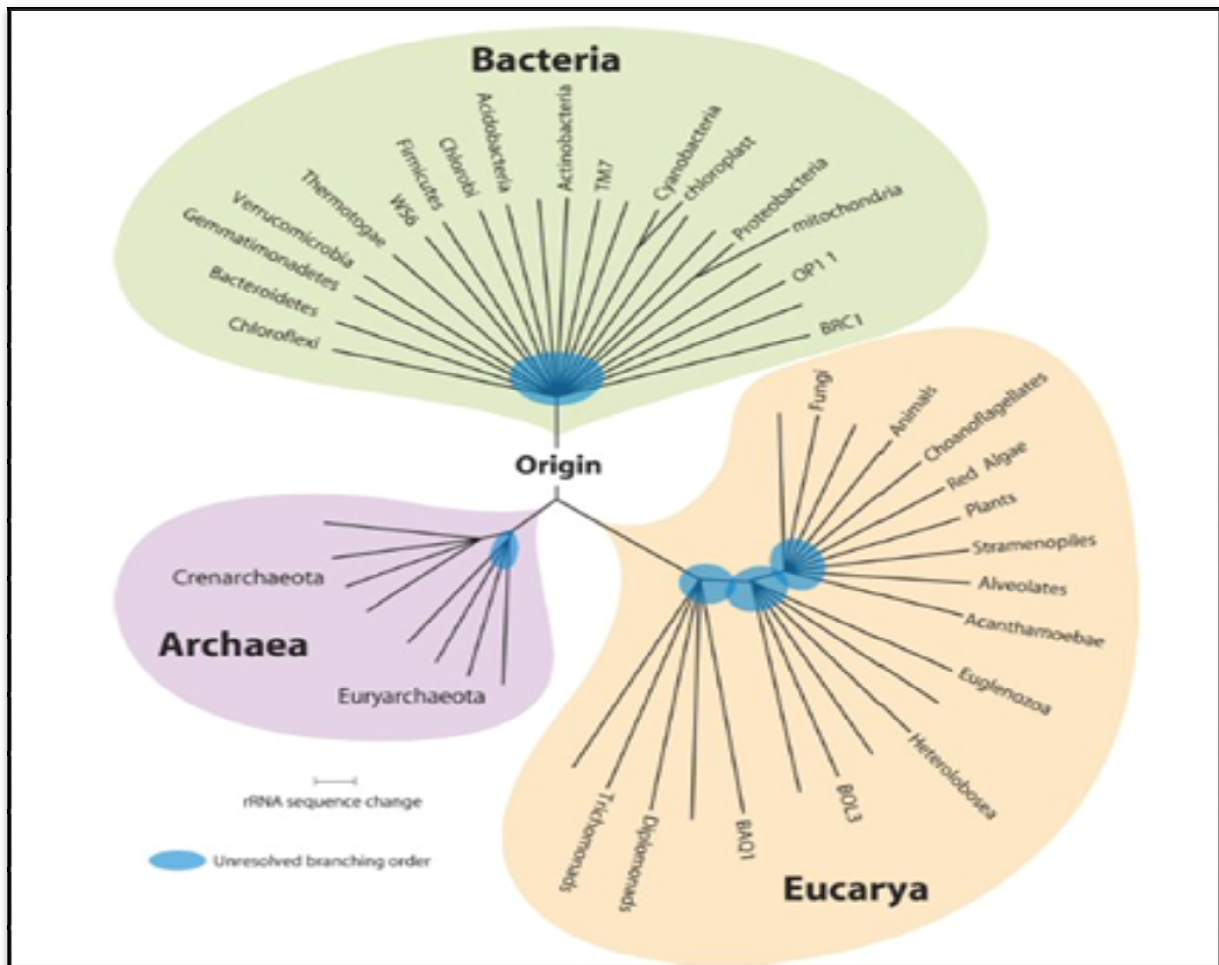


Figure 04. Arbre phylogénétique des trois domaines du monde vivant

Les *Archaea* sont très diverses, tant dans leur morphologie que dans leur physiologie. Elles peuvent être sphériques, en forme de tiges, en spirales, plates ou irrégulièrement formées, elles peuvent être existes comme des cellules isolées, en agrégats ou former des filaments, elles se multiplient par fission binaire, bourgeonnement, fragmentation, ou d'autres mécanismes (**Balch et al., 1979 ; Garcia et al., 2000**).

Les *Archaea* peuvent être aérobies, facultativement anaérobies, ou strictement anaérobies, elles s'étendent de chimioautotrophes à organotrophes (**Garcia et al., 2000**). Certains sont mésophiles, tandis que d'autres sont hyper thermophiles et peuvent se développer à des températures dépassant les 100°C.

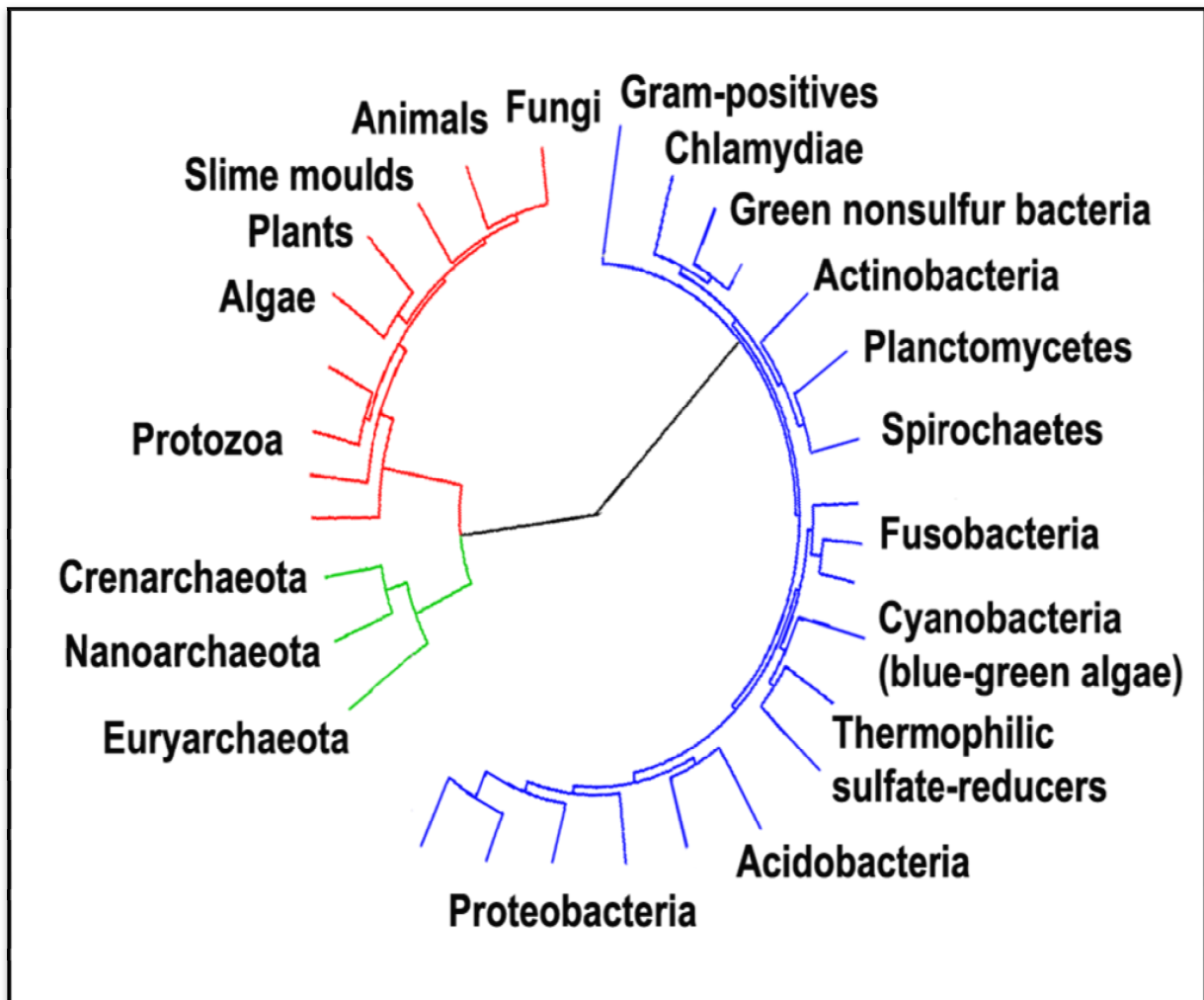


Figure 05. Arbre phylogénétique des *Archaea* méthanogènes (Ciccarelli *et al.*, 2006)

(Les *Archaea* sont en vert, les *Bacteria* sont en bleu et les *Eucarya* en rouge)

Les *Archaea* peuvent être à Gram positif ou négatif, la paroi de beaucoup d'*Archaea* à Gram positif est constituée d'une seule couche homogène, alors que chez les bactéries une couche de peptidoglycane est séparée par l'espace périplasmique de la membrane plasmique.

Chez les *Archaea* à Gram négatif, la membrane externe et le complexe peptidoglycane, caractéristique des bactéries à Gram négatif ne sont pas présents (Garcia *et al.*, 2000).

L'ADN des *Archaea* est organisé en un seul chromosome circulaire comme chez les *Bacteria*, mais comporte des gènes en mosaïque similaires à ceux des *Eucarya*. Très peu de plasmides sont retrouvés chez les *Archaea*. Les ARN messagers (ARNm) ressemblent aux ARN des *Bacteria* ; ils peuvent être polygéniques et ne sont pas organisés en intron/exon. Les ARN polymérase des *Archaea*, par contre, sont beaucoup plus complexes que les ARN-

polymérase des *Bacteria*, et étonnamment proches de celles des *Eucarya* (Baptiste *et al.*, 2005).

Phylogénétiquement, les *Archaea* sont classées en 3 phyla : *Crenarcheota*, *Euryarcheota*, *Nanoarcheota* (Figure 05).

Les *Archaea* occupent différentes localisations dans le rumen. On les trouve dans la phase du contenu digestif mais beaucoup sont fixées sur les protozoaires ciliés, sur les particules alimentaires, ainsi que sur l'épithélium ruminal (Tokua *et al.*, 1999).

III.2. Le groupe des *Archea* méthanogènes

Il s'agit d'archaebactéries anaérobies strictes, représentant environ 4% des microorganismes du rumen (Demeyer *et al.*, 2000). Des études basées sur la culture ou sur l'analyse moléculaire, ont montré que les *Archaea* méthanogènes du rumen appartiennent à la famille des *Methanobacteriaceae* (Tokua *et al.*, 1999), il s'agit fréquemment d'espèces appartenant au genre *Methanobrevibacter*. D'autres *Archaea* méthanogènes appartenant à la famille des *Methanomicrobiaceae* ont été isolées chez des bovins et des ovins. Tandis que des *Archaea* méthanogènes de la famille *Methanosarcinaceae* ont été trouvées chez les caprins et les ovins.

Les organismes à métabolisme méthanogène sont des micro-organismes qui produisent du méthane comme sous-produit métabolique de la vie en conditions anoxiques. Certaines espèces peuvent néanmoins survivre un certain temps en présence de dioxygène (Kim *et al.*, 2011).

III.3. Le génome méthanogène

Les séquençages du génome entier facilitent la compréhension de la physiologie des méthanogènes. Aujourd'hui les génomes de 18 espèces cultivées ont été séquencés ; les espèces du genre *Methanosarcina* possèdent le plus grand génome sans doute à cause de leur métabolisme assez versatile. Le génome d'une espèce non cultivée du groupe RC-I a été reconstruit et a révélé des gènes rares chez les méthanogènes, qui codent pour des enzymes impliquées dans la détoxification de l'oxygène, le métabolisme des hydrates de carbone et la sulfato-réduction. Les analyses phylogénomiques ont mis en évidence 31 protéines exclusivement présentes chez pratiquement tous les méthanogènes. Ces résultats suggèrent fortement que les *Archaea* méthanogènes forment un groupe monophylétique, excluant les autres *Archaea* (Gao & Gupta, 2007).

Les enzymes impliquées dans la méthanogenèse sont codées par des gènes exclusivement présents chez les *Archaea* méthanogènes. Seuls les méthanogènes possèdent la quasi-totalité des protéines impliquées dans la synthèse des coenzymes.

Chez les procaryotes en général, les protéines impliquées dans la synthèse des coenzymes sont plus largement distribuées que celles réalisant la méthanogenèse (duplication/pertes et/ou transferts mais pas entre méthanogènes) (**Baptiste et al., 2005**). Certaines espèces possèdent même plusieurs enzymes catalysant une seule étape de cette voie métabolique ; ces coenzymes sont conservées au cours de l'évolution probablement car elles confèrent un avantage métabolique aux méthanogènes (**Reeve et al., 1997**).

III.4. Population méthanogène du rumen

Les *Archaea* méthanogènes du rumen sont des anaérobies strictes et essentiellement des hydrogénotrophes, bien que certaines espèces peuvent occasionnellement utiliser le formate ou les méthylamines. Les *Archaea* méthanogènes constituent une petite partie de la biomasse microbienne du rumen. Parmi toutes les séquences (16S et 18S) retrouvées dans le rumen, entre 0.3 % et 3.3 % appartenaient au domaine des *Archaea* (**Lin et al., 1997 ; Sharp et al., 1998**). En parallèle, **Yanagita et al., 2000** ont rapporté que seuls 2.8 % à 4 % des microorganismes du rumen ont émis la fluorescence spécifique du cofacteur.

La population méthanogène colonise le rumen très tôt après la naissance, bien avant que le jeune ruminant ne commence à se nourrir de végétaux. Des méthanogènes cultivables ont été isolées du contenu ruminal d'agneaux âgés de 30 heures (**Morvan et al., 1994**), ou de 2 jours (**Fonty et al., 1987**). En utilisant des outils moléculaire, **Skillman et al., 2004** ont montré que la population méthanogène commence à s'installer dès le premier jour après la naissance.

La population méthanogène du rumen est caractérisée par une faible diversité, en plus de la faible densité. Au niveau moléculaire, l'analyse des séquences du gène *rrs* des *Archaea* provenant de 14 études (sur des ovins et bovins à différents stade physiologiques, recevant différentes rations) a réparti 92.3 % des méthanogènes dans trois genres *Méthanobrevibacter* (61.6 % des séquences), *Rumen Cluster C* (15.8 % des séquences) et *Methanomicrobium* (14.9 % des séquences) (**Janssen & Kirs, 2008**).

III.5. Les facteurs influençant la méthanogènes dans le rumen

Plusieurs facteurs peuvent influencer la production du méthane dans le rumen, Certains sont liés à la ration (type, quantité), d'autres sont liés à l'animal.

III.5.1. Influence de la ration

- **Influence de la digestibilité du régime**

A partir des résultats de 20 études sur moutons et bœufs adultes recevant 55 régimes sur 615 périodes de mesure en chambres respiratoires, **Blaxter & Clapperton** ont montré que les pertes d'énergie sous forme de méthane augmentent avec la digestibilité du régime : pour une augmentation de 10 points de la digestibilité de l'énergie, l'accroissement est à la moyenne de 0,47 points dans le cas de fourrages longs et de 0,74 points dans le cas de régime mixte. Cet accroissement résulte d'une augmentation des fermentations dans les réservoirs digestifs mais il dépend aussi des caractéristiques physiques et de la composition chimiques des régimes (**Blaxter & Clapperton, 1965**).

- **Influence du pH**

Une fermentation accélérée diminue le pH du rumen, avec effet négatif sur la méthanogène et les protozoaires.

- **Influence de niveau alimentaire (ingestion)**

Une augmentation des quantités d'aliments ingérées entraîne une accélération du transit digestif, donc une réduction de la digestion microbienne des parois végétales dans les réservoirs digestifs. Ce phénomène s'accompagne d'une diminution de la production de méthane. Pour les rations mixtes, le phénomène est d'autant plus important que le régime est riche en produits amylacés et en fourrage lignifié

- **Influence de type de substrat (ration de base de l'animal)**

Moins de méthane est formé à partir de protéine qu'à partir des glucides. Une infusion des glucides facilement fermentescibles dans le rumen diminue le méthane en faveur du propionate. Ce changement est sans doute dû à une vitesse de fermentation accélérée, associée à une population microbienne modifiée.

Un régime à base de mélasse ou d'amidon, conditionné pour une ingestion limitée des glucides facilement fermentescibles, résultera dans un taux de protozoaires plus élevé une production plus élevée de butyrate qui s'accompagne généralement d'une diminution de la production de méthane. L'addition ou la substitution partielle d'aliment concentré à un

fourrage peut modifier les conditions fermentaires dans le rumen. En particulier, lorsque l'aliment est riche en produits amylacés, il peut orienter la flore microbienne vers les fermentations amylolytiques au détriment des fermentations cellulolytiques. Ce phénomène entraîne alors une diminution de la digestibilité des parois et des pertes d'énergie sous forme de méthane (**Bicaba, 1991**) (**Tableau VI**).

Tableau VI : Influence de différents régimes sur le profil fermentaire (mol/kg MOF) obtenus à partir du contenu de rumen des moutons (**Bicaba, 1991**).

Régimes	Méthane	Acétate	propionate	Butyrate
Foin+Concentré	1.54	5.32	3.70	1.11
Paille+maïs+ tourteaux de soja	2.83	7.26	1.58	0.81
Paille+maïs +urée	2.32	6.28	2.56	1.16
Paille+maïs	2.85	7.32	1.66	0.76

- **Influence de la vitesse de fermentation**

Une vitesse plus élevée diminue la proportion de méthane produit en faveur de la proportion de propionate.

III.5.2. Influence de l'animal

Il a été montré que la méthanogenèse présentait des variations significatives, lorsque le contenu du rumen est prélevé avant le repas, sur plusieurs moutons alimentés avec une même ration à base de foin. Ces différents profils sont, sans doute, liés à des populations microbiennes ruminales différentes, dont la nature pourrait être déterminée par la cinétique de salivation et donc de vidange du rumen (**Tone et al., 1992**). La méthanogenèse varie entre 2,10 et 3,45 moles de méthane / kg de matière organique fermentée avec le contenu du rumen obtenu avant le repas de trois moutons alimentés de la même ration limitée à base de foin (**Demeyer, 1991**).

- **Influence du taux de protozoaires dans le rumen**

L'activité des protozoaires est un paramètre non seulement déterminé par la nature et le niveau de l'alimentation mais aussi par le contrôle animal de la cinétique et le volume du contenu de

rumen. La présence de protozoaires dans le rumen est associée à des taux importants de méthanogenèse.

- **Variabilité intra et inter-individuelle**

Les mesures effectuées dans la chambre respiratoire pendant 4 à 5 jours consécutifs sur 36 moutons de races différentes recevant la même quantité d'aliment par kg de poids métabolique montrent que les coefficients de variation intra et inter-individuelle de la production de méthane sont de 5,0 et 7,5 respectivement et qu'il n'y a pas de différence significative entre les 6 races (**Blaxter & Clapperton, 1965**).

IV. La réduction des émissions du méthane chez les ruminants

Toute orientation fermentaire qui augmentera l'utilisation de l'hydrogène métabolique ou qui en diminuera la production sera utile pour réduire la méthanogenèse. Cette évolution pourra être obtenue en agissant de manière spécifique par le contrôle de la population microbienne à l'aide d'additifs ou de manière plus globale au niveau de la ration et de l'animal.

IV.1. L'utilisation des antibiotiques

Les antibiotiques (monensine, lasalocide, salinomycine, avoparcine) ont une action inhibitrice significative sur les bactéries à Gram positif (**Stewart *et al.*, 1988**) qui produisent des quantités importantes d'hydrogène. La sélection microbienne qui en résulte favorise la formation du propionate et diminue celle du méthane (**Bogaert *et al.*, 1989**). L'effet inhibiteur des antibiotiques sur la méthanogenèse se maintient habituellement pendant plusieurs mois (**Jouany *et al.*, 1997**).

La mise en évidence d'une résistance à la vancomycine, antibiotique utilisé en milieu hospitalier pour lutter contre des pathogènes résistants aux antibiotiques traditionnels, a été attribuée à l'utilisation abusive de l'avoparcine comme facteur de croissance en production animale. Ce constat a conduit les autorités sanitaires de l'Europe à interdire la totalité des antibiotiques comme additif alimentaire à partir du 1er janvier 2006, ce qui condamne définitivement l'utilisation de ces produits en alimentation animale.

IV.2. Manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal

IV.2.1. L'élimination des protozoaires du rumen

L'élimination des protozoaires du rumen permet à la fois de diminuer la production d'hydrogène et de supprimer la fraction d'*Archaea* méthanogènes fixée à la surface et dans les

cellules des protozoaires ciliés, ce qui explique la baisse de la méthanogenèse de 30 à 45% généralement observée après défaunation du rumen (**Vermorel & Jouny, 1989**). Cependant, des études récentes conduites à l'INRA ont montré que l'effet de la défaunation sur la production de méthane disparaît après une longue période (environ 12 mois selon **Ranilia et al., 2004**). En outre, la défaunation améliore la digestion de l'azote mais diminue celle des parois végétales.

Sur un plan pratique, la défaunation peut être obtenue à l'aide d'agents chimiques doués de pouvoir tensio-actif puissant (**Argyle & Forster, 1988**), d'extraits de plantes riches en saponines, ou de certains acides gras (**Dohme et al., 2001**). Il est vraisemblable que les agents chimiques ou les saponines utilisées pour défauner ne seront pas autorisés compte tenu de leur toxicité potentielle à l'égard des animaux et de leur possible transfert dans les produits animaux destinés à la consommation humaine. Par ailleurs, ces produits devront être traités à l'avenir comme des additifs alimentaires avec toutes les contraintes réglementaires que cela impose si une allégation est revendiquée concernant leurs propriétés biologiques.

IV.2.2. Les agents biologiques

L'effet des probiotiques sur la production de méthane est difficile à apprécier car les résultats bibliographiques sont variables. Certains auteurs ont mis en évidence une diminution de la méthanogenèse chez les animaux traités par *Aspergillus oryzae* (**Frumhoiz et al., 1989**) ou *Saccharomyces cerevisiae* (**Mutsvagwa et al., 1992**) ; d'autres n'ont pas observé d'effet (**Mathieu et al., 1996**) ou ont noté une augmentation de la production de méthane (**Takahshiet et al., 1997**). Il faut cependant préciser que peu d'études ont été entreprises jusque là sur les probiotiques avec l'objectif ciblé de réduire la méthanogenèse.

L'ajout de bactéries acétogènes dans le rumen stimule la voie d'acétogenèse réductrice à la condition stricte que les bactéries méthanogènes aient été préalablement inhibées par l'ajout de BES (**Nollet et al., 1997**).

Une compétition existe entre les bactéries méthanogènes et acétogènes pour l'utilisation de l'hydrogène dans le rumen et les méthanogènes sont toujours dominantes.

La faible affinité des acétogènes pour l'hydrogène en comparaison de celle des méthanogènes d'une part, et leur caractère hétérotrophe qui les incite à utiliser d'autres sources de carbone que le CO₂ d'autre part, sont à l'origine de la faible contribution des acétogènes à la fixation de l'hydrogène ruminal. **Joblin (1999)** a proposé différents moyens susceptibles de stimuler l'activité des acétogènes qui concurrencerait significativement celle

des méthanogènes mais l'auteur considère qu'il est prématuré d'envisager une telle solution sur le plan pratique.

Une technique de vaccination de ruminants contre les méthanogènes a été développée en Australie au cours des 5 dernières années. Elle a permis de réduire de 8% la production de méthane sans effet négatif apparent sur les animaux (**Wright *et al.*, 2004**).

Le vaccin ne serait toutefois efficace que sur une fraction des *Archea* méthanogènes (**Hegarty, 2001**) et l'effet à long terme n'est pas connu.

IV.3. L'utilisation des additifs chimiques

Les diacides organiques (aspartate, malate ou fumarate) sont des précurseurs potentiels de succinate et de propionate qui peuvent donc être utilisés pour diminuer la méthanogénèse lorsqu'ils sont ajoutés à la ration des ruminants (**Callaway & Martin, 1996**). Si l'on admet une efficacité de fixation de l'hydrogène de 60% par les diacides organiques, il serait nécessaire de supplémenter les rations avec plus de 2 kg d'acide pour réduire de 10% la production de méthane chez une vache laitière rejetant 500 litres de méthane par jour (**Newbald & Rode, 2006**), ce qui est inapplicable en raison des conséquences sur le pH ruminal et du coût du traitement. Différentes solutions sont en cours d'étude pour pallier ce problème. Récemment, ont étudié l'effet d'une encapsulation de l'acide fumarique.

Comparé au lot témoin d'agneaux, le produit encapsulé distribué à hauteur de 10% de l'ingéré a entraîné une diminution de 75% de la production de CH₄ et une augmentation de l'efficacité alimentaire de 20% (gain de poids (g) par kg ingéré).

De nombreux autres additifs chimiques ont été testés comme par exemple les peptides riches en acides aminés soufrés (thiopeptine, thiopeptide A 10255), les 9,10 anthraquinones, l'acide 2-bromoethanesulfonique (BES), les analogues halogénés du méthane (chloroforme, hydrate de chloral, bromochlorométhane, bromure de méthylène) ou encore les sulfates et nitrates. Mais ces différents additifs sont peu prometteurs en termes d'utilisation sur le terrain pour le moment, car leur efficacité *in vivo* est mal connue, limitée et/ou transitoire, et le risque de toxicité qu'ils présentent est potentiel ou prouvé.

IV.4. L'utilisation des extraits de plantes

De nombreux essais sont actuellement conduits dans le monde sur les extraits des métabolites secondaires des plantes, utilisés comme moyen de manipuler la fonction digestive des ruminants.

Certaines plantes ou extraits de plantes peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales par leurs propriétés bactéricides et avoir des effets voisins de ceux obtenus avec les antibiotiques (**Busquet *et al.*, 2005**). Contrairement aux antibiotiques et aux additifs chimiques, ce type de produit bénéficie d'une bonne image en raison d'une origine naturelle. Les études sur les extraits végétaux ont été réalisées essentiellement *in vitro*. Ainsi, les extraits d'ail, de piment, de yucca et de cannelle (**Cardozo *et al.*, 2004**), de rhubarbe et de bourdaine (**Garcia-Gonzalez *et al.*, 2006**), le sérum de luzerne obtenu après pressage de luzerne fraîche et élimination des protéines par floculation (**Jouany *et al.*, 2005**) ont provoqué une diminution de la méthanogenèse.

Une technique de vaccination de ruminants contre les méthanogènes a été développée en Australie au cours des 5 dernières années. Elle a permis de réduire de 8% la production de méthane sans effet négatif apparent sur les animaux (**Wright *et al.*, 2004**).

Le vaccin ne serait toutefois efficace que sur une fraction des *Archea* méthanogènes (**Hegarty, 2001**) et l'effet à long terme n'est pas connu.

V. La réduction du méthane par l'utilisation des produits nitreux

Lorsque les micro-organismes du rumen fermentent la matière organique, ils génèrent le cofacteur NADH réduit qui reste en équilibre avec le H₂. Chez les ruminants, le H₂ est normalement éliminé par la réduction de CO₂ pour former du méthane. Cependant, les produits nitreux (Présent dans certains pâturages fourrage frais) présentent une plus grande affinité pour le H₂ que le CO₂ et, quand ils sont présents, le H₂ est d'abord utilisé dans la réduction du NO₃⁻ au NO₂⁻ et de NO₂⁻ au NH₃ ce qui réduit la production de méthane. (**Nolan *et al.*, 2010**).

V.1. L'utilisation du nitrate

Plusieurs produits chimiques ou substances, évaluées à réduire la production ruminale de CH₄. Le nitrate, un sel inorganique simple avec un potentiel redox élevé, a également été montré pour être efficace dans la réduction de la production du méthane par le microbiote ruminal *in vitro* (**Zhenming *et al.*, 2012**).

Le nitrate peut effectivement et durablement réduire la production de CH₄ par le microbiote ruminal complexe. Certains de ces effets négatifs, tel que l'inhibition de l'activité cellulolytique, peut être surmonté dans une certaine mesure en opérations d'alimentation à long terme. L'addition du nitrate augmente la production d'ammoniac dans le rumen (**Sar et al., 2005**). Le nitrate peut remplacer certaines protéines alimentaires, lorsqu'il est combiné avec d'autres produits chimiques tel que le sulfate ; il peut être une alternative efficace pour atténuer les émissions de CH₄ des bovins. (**Zijderveld et al., 2011**).

$4H_2 + HCO_3^- + H^+ \rightarrow CH_4 + 3H_2O$	$\Delta Go' = -175 \text{ kJ/reaction}$
$NO_3^- + 2H^+ + 4H_2 \rightarrow NH_4^+ + 3H_2O$	$\Delta Go' = -598 \text{ kJ/reaction}$

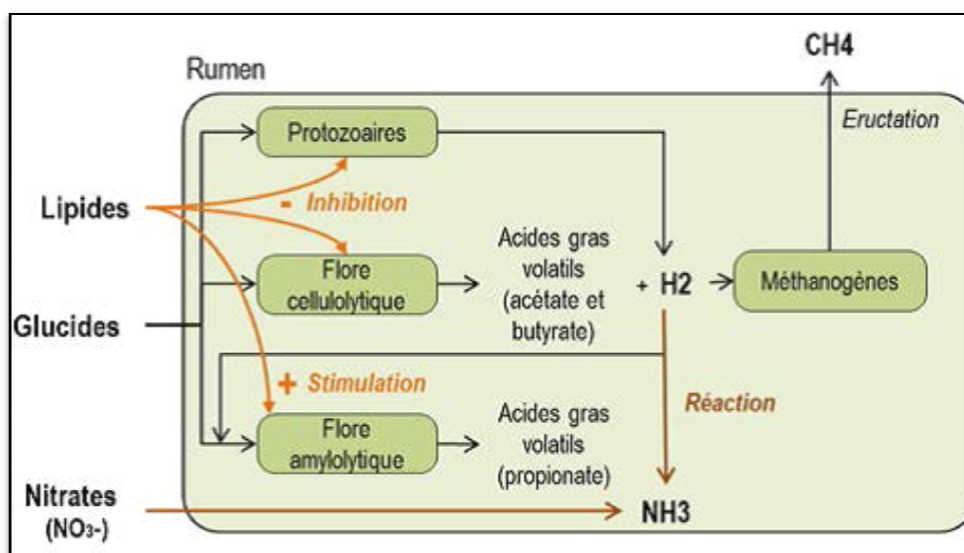


Figure 06. Fonctionnement du rumen et modifications induites par l'ajout de nitrate dans la ration (**Pellerin et al., 2013**).

V.2. L'utilisation du nitrate et le sulfate

L'addition de sulfate à l'alimentation des ruminants conduit à une réduction de 16 % de la production journalière du méthane. La réduction du sulfate en sulfure d'hydrogène consomme aussi 8 électrons et offre ainsi le même potentiel par mole que la réduction de méthane par le nitrate. La réduction du sulfate est plus favorable que la méthanogénèse. (**Ungerfeld & Kohn, 2006**).

Zijderveld *et al.*, 2010 ; ont montré que la consommation de 25,8 g sulfate / j par les moutons, correspondrait à une réduction de méthane de 4,3 g/j si tout a été converti en H₂S. La diminution réelle observée en méthane était 2,9g/jour, ce qui correspond à une réduction de 67% du méthane total.

La compétition pour l'hydrogène entre la réduction de sulfate et la méthanogénèse a été étudiée dans des digesteurs anaérobies.

Isa *et al.*, (1986) ont conclu de leur expérience que la diminution de la production de méthane à partir de l'addition du sulfate est dépendante à la fois de la concentration en sulfate dans le milieu et du temps de séjour à l'intérieur du digesteur. L'augmentation du temps de séjour de 0,5 à 10 jours dans le digesteur augmente le flux des électrons de méthanisation à la réduction du sulfate.

I. Le matériel

I.1. L'échantillonnage

Notre étude *in vitro* était effectuée en utilisant le jus de rumen des ovins comme inoculum ; deux échantillons différents ont été prélevés, le premier pour l'étude de la flore bactérienne du rumen et le deuxième pour le dosage de la réduction de méthanogènes.

I.1.1. Echantillonnage pour l'isolement bactérien

Les tests bactériologiques sont effectués sur un jus de rumen prélevé d'un ovin fistulé d'âge d'une année et demi. La fistulation était réalisée au niveau de l'association scientifique de médecine vétérinaire ; institut de vétérinaire université de Batna. Les prélèvements sont effectués par des seringues stériles et conservés dans des flacons stériles (**figure 07**) ; puis transportés dans une glacière à 4°C aux laboratoires pédagogiques de l'université de Khenchela.

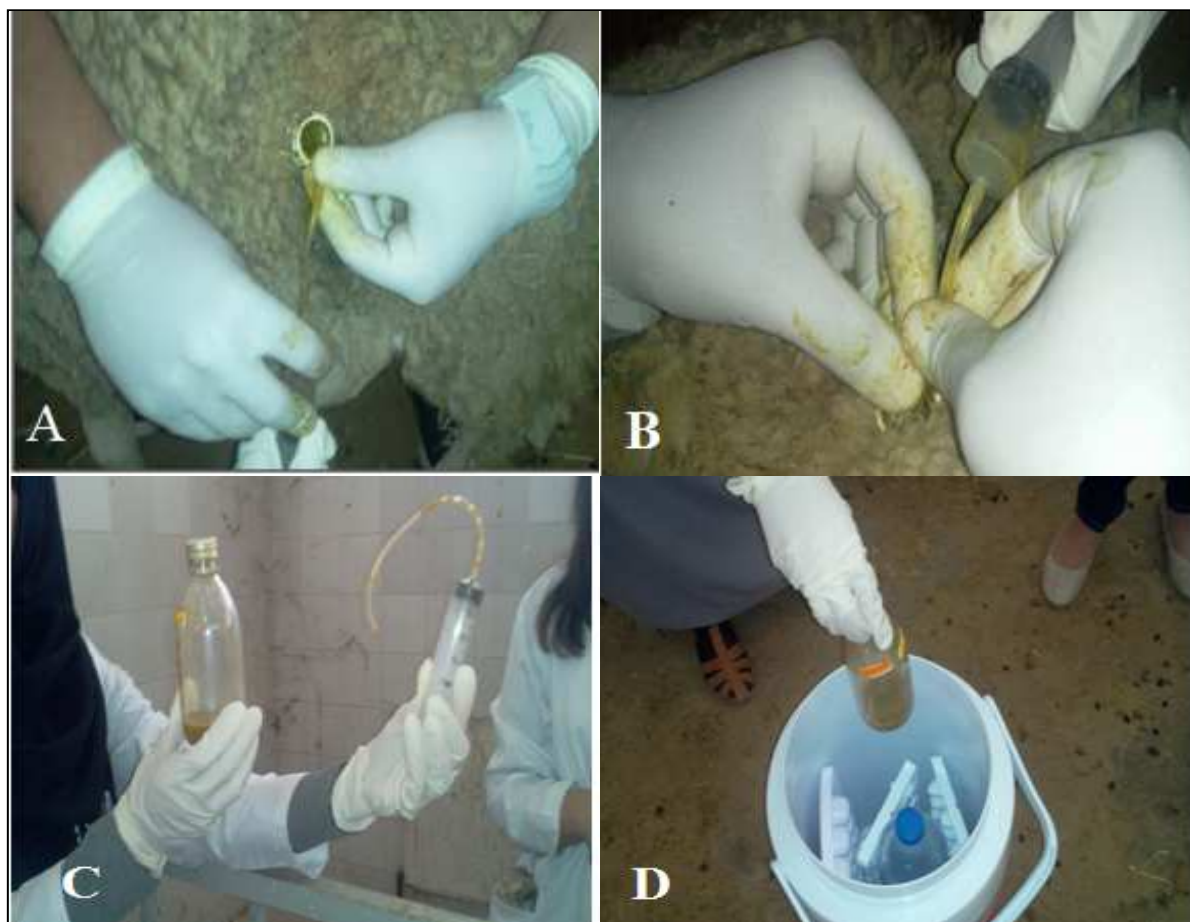


Figure 07. photo de prélèvement de jus rumen de l'animale fistule

A et B : prélèvement, C: flacons et seringues stériles, D: Conservation des prélèvements dans une glacière à 4°C

I.1.2. Echantillonnage pour le dosage du méthane

Les animaux utilisés pour le prélèvement du jus de rumen sont des ovins appartenant à la race d'Ouled Djellel. Ces animaux ont un régime alimentaire reposant essentiellement sur le pâturage sur les parcours naturels et sur le foin de vesce avoine. Ils sont sacrifiés à l'abattoir de Khenchela à des fins commerciales.

Le contenu de rumen des ovins abattus est collecté juste après l'éviscération puis il est filtré à travers 4 couches de gaze chirurgicale puis directement transféré dans des Thermos préchauffés à 39 C° selon la méthode de (Nicolie *et al.*,1987), le processus de filtration permet de récupérer une bonne partie la fraction microbienne libre dans le liquide ruminal (**figure 08**), ils sont hermétiquement fermés et transférés directement au laboratoire où ils sont traités au plus tard dans les 2 heures qui suivent la collecte.



Figure 08. Photographie de prélèvement de jus rumen pour le dosage de gaz.

I.2. Les milieux de culture

I.2.1. Les milieux d'isolement bactérien

Quatre milieux de culture sont utilisés pour tester la présence de quelques germes dans le jus de rumen d'un ovin vivant (fistulé). Ces milieux de cultures sont ; gélose nutritive, la gélose Hektoen (pour les Gram négatifs), gélose au sang (pour les germes exigeants), et la gélose Chapmann (pour les *Staphylococcus*). La composition de chaque gélose est détaillée dans l'annexe 1.

I.2.2. La salive artificielle

La salive artificielle est une solution minérale qui joue le rôle d'une part d'un tampon et d'autre part, elle constitue un apport de sels minéraux et d'oligoéléments aux microorganismes du rumen. Elle est préparée selon les procédures décrites par (Menke & Steingass, 1988). Elle se compose d'un mélange de différentes solutions (tableau VII).

Tableau VII. Les solutions utilisées dans la préparation de la salive artificielle (Menke & Steingass, 1988)

Solution	Composition	Quantité
Solution des éléments majeurs	Na ₂ HPO ₄	5.7 g
	KH ₂ PO ₄	6.2 g
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.6 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution des éléments traces	CaCl ₂ ×2H ₂ O	13.2 g
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	10.0 g
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	1 g
	FeCl ₂ ×6H ₂ O	0.8 g
	Eau distillée	100 ml
Solution tampon	NaHCO ₃	35 g
	(NH ₄) HCO ₃	4 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution de Resazurine	C ₁₂ H ₆ NO ₄	100 mg
	Eau distillée	100 ml
Solution réductrice	Na ₂ S×7H ₂ O	285 mg
	NaOH (1N)	2 ml
	Eau distillée	47.5 ml

II. L'étude expérimentale

II.1. Etudes physicochimiques de jus de rumen

Le milieu ruminal se distingue par un ensemble de caractéristiques physico-chimiques dont l'effet peut être favorable ou non au fonctionnement du rumen et aux microorganismes qu'il héberge. La température, le pH, le potentiel d'oxydo réduction ont été étudiés sur le contenu ruminal des ovins qui ont servi de donneurs de liquide ruminal au cours des différents essais.

II.1.1. Mesure de la température

La température du liquide ruminal est relevée directement après le prélèvement du jus de rumen à l'aide d'un **thermomètre** (MICROLIAF).

II.1.2. Mesure du pH

Le pH est un paramètre habituellement mesuré dans les études nutritionnelles, car il a toujours été considéré comme central pour comprendre les processus de digestion dans le rumen par son influence sur le type et l'intensité des réactions qui s'y déroulent (**Bonnefont, 2008**).

Le pH du liquide ruminal est relevé directement après son arrivée au laboratoire à l'aide d'un **pH mètre** (HANNH instrument) portable à électrode en verre préalablement étalonné.

II.1.3. Mesure de la matière sèche

Elle est déterminée par dessiccation dans une étuve maintenue à 105°C jusqu'à ce que le poids devienne constant. La différence de poids correspond à la perte d'humidité et le résidu caractérise la teneur en matière sèche de l'échantillon. Toutes les analyses sont effectuées en triple.

Afin de déterminer le taux de la matière sèche, une quantité (5 à 10 g) du liquide ruminal homogénéisé est pesée dans des boîtes de Pétri préalablement séchées et tarées, elles sont par la suite placées dans une étuve maintenue à 105°C pendant 24 heures jusqu'au poids constant (**Amokrane, 2010**).

La matière sèche (MS) est calculée selon l'expression suivante :

$$\% \text{ MS} = (P_2 - T) / P_1 \times 100$$

Où : P_1 : représente le poids de la boîte de pétri avant séchage (tare + quantité du liquide ruminal fraîche) (g).

P_2 : représente le poids de la boîte de pétri après séchage (tare + résidus) (g).

T : représente le poids de la boîte de Pétri vide (tare) (g).

II.2. L'isolement bactérien

Pour tester la présence de quelques genres bactériens dans le jus de rumen, une série de dilution standard est effectuée, un échantillon de chaque tube de dilution est ensemencé à la suite sur quatre géloses ; la gélose nutritive, la gélose Hektoen (pour les Gram négatifs), gélose au sang (pour les germes exigeants), et la gélose Chapman (pour les *Staphylococcus*) et incubé à 37°C pendant 24h (**figure 09**).

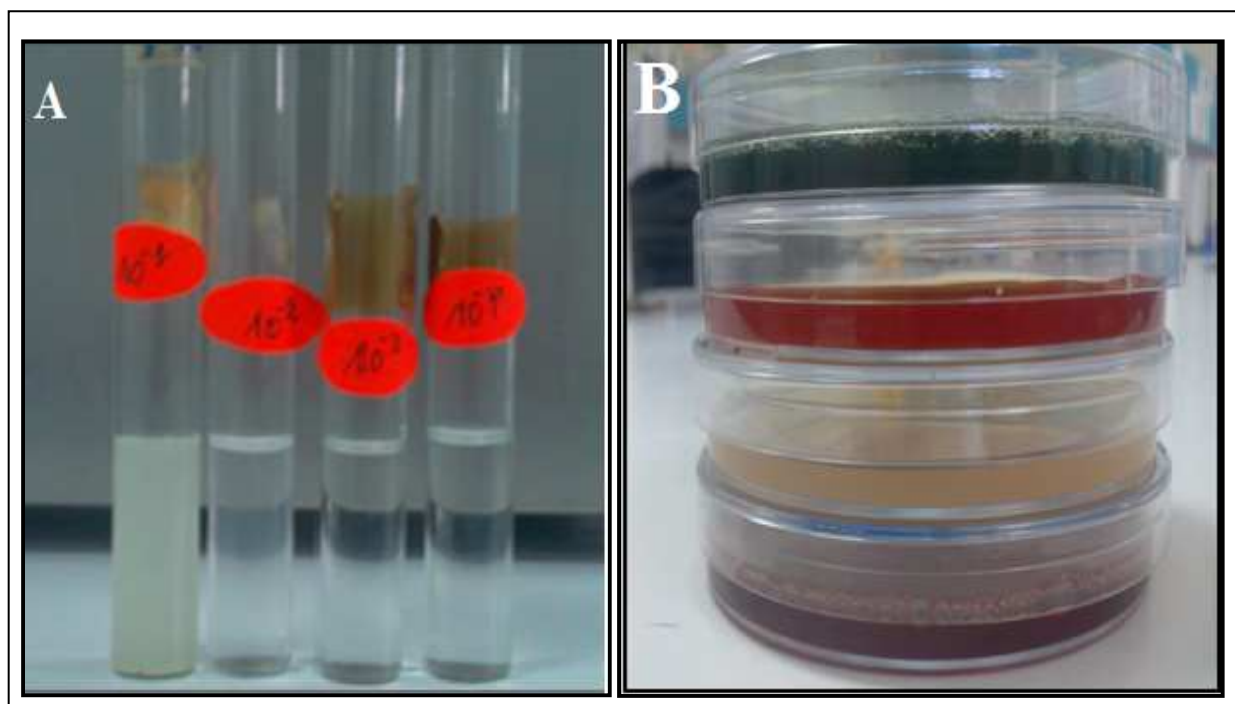


Figure 09. Photographie de l'isolement bactérien.

A. Les tubes de dilutions ; B. Les boîtes ensemencées

III. Réduction du méthane

III.1. Mesure de la production de gaz *in vitro*

La technique de mesure de la production de gaz *in vitro* a été réalisée en suivant les étapes suivantes :

1^{ère} étape : préparation de la salive artificielle.

2^{ème} étape : mélange de la salive artificielle avec le contenu ruminal.

3^{ème} étape : réalisation de l'inoculation et l'incubation.

4^{ème} étape : vidange des seringues après 72 heures d'incubation.

III.1.2. Principe de la technique

La technique d'incubation *in vitro* est une simulation de la digestion des aliments par les microorganismes dans le rumen. Elle est basée sur la fermentation en anaérobiose du substrat avec un mélange de jus de rumen et d'une solution tampon (Menke & Steingass, 1988).

Le jus de rumen constitue l'inoculum de la flore ruminale et permet de restaurer en partie les conditions chimiques du rumen. Le suivi de la fermentation se fait, soit par la mesure de production des produits terminaux (CO₂ et CH₄), soit par la mesure de la digestibilité par référence à un substrat standard (Arhab, 2000).

Dans notre étude, nous avons retenu la production de gaz dans ses aspects quantitatifs et qualitatifs (CH₄ et CO₂) ainsi que la digestibilité en présence de Nitrate, de l'urée et du tryptophane.

La fermentation est réalisée dans des seringues en polypropylène de 60 ml de capacité. Le bout de la seringue est connecté à un tuyau en téflon de 5cm de longueur, fermé avec une pince pour éviter la sortie des gaz produits lors de la fermentation. Les pistons des seringues sont préalablement lubrifiés avec de la vaseline ou la silicone pour faciliter leurs mouvements et prévenir l'échappement de gaz.

III.1.3. Préparation de la salive artificielle

La majorité des composants de la salive naturelle ou artificielle sont les sels qui sont surtout : les bicarbonates de sodium ou de potassium et aussi hydrogène de phosphate et de chlore.

Les caractéristiques les plus importants d'une salive jusqu'ici peuvent être définies par quatre facteurs qui sont :

- La quantité des phosphates représentée par hydrogène-phosphate (HPO₄).
- La quantité de bicarbonate (HCO₃⁻).

- La quantité du chlore (Cl^-)
- Le rapport sodium / potassium (Na^+ / K^+).

Chaque élément a un rôle métabolique définis, les bicarbonates est un tampon efficace à des valeurs de pH qui se rapprochent de 6,5 (**Rymer *et al.*, 1999**). Le dioxyde de carbone est utilisé par les méthanogènes comme un accepteur d'électron. Les phosphates contribuent aussi au tamponnage du milieu, le phosphore est un constituant des acides nucléiques (bactériens), des phospholipides et des coenzymes.

L'approvisionnement en chlorures de potassium et de sodium change la pression osmotique. Le potassium est le cation majeur des cellules bactériennes et qu'il entre comme un cofacteur pour certaines enzymes comme le phosphohexokinase. Les quantités des bicarbonates ainsi que celle des phosphates ont une influence sur le taux des fermentations en changeant le pH salivaire avec une valeur maximale à pH 7 (**Rymer *et al.*, 1999**).

III.1.3.1.Méthode de préparation

Il faut un mélange de cinq solutions (**annexe 02**) :

La solution A (solution de micro-éléments),

La solution B (solution tampon),

La solution C (solution de macro- éléments),

La solution D (indicateur du potentiel redox).

La solution E (solution réductrice).

Le brassage est maintenu à 39° C puis un barbotage est assuré en profondeur par un flux contenu de CO_2 jusqu'au virage de la coloration bleu vers le rose pour devenir finalement incolore (**Figure 10**). A ce moment, le jus de rumen filtré est ajouté dans un rapport avec la salive artificielle. Un barbotage en surface est maintenu 15 min pour maintenir une atmosphère totalement anaérobie (**Boussaada. 2011**).

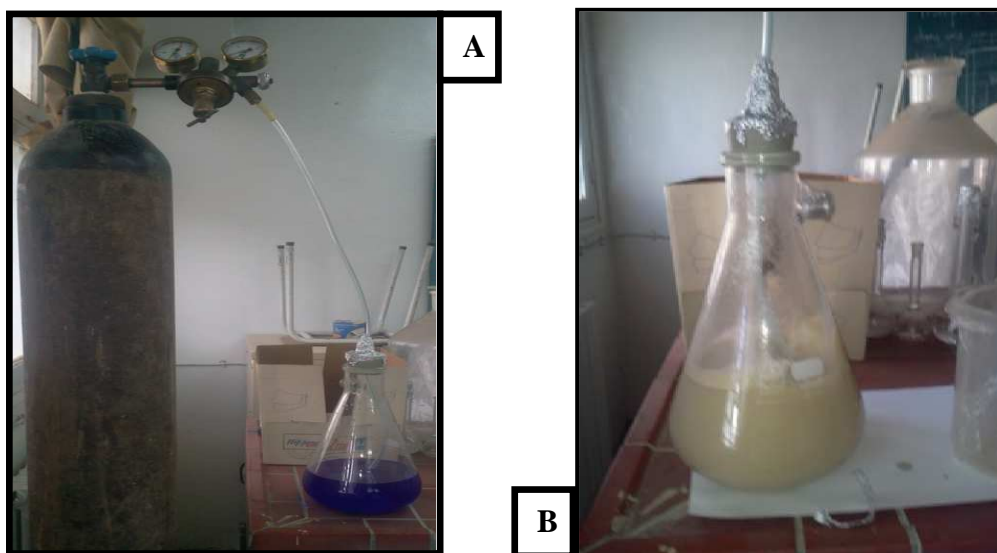


Figure 10. Préparation de la salive artificielle.

A. *Barbotage de la salive artificielle*, B. *La salive artificielle+ le jus de rumen après barbotage.*

III.1.3.2. Inoculation

La réduction du méthane est testée en présence de **0,2g** du substrat (amidon de blé) ; trois additifs à base de nitrates sont ajoutés avec différentes concentrations ; Nitrate de sodium, l'urée et le tryptophane, et mis à fermenter avec **30 ml** du mélange (**10 ml** de jus de rumen + **20 ml** de salive artificielle) (**Figure 11**). Les concentrations utilisées pour chaque additif sont : 1M, 0.2M et 0.5M ; avec deux répétitions pour chaque concentration. Dans les mêmes conditions, deux seringues sans substrat et sans additif (jus de rumen + salive artificielle) sont incubées comme un blanc, deux autres seringues avec seulement le substrat sont incubées comme témoins.



Figure 11. Photographie du système de fermentation en batch.

III.1.3.3. Incubation

Les seringues inoculées sont horizontalement incubées dans une étuve et à 39°C pendant 72 heures.

Le suivi de la cinétique de fermentation est réalisé par la mesure du volume total des gaz produits lors de la fermentation. Il est indiqué par le déplacement du piston sous la pression des gaz libérés à différents intervalles de temps: 72 heures. Le gaz produit est mesuré par une lecture visuelle des graduations présentes sur la face de chaque seringue. La production réelle de gaz dans chaque seringue correspond à la production de gaz après 72 heures soustraite du volume de gaz enregistré à t₀ et celui du volume de gaz moyen produit par le blanc. La fermentation est cependant arrêtée après 24h pour l'estimation de la production qualitative des gaz (CH₄ et CO₂) (Boussaada, 2011).

III.1.4. Analyse quantitative de la phase gazeuse

La production réelle de gaz dans chaque seringue correspond à la production de gaz après 72 heures soustraite du volume de gaz enregistré à t₀ et celui du volume de gaz moyen produit par le blanc.

$$\text{PTG (ml)} = V_{72} - V_0 - V_b$$

PTG : production total de gaz ;

V₇₂ : production de gaz enregistré après 72h ;

V₀ : production de gaz enregistré à t₀ ;

V_b : production de gaz enregistré par le blanc.

III.1.5. Analyse qualitative de la phase gazeuse

L'analyse qualitative et quantitative des gaz fermentés est réalisée selon la méthodologie décrite par (Jouany, 1994). Elle consiste à injecter 4 ml d'une solution alcaline d'hydroxyde de sodium (NaOH 1N). Ce dernier absorbe le CO₂, ce qui entraîne la rétraction du piston. Par différence entre le volume total de gaz produit et le volume de CO₂, la production de méthane est déduite.

$$V_{\text{CH}_4} = V_{\text{NaOH}} - V_{\text{liq}} \quad \text{et} \quad V_{\text{CO}_2} = V_t - V_{\text{CH}_4}$$

V_{CH₄} : volume de méthane ;

V NaOH : volume enregistré après injection de la soude ;

V liq : volume de liquide ;

VCO₂ : volume de gaz carbonique ;

V_t : volume total de gaz produit.

I. L'isolement des bactéries ruminales

Quatre milieux de culture sont utilisés pour tester la présence de quelques germes dans le jus de rumen.

I.1. L'isolement sur la gélose nutritive (GN)

Après l'ensemencement sur le milieu GN et l'incubation à l'étuve à 37°C pendant 24 heures, les colonies bactériennes, sont rondes et de coloration blanchâtre. Le nombre des colonies est différent selon les dilutions (dans les biotes A, B, C, D) (**Figure12**).

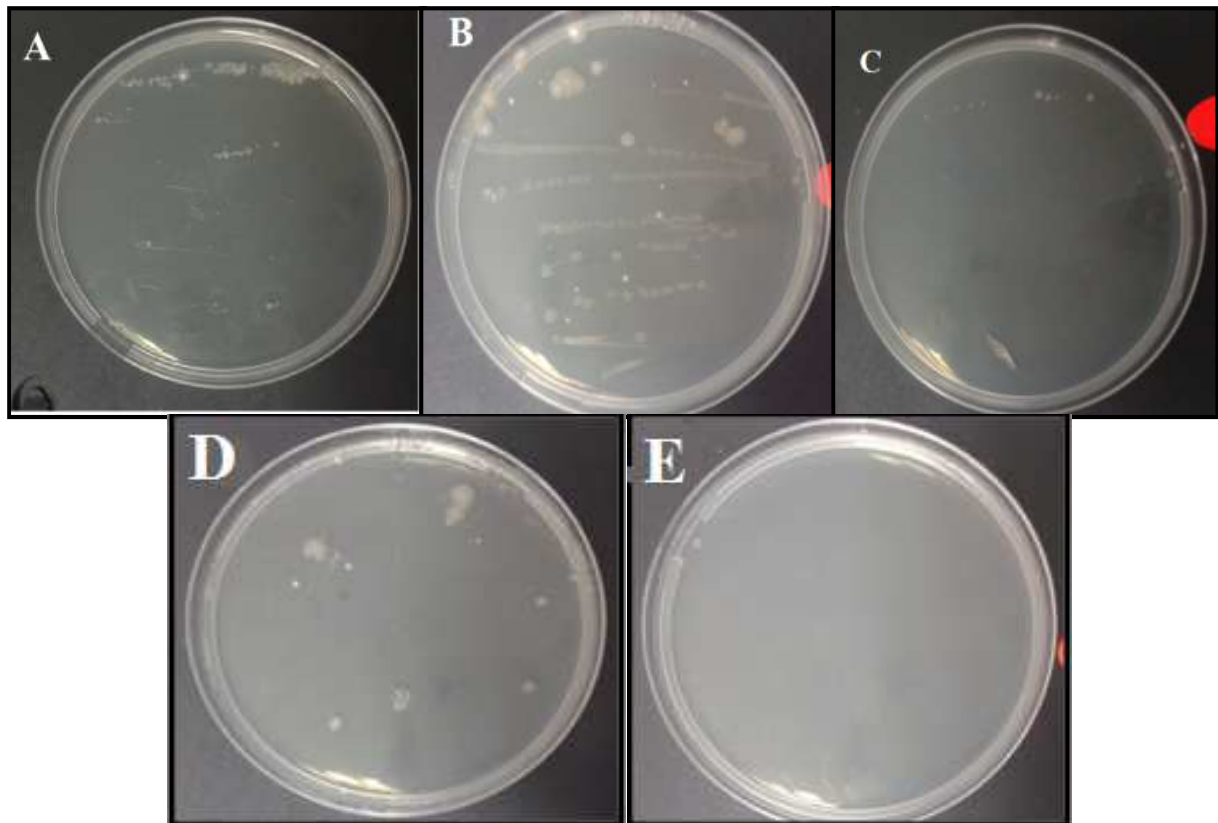


Figure12. Photographies des boites ensemencées après 24h (gélose nutritive)

A. la solution mère; B. dilution 10^{-1} ; C. dilution 10^{-2} ; D. dilution 10^{-3} ; E. dilution 10^{-4}

La croissance bactérienne sur la gélose nutritive indique la présence des bactéries aérobie anaérobie facultatives dans le jus de rumen. Le jus de rumen est constitué des bactéries anaérobies strictes, mais il existe également des bactéries anaérobies facultatives qui représentent 10^7 - 10^8 cellules/g du contenu du rumen. (**Kamara, 2005**).

I.2. L'isolement sur la gélose Chapmann (Chap.)

Après l'ensemencement sur le milieu gélose Chapmann et l'incubation à 37°C/24h, des colonies bactériennes ont poussé (**Figure 13**); la coloration de Gram de ces colonies a

indiqué que sont des bactéries Gram positif ; ces résultats montrent la possibilité de la présence des *Staphylococcus* dans le jus de rumen. **Kamara, 2005** a montré que la taille des bactéries du rumen est généralement de 0.5 à 10 μm . Les bactéries Gram⁻ sont les prédominantes et les Gram⁺ sont ainsi présentes, et jouent des rôles très importants dans la digestion ruminale.

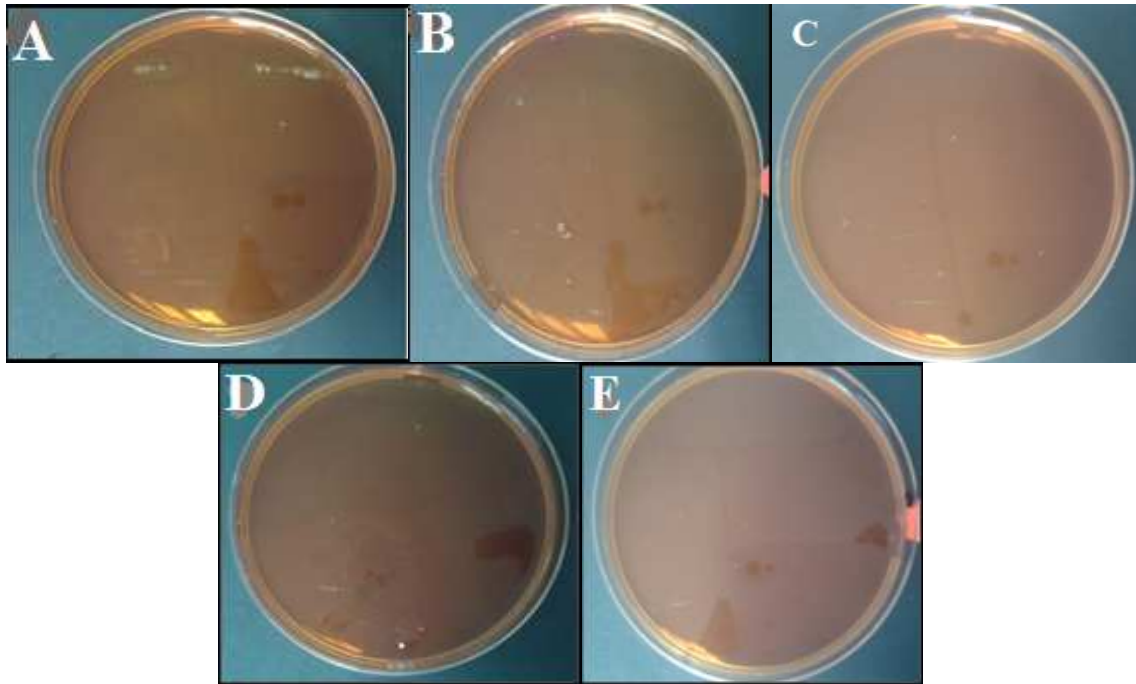


Figure13. Photographies des boîtesensemencées après 24h (gélose Chapman).
A.la solution mère; B. dilution 10^{-1} ; C. dilution 10^{-2} ; D. dilution 10^{-3} ; E. dilution 10^{-4}

I.3. L'isolement sur la gélose Hektoen.

Après l'ensemencement sur le milieu gélose Hektoen et l'incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies bactériennes jaunes et d'autres vertes ont poussé dans les boîtesensemencées par la solution mère et les boîtesensemencées par les dilutions (10^{-1} , 10^{-2}), tandis qu'aucune colonie n'apparaît dans les boîtesensemencées par les dilutions (10^{-3} et 10^{-4}) (**Figure14**). L'ensemencement dans ce milieu de culture montre la présence d'une variété de germes exigeants dans le jus de rumen. Les colonies jaunes indiquent la présence de germes qui utilisent un ou plusieurs glucides, et les colonies vertes indiquent la présence de germes qui n'utilisent aucun glucide présent dans le milieu. L'absence de colonies dans les boîtesensemencées par les dilutions (10^{-3} et 10^{-4}) revient à la quantité minimale de ces germes dans le rumen parce que la majorité de la flore bactérienne ruminale sont des bactéries anaérobies strictes.

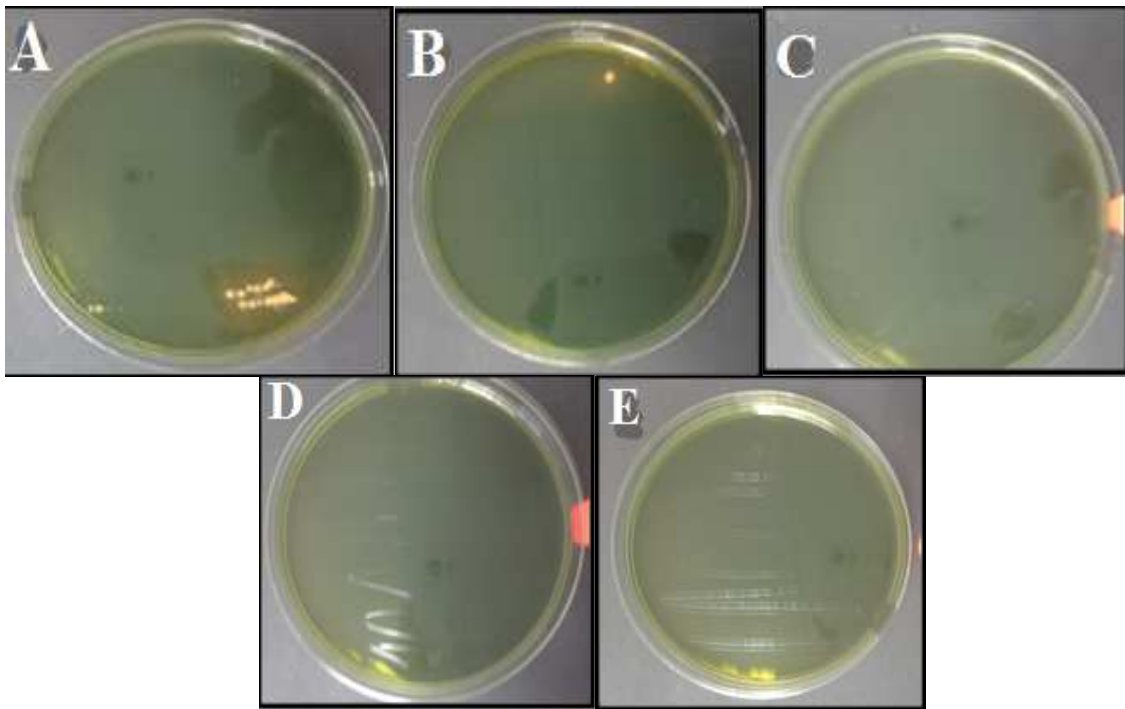


Figure14. Photographies des boîtesensemencées après 24h (gélose Hektoen)
A. la solution mère; *B.* dilution 10^{-1} ; *C.* dilution 10^{-2} ; *D.* dilution 10^{-3} ; *E.* dilution 10^{-4}

I.4. L'isolement sur la gélose au sang

Après l'ensemencement sur le milieu gélose au sang et l'incubation à l'étuve à $37^{\circ}\text{C}/24\text{h}$, quelques colonies bactériennes blanches-grisâtres, bombées avec une bordure régulière ont poussé dans les trois premières boîtes (de la solution mère, de la dilution 10^{-1} et la dilution 10^{-2}) ce qui indique la présence des germes exigeants dans le jus de rumen (**Figure15**). Ces germes Gram positif peuvent être des *Streptococcus*.

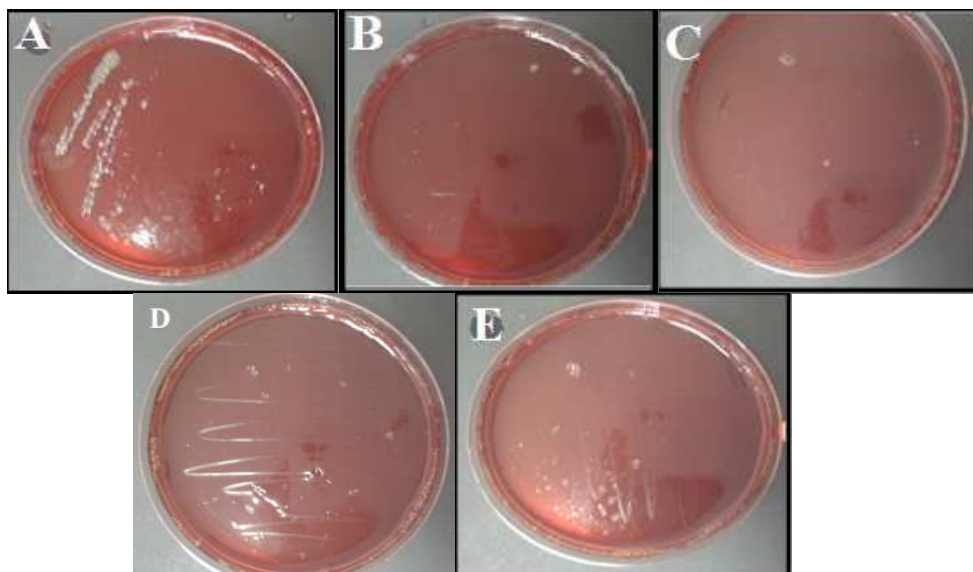


Figure15. Photographies des boîtesensemencées après 24h (gélose au sang)
A. la solution mère; *B.* dilution 10^{-1} ; *C.* dilution 10^{-2} ; *D.* dilution 10^{-3} ; *E.* dilution 10^{-4}

II. Etudes physicochimiques de jus de rumen

Le milieu ruminal se distingue par un ensemble de caractéristiques physico-chimiques dont l'effet peut être favorable ou non au fonctionnement du rumen et aux microorganismes qu'il héberge. Le pH, le potentiel d'oxydoréduction, la matière sèche, la matière organique et la matière minérale ont été étudiés sur le contenu ruminal des dromadaires qui ont servi de donneurs de liquide ruminal au cours des différents essais.

L'Etudes physico-chimique est la façon la plus simple pour évaluer les aliments des ruminants. Dans notre étude elle est basée sur la température, le pH et matière sache.

II.1. La température de jus de rumen

Après le battage ; des mesures de la température de jus du rumen ont donné deux valeurs (**Tableau VIII**).

Tableau VIII. Les valeurs de la température de jus de rumen de deux ovins différents

	Ovin 1	Ovin 2
Température (°C)	40,50	39,40

Belbis, 2007 a montré que la température ruminale est supérieure d'au moins un degré par rapport à la température centrale, c'est-à-dire comprise entre 39,5°C et 40°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide : de 5 à 10°C pour une à deux heures.

II.2. pH de jus de rumen

Le pH des jus de rumen fraîchement collectés varie entre 5,5 et 7,3 (la valeur de 6,51 et 6,8 pourrait être justifiée par la nature du régime alimentaire des animaux donneurs) (**Tableau IX**). Ces valeurs similaire et étaient proche à celles de **Sauvant *et al.*, 1999** ; **Yaakoub, 2006** ; **Boussada, 2011**.

Tableau IX. Les valeurs de pH du jus de rumen

	Ovin 1		Ovin 2	
	Ovin 1A	Ovin 1B	Ovin 2A	Ovin 2B
pH	6,30	6,72	6,70	6,91
Moyen	6,51		6,804	

Belbis, 2007 a montré que le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. La valeur du pH du rumen est normalement comprise entre 5,5 et 7,3. Cette marge est cependant un peu large. Le pH normal ne correspond pas à la neutralité au sens physico-chimique (7,0). Dans le rumen en fonctionnement, il apparaît des acides gras volatils (AGV), et il est normal que la réaction soit légèrement acide (par exemple de 6 à 6,8). Autour de ces valeurs, le pH peut varier sans qu'il y ait parallèlement de troubles, mais cela n'est pas pour autant la normalité. Les causes de variations les plus fréquentes du pH sont les fluctuations alimentaires. Le pH baisse dans la période postprandiale et s'élève pendant le jeûne.

II.3. La matière sèche de jus de rumen

Les valeurs de la matière sèche du liquide ruminal de différents essais sont résumées dans la (figure 16).

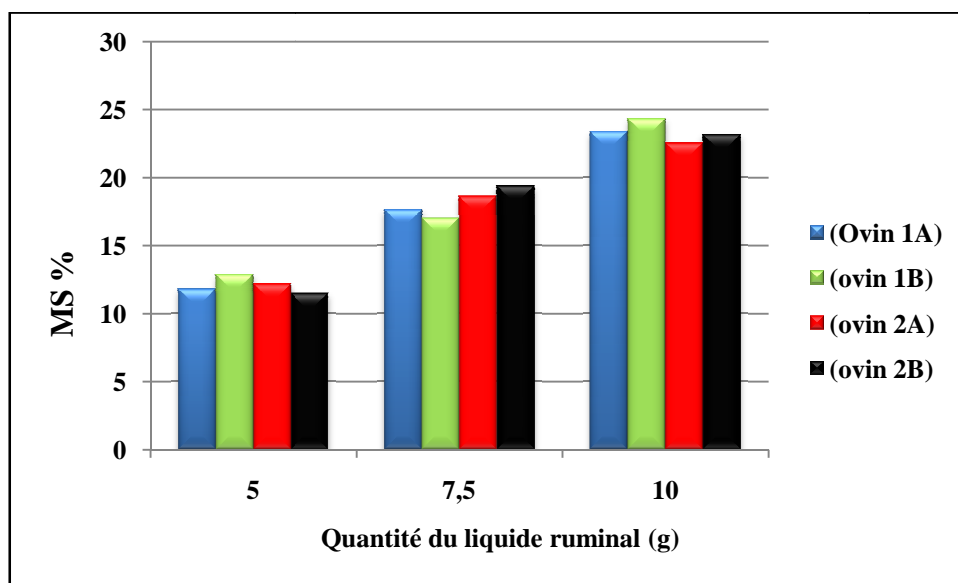


Figure 16. Les valeurs de la matière sèche du liquide ruminal de différents essais.

Les résultats obtenus varient dans un intervalle de **11.82** et **24.32%** avec une moyenne de **17.62 %** pour le premier ovin et entre **11.50** et **23.19%** avec une moyenne de **18.03%** pour le deuxième ovin ; ces valeurs révèlent un contenu ruminal assez liquide. Ces résultats concordent avec ceux signalés par **Medjekal, 2003** ayant enregistré des valeurs de MS variant de **8.5** à **17.4%** du contenu ruminal, et à ceux de **Fonty & Chaucheyras-Durand, 2007**, allant de **10** à **18%**.

III. Dosage des gaz *in vitro*

La fermentation *in vitro* conduit à la production de deux gaz essentiels ; le CO₂ et le CH₄, les deux gaz sont dosés *in vitro* en premier lieu, en présence du substrat seul sans additifs (témoins), et en deuxième lieu, en présence de différentes concentrations des additifs. Des seringues (système batch) sont incubées sans substrats et sans additifs comme essais blancs.

III.1. Dosage des gaz dans l'essai blanc

Les essais blancs ne contiennent ni additifs ni substrat, mais une production du gaz est remarquable dans les deux seringues (les deux répétitions), cette production avec une moyenne de **24,16 ml, (figure 17)**.

La production du gaz en absence du substrat revient à l'utilisation des résidus de forage présent dans le jus de rumen avant abattage.

Des valeurs inférieures à cette moyenne ont déjà été obtenues par **Boussaâda, 2011**, qui a eu une production du gaz dans l'essai blanc avec une moyenne de **9,00ml**, tandis que **Driss, 2008** a eu des valeurs avec une moyenne de **21,00ml**. La différence entre les valeurs obtenues dans cette étude et par les deux autres auteurs revient à la différence du régime alimentaire suivi par les ruminants.

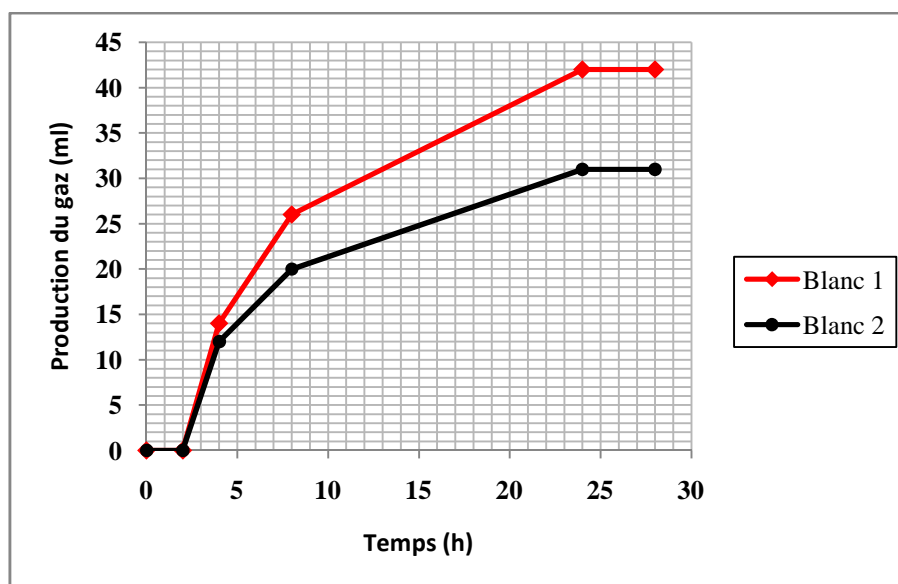


Figure 17. La production du gaz dans l'essai blanc en fonction du temps d'incubation

III.2. Dosage des gaz en présence des additifs

La production du gaz est mesurée *in vitro* en présence de différents additifs à base de nitrate (tryptophane, l'urée et le KNO_3) avec différentes concentrations (0,2M, 0,5M et 1M) et en présence de 200mg de l'amidon de blé comme substrat.

III.2.1. Dosage des gaz en présence de tryptophane

L'effet de l'ajout de tryptophane sur la production du gaz ruminal est testé *in vitro* avec trois concentrations différentes. Les résultats obtenus sont comparé avec le témoin (essai sans additifs) toujours en présence de 200 mg du substrat (figure 18).

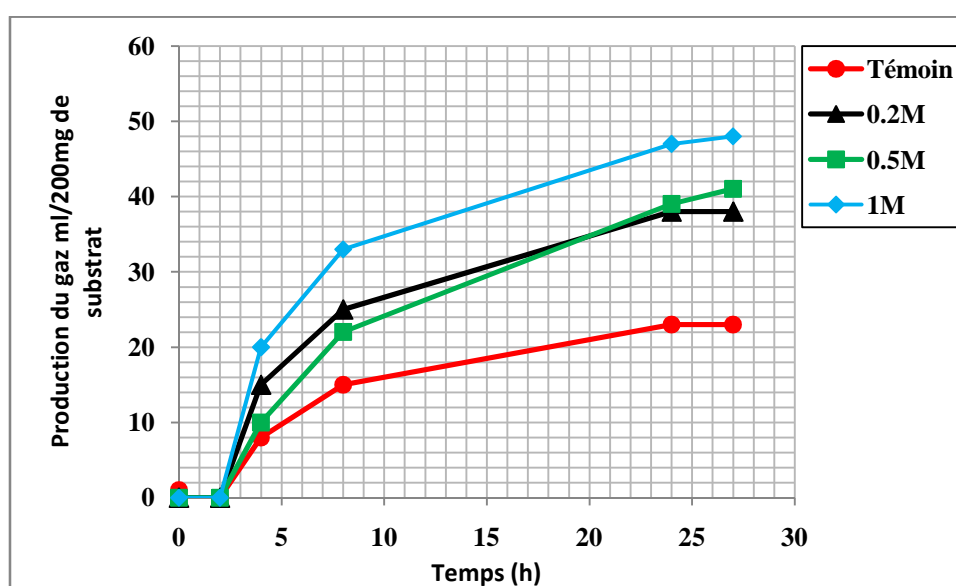


Figure 18. La production du gaz *in vitro*, en présence de 0,2 ; 0,5 et 1M de tryptophane.

Dans les seringues du témoin, la production du gaz atteint une moyenne de **17,25ml/200mg** après 28h d'incubation comme une valeur maximale. La présence du tryptophane avec trois concentrations différentes a augmenté cette production avec une moyenne de **29ml/200mg** avec **0,2M** de l'additif et de **28ml/200mg** avec **0,5M** de l'additif et de **37ml/200mg** avec **1M** de l'additif.

Guo et al., 2009 a expliqué l'augmentation de la production du gaz en présence de tryptophane à le fait que ce dernier est utilisé par le microbiote ruminale comme un substrat et pas comme un alternatif de l'hydrogène.

12 à 38% des bactéries ruminales ont la capacité de dégrader les acides aminés et les utiliser comme une source d'énergie (**Ferran, 2007**).

III.2.2. Dosage des gaz en présence de KNO_3^-

La production du gaz en présence de trois concentrations différentes de nitrate de potassium est comparée avec celle produite en absence de l'additif (témoin). Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 19**.

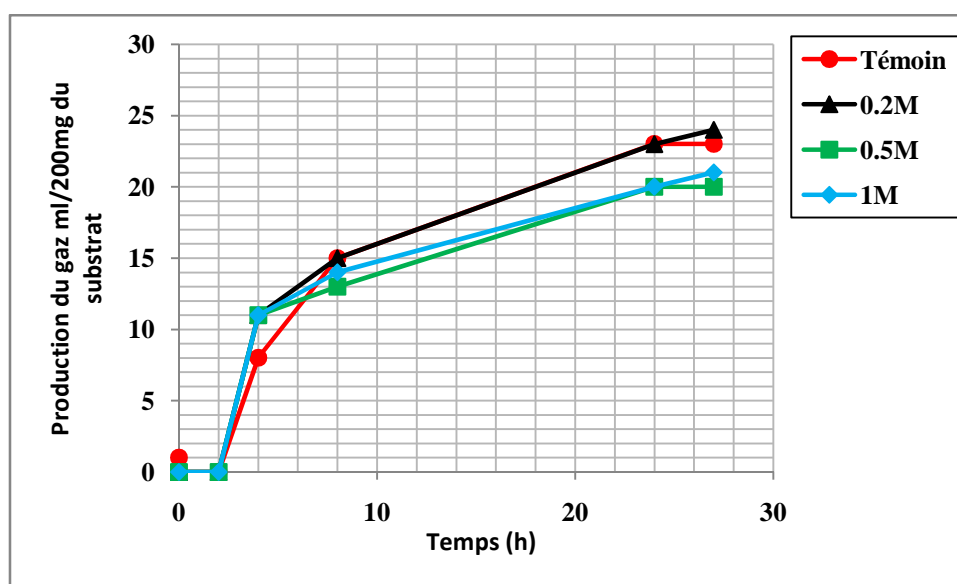


Figure 19. La production du gaz *in vitro*, en présence de 0,2 ; 0,5 et 1M de KNO_3^- .

Une réduction de la production du gaz est obtenue en présence de **0,5 et 1M** de KNO_3^- avec une moyenne de **16,5 ml/200mg** comparée avec **17,25ml/200mg** (moyenne de la production du gaz avec le témoin).

Zhou et al., 2012 a montré que les sels à base de nitrate sont utilisés par les bactéries ruminales comme des alternatifs de l'hydrogène, en donnant l'ammoniac comme produit final de la fermentation au lieu du méthane, en réduisant donc la production du gaz ruminal.

Nolan *et al.*, 2010, ont obtenu une réduction de méthane de 67% en présence de 4% KNO_3^- ; Nolan et ses collaborateurs ont prouvé que, lorsque les micro-organismes du rumen fermentent des matières organiques, ils génèrent le cofacteur NADH réduit qui est en équilibre avec H_2 rumen. Chez les ruminants, le H_2 est normalement éliminée par la réduction de CO_2 pour former du méthane. Cependant, le NO_3^- (présent dans certains pâturages fourrage frais) a une affinité plus élevée pour l' H_2 que le CO_2 , lorsqu'il est présent, l' H_2 est utilisée en premier dans la réduction de NO_3^- à NO_2 et NO_2 en NH_3 ce qui réduit la production du méthane. (Nolan *et al.*, 2010).

III.2.3. Dosage des gaz en présence de l'urée

Une meilleure réduction du gaz a été obtenue en présence de l'urée comme additif (figure 20).

L'augmentation de la concentration de l'urée de 0,2M à 1M a augmenté le taux de réduction du gaz. En présence de 0,2M de l'urée la production du gaz atteint des valeurs de **29ml/200mg** après 28h d'incubation, cette valeur supérieur à celle obtenue avec le témoin après la même période d'incubation. Mais, l'ajout d'une concentration plus élevée de l'urée (0,5M) a donné une production du gaz avec une valeur maximale **19 ml/200mg** après 28h d'incubation inférieur à celle obtenu avec le témoin (**23ml/200mg/28h**).

Des valeurs plus inférieures sont obtenus en augmentant la concentration de l'urée à 1M.

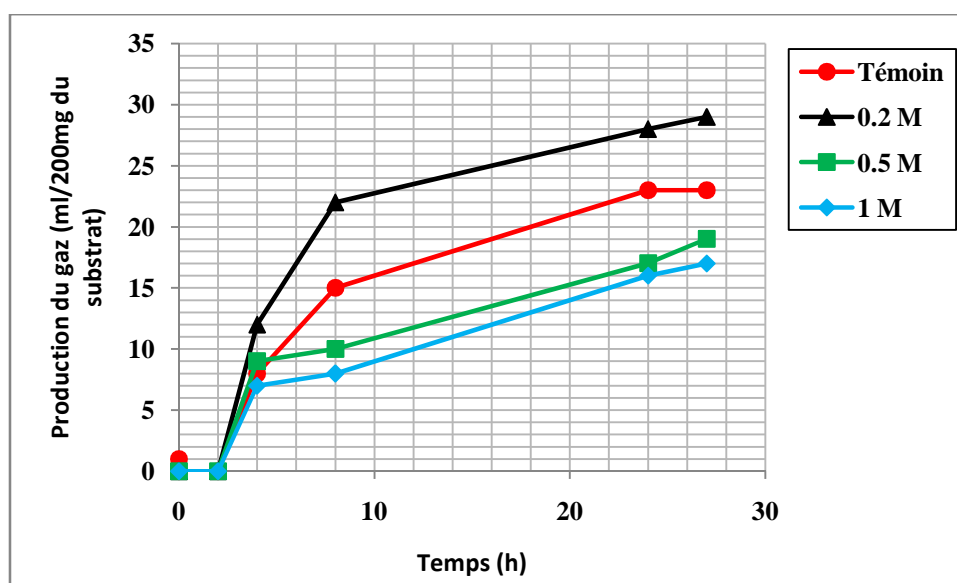


Figure 20. La production du gaz *in vitro*, en présence de 0,2 ; 0,5 et 1M de l'urée.

Perdok et al., 1988 in Leng, 1991 ont montré que l'urée (qualité alimentaire) est employée dans l'alimentation des ruminants (à l'exclusion des autres animaux). En effet, les micro-organismes présents dans le rumen sont capables d'utiliser cette source d'azote pour synthétiser des acides aminés utilisables par le ruminant. L'urée est employée notamment pour équilibrer les régimes du point de vue des micro-organismes du rumen (**Leng, 1991**).

La comparaison entre les résultats obtenus avec les trois additifs a montré que l'urée et le KNO_3^- réduisent la production du gaz ruminal (**figure 21**), tandis que le tryptophane influence contrairement sur cette production et il conduit à l'augmentation de la production gazeuse parce qu'il est utilisé par les bactéries comme substrat.

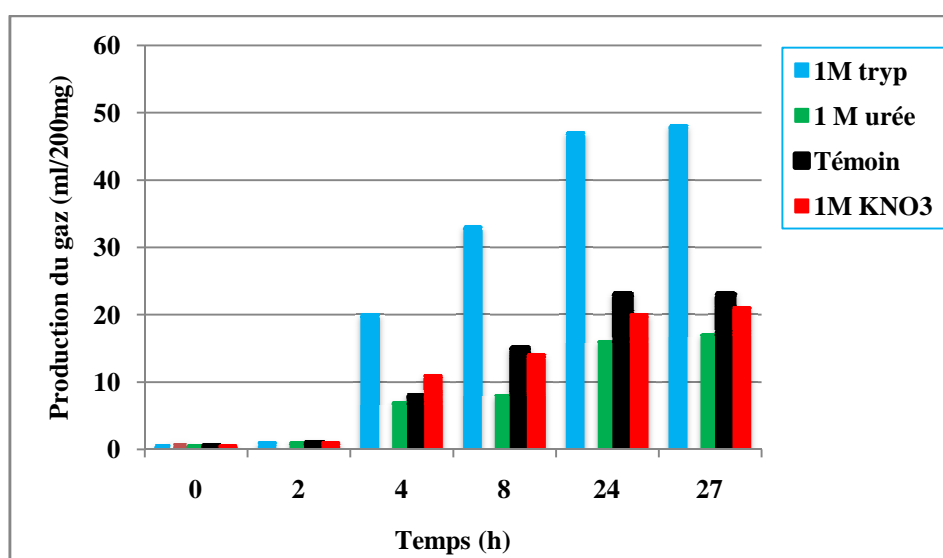


Figure 21. La production du gaz *in vitro* en présence de trois additifs différents (l'urée, le tryptophane et le KNO_3^-).

Guo et al., 2009, ont aussi montré que l'urée et le KNO_3^- ont une grande influence sur la réduction du méthane ruminal.

IV. Analyse qualitative des gaz produits *in vitro*

L'analyse qualitative des gaz produits conduit à la mesure des concentrations de CO₂ et du méthane produits (**figure 22**).

Globalement, le CO₂ est produit en un volume double du CH₄, ainsi que pour le témoin. C'est à-dire que 1/3 du gaz produit représente le CH₄ et les 2/3 restants forment le CO₂ (**Boussaada, 2011**).

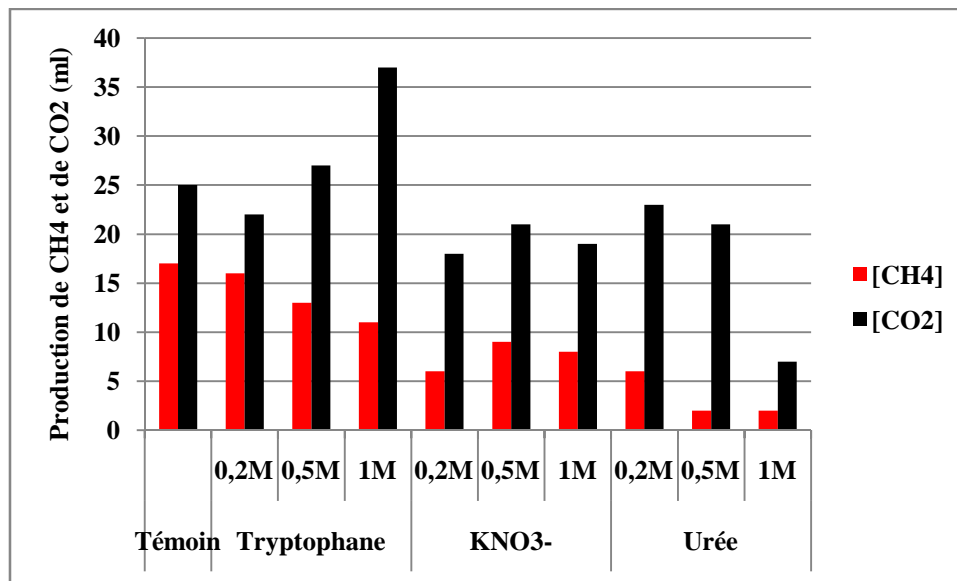


Figure 22. La production de CH₄ et de CO₂ en présence de différents additifs.

Notre travail avait pour objectif d'étudier l'effet des produits nitreux (nitrate, l'urée et tryptophane) sur la méthanogènes ruminale chez les ovins *in vitro*. Cette dernière a été testée avec trois concentrations déférentes pour chaque produit : 1 ; 0,5et 0,2M.

En premier lieu, un isolement bactérien est effectué à partir de jus de rumen d'un animal fistulé, cet isolement a montré la présence des bactéries Gram négatifs et des bactéries Gram positifs, la présence de bactéries aérobies anaérobies facultatives dans le jus du rumen, *Streptococcus* et aussi des germes exigeants.

En deuxième lieu, une étude physicochimique de jus de rumen a donné différentes valeurs du pH avec une moyenne de 6,8 et des valeurs de la matière sèche avec une moyenne de 18,03%. La mesure de la température a montré que la température de jus de rumen est entre 39 et 40°C.

En dernier lieu, la réduction de la production du gaz ruminal est testée en présence de trois additifs différents ; le tryptophane, l'urée et le KNO_3^- avec trois concentrations différentes, ce test a montré que le tryptophane peut être utilisé par les bactéries ruminales comme source d'énergie en augmentant donc le taux de la production gazeuse, par contre le KNO_3^- est un sel utilisé par ces bactéries comme alternatif de l'hydrogène en donnant à la fin de la fermentation l'ammoniac au lieu de le méthane en réduisant donc la production du gaz. L'urée aussi est utilisé par le microbiote ruminal pour produire l'ammoniac et réduire la production du gaz.

Le test qualitatif des gaz produits *in vitro* a montré que la concentration de CO_2 est globalement le double de la concentration de CH_4 , aussi a montré que l'urée est un produit nitreux qui peut réduire légèrement la concentration du méthane.

Ces résultats peuvent être enrichis avec d'autres études ; et comme perspectives des tests d'identifications peuvent être appliqués pour identifier le microbiote ruminal, aussi l'application de ces résultats *in vivo* peut enrichir cette étude et l'identification des gaz produits par chromatographie peut avoir lieu.

- **Amokrane S., (2010).** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agro-alimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale. *Mémoire de magister, université de Constantine.*
- **Argyle J.L., Forster R.J. (1988).** “Effects of ciliate protozoa on rumen bacterial populations”, *J.V. Nolan, R.A. Leng et D.I. Demeyer eds., The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion, Penambul Books, Armidale, Australie.*
- **Arhab R. (2000).** Etude de la digestibilité in vitro de sous produits agro-industriels et de cellulose purifiée par la microflore ruminale de camélidés. Utilisation des gaz fermentaires comme marqueurs de fermentation. *Thèse de Magister en Biochimie appliquée. Université de Constantine. 69 p.*
- **Barone R. (1997).** Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3 : Splanchnologie 1. Appareil digestif. Appareil respiratoire. 3^{ème} ed. Paris : Vigot, 853p.
- **Belbis G., (2007).** Flore du rumen : origine, composition, Evolution, conséquences Physiopathologiques. *These de doctorat, École Nationale Veterinaire D’alfort.*
- **Bicaba Z.m, (1991).** Digestion comparée de diverses rations à base de fourrages pauvres chez les ovins et les caprins. *In Tesserand J.C., Dermanquilly. Nutrition des ruminants domestiques. P 582-596.*
- **Blaxter K.I., Clapperton L.I., (1965).** Prediction of the amount of methane produced by ruminant. *Br. J.Nutr., 19: 511-521.*
- **Bogaert C., Gomez L., Jouany J-P., Jeminet G., (1989).** “Effects of the ionophore antibiotics lasalocid and cationomycin on ruminal fermentation *in vitro*”, *Anim. Feed Sci. Technol., 27, 1-15.*
- **Bonnefont C. (2008).** Le potentiel Redox et le milieu ruminal. *Ecole Nationale Vétérinaire, Telouse, pp : 4-24.*
- **Boussaada A. (2011).** Etude *in vitro* Des Flavonoides Purifiées sur la Ruminale chez les ovins : cas de la quercétine .de Maitrise des facteurs de la reproduction chez les herbivores. *Université de Batna*
- **Brugère H. (2005)** Motricité du complexe gastrique : Réseau-Rumen. *In : Médecine et digestive en pratique bovine. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort, Unité Pédagogique de Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse Cour, 205 p.*
- **Brugère H. (2005).** Motricité du complexe gastrique : Réseau-Rumen. *In : Médecine et chirurgie digestive en pratique bovine. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d’Alfort, Unité Pédagogique de Pathologie Médicale du Bétail et des Animaux de basse Cour, 205 p.*

- **Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P.W., Kamel C., (2005).** Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture”, *J. Dairy Sci.*, 88, 2508-2516.
- **Callaway T.R., Martin S.A., (1996).** Effect of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganisms fermentation of cracked corn”, *J. Anim. Sci.*, 74, 1982-1989.
- **Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kame C., (2004).** Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture”, *J. Anim. Sci.*, 82, 3230-3236.
- **Ciccarelli FD, Doerks T, von Mering C, Creevey CJ, Snel B, Bork P,** « Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life », dans *Science*, vol. 311, n° 5765, 2006, p. 1283–7
- **Climate Change (2001):** The Scientific Basis - Contribution of Working Group I to the IPCC Third Assessment Report, *Cambridge University Press, New York*.
- **Conant, R.T., K. Paustian, and E.T. Elliott, (2001).** Grassland management and conversion into grassland: Effects on soil carbon, *Ecological Applications*, 11 (2), 343-355
- **Dawson KA., Allison MJ. (1988).** Digestive disorders and nutritional toxicity. In : Hobson PN, editors. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, New York, 445-459. 527 p.
- **Demeyer D., Fievez V., (2000).** Ruminants et environnement : la méthanogénèse. *Ann. Zootech*, 49: 95-112.
- **Demeyer D., Fievez V. (2000).** Ruminants et environnement : la méthanogènes. *INRA.EDP science, Annales de Zootechnie*, 49 : 95-112.
- **Demeyer D.I, (1991).** Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut, in Jouany J.P. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion, *INRA Edition, Paris. P 217-237*.
- **Dohme F., Machuller A., Wasserfallen A., Kreuzer M. (2001) :** “Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets”, *Lett. Appl. Microbiol.*, 32, 47-51.
- **Driss D. (2008).** Influence d’extrait végétaux (*Thymelaea hirsuta* et *Sonchus maritimus*) sur la méthanogénèse et de la digestibilité ruminale *in vitro*. *Thèse de magistère en Biochimie Appliqué, Université Cheikh Larbi Tebessi de Tébessa, 70p*.
- **Ferran A. (2007).** Digestion microbienne chez les ruminants.

- **Fonty G, Joblin K. M. (1991).** Rumen anaerobic fungi: their role and interaction with others rumen microorganisms in relation to their fiber digestion.
- **Fonty G. et Chaucheyras-Durand F. (2007).** Les écosystèmes digestifs. (Eds), *Technique & Documentation, Paris*, pp. 79-94 ; 158-187 ; 204-217 ; 252-265.
- **Fonty G. Forano E, Gaudet G; Komisarczuks and Gouet Ph.(1988).** Données nouvelles sur les bactéries cellulolytiques. *Reproduction Nutrition and Develloppement* 28: 19-32
- **Frumholz P.P., Newbold C.J., Wallace R.J. (1989)** : “Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (rusitec)”, *J. Agric. Sci. (Camb.)*, 113, 169-172.
- **Garcia-Gonzalez R., Lopez S., Fernandez M, Gonzalez J.S., (2006).** Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (rusitec)”, Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. éd., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., in press.
- **Gouet Ph., Thvend P.(1985).** Le rumen un fermenteur modèle. *Biofuture*. 23: 47-52.
- **Gulter H. (1975).** Physiologie des animaux domestiques. *Vigot frères. Editeurs*. 211-272, 941-944.
- **Guo W., D. M. Schaefer¹, X. X. Guo, L. P. Ren and Q. X. Meng, (2009).** Use of Nitrate-nitrogen as a Sole Dietary Nitrogen Source to Inhibit Ruminant Methanogenesis and to Improve Microbial Nitrogen Synthesis *In vitro*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol. 22, No. 4* : 542-549.
- **Hegarty R. S. (2001)** : “Greenhouse gas emissions from australian livestock sector. What do we know, what can we do ?”, *Australian Greenhouse Office*.
- **Hungate E. (1966).** The rumen and its microbes. *Academic Press, New York*.
- **Hungate R.E., (1966).**The rumen and its microbes. *Academie press, New York, USA*. 3: 27-38
- **Jean-Blain. C, (2002).** Introduction à la nutrition des animaux domestiques. *Ed.Tec .et Doc., Paris*, 424p.
- **Johnson, K., M. Huyler, H. Westberg, B. Lamb, and P. Zimmerman, (1994).** Measurement of Methane Emissions from Ruminant Livestock Using a Sf6 Tracer Technique, *Environmental Science & Technology*, 28 (2), 359-362,
- **Jondey A., Gogny M. (1989).** Physiologie comparée. Le fonctionnement du rumen. *Cahiers de Nutrition et de diététique.*, 24 : 429-434.

- **Jondey A., Gogny. M. (1989).** Physiologie comparée. Le fonctionnement du rumen. *Cahiers de Nutrition et de diététique*, 24: 429-434p.
- **Jouany J.P and Ushida K. (1998).** The role of protozoa in feed digestion. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 12: 113-128
- **Jouany J.P., (1994).** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA. Prod. Anim.*, 7(3): 207-225p.
- **Jouany J-P, Lassalas B., Coulmier D. (2005)** : “Etude *in vitro* des effets de l’ajout de sérum de luzerne sur les fermentations ruminales”, *Renc. Rech. Ruminants*, 12, 240.
- **Jouany J-P., Lassalas B., (1997).** Study of the adaptation of the rumen ecosystem to the antimethanogenic effect of monensin measured *in vivo*”, *Reprod. Nutr. Dev.* (suppl.), S69-S70.
- **Kim M., Morrison M., Yu Z., (2011).** Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 76, 49-63
- **Leng, (1991).** Application of biotechnology to nutrition of animals in developing countries. *Animal Production and Health Division*, 0254-6019.
- **Mathieu F., Jouany J-P., Senaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier M. (1996)** : “The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep ; protozoal and probiotic interactions”, *Reprod. Nutr. Dev.*, 36, 271-287.
- **Medjekal S, (2003).** Etude de la fermentescibilité *in vitro* de sous produits de l’agronomie saharienne par la microflore ruminal de caprin. *Mémoire de magister. ISN. Université de Constantine*, pp. 38-42.
- **Menke K. H. and Steingass H. (1988).** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.*, 28: 7-55p.
- **Menke K. H. and Steingass H. (1988).** Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.*, 28: 7-55p.
- **Murray, R.M., A.M. Bryant, and R.A. Leng, (1976).** Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep, *British journal of nutrition*, 36, 1- 14,
- **Mutsvangwa T., Edwards I.E., Topps J.H., Paterson G.F.M. (1992)** : “The effects of dietary inclusion of yeast culture (YeaSacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensive bulls”, *Anim. Prod.*, 55, 35-40.

- **Nagaraja T.G., Tone G. et Reharka A.A., (1992).** Moderation of ruminal fermentation by ciliate-protozoa in cattle fed a high grain diet. *App. Envir Mic.*, 58: 2410-2414p
- **Newbold C.J., Rode L.M., (2006).** Dietary additives to control methanogenesis in the rumen”, Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. éd.s., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., in press.
- **Nolan A, R.S. HegartyB, J. HegartyA, I.R. GodwinA and R. Woodgate, (2010).** Use of supplementary nitrate to mitigate methane production and provide rumen degradable N for ruminants. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* vol.28.
- **Nollet L., Demeyer D.I., Verstaete W. (1997) :** “Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 194-200.
- **Nollet L., Mbanzamihigo L., Demeyer D.I., Verstraette W. (1997) :** “Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80”, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 71, 49-66.
- **Orskou E.R and Ryle M .(1990).** Energy nutrition of rumen microorganisms. In: Energy Nutrition in ruminants. *Elsevier. Science (Eds), New York, USA, pp 10-28.*
- **Pelmont J., (2005).** Hydrogène - Acétate – Méthane. In: *Biodégradations et métabolismes, collection Grenoble Sciences, 197-244.*
- **Popova M, Martin C, Eugène M, Mialon MM, Doreau M, Morgavi DP. (2011).** Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim Feed Sci Tech.* 2011;166-167(0):113-21.
- **Popova M, Morgavi D.P., Doreau M., Martin C.,** Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen. *INRA Productions Animales*
- **Rachedi K., (2005).** Etude de la fermentesibilité *in vitro* de plantes présahariennes par la microflore ruminale d’ovin. Evaluation de la contribution spécifique des différentes fractions pariétales au pool des produits fermentaires. *Thèse de magister en biochimie appliquée. Université Mentouri de Constantine, 82p.*
- **Ranilla M.J., Morgavi D.P., Jouany J-P. (2004) :** “Effect of time after defaunation on methane production *in vitro*”, *Reprod. Nutr. Develop.*, 44 (Suppl.1), S35

Références Bibliographiques

- **Rochette Ph., (2003).** Les sources agricoles de gaz à effet de serre (GES) au Canada. *Agriculture et Agroalimentaire Canada, Sainte-Foy., p 1-4.*
- **Rymer. C., Huntington. J. A., Givens. D. I., (1999).** Effects of inoculum's preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Animal feed science and technology, 78: 199-213pp.*
- **Sauret J. (1988).** Guide de dissection des mammifères domestiques (équidés, ruminants, carnivores). Les viscères abdominaux. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique d'Anatomie, 129 p
- **Sauvant D., Meschy F. et Mertens D. (1999).** Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA. Prod. Ani, 12 : 49-60.*
- **Soltner D.(1994).** Alimentation des animaux domestiques. *Cool. Sci. Tech. Agric., édition,Paris : 20ème édition.*
- **Stewart CS., Bryant MP. (1988).** The rumen bacteria. In: Hobson PN, editors. The rumen microbial ecosystem. *Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. 527 p*
- **Stewart C.S., Crossley M.V., Garrow S.H., 1983.**The effect of avoparcin on laboratory cultures of rumen bacteria”, *Eur. J. Appl.Microbiol. Biotechnol., 17, 292- 297.*
- **Stewart CS., Flint H.J. and Bryant M.P. (1997).** The rumen bacteria. The rumen microbial ecosystem. *In : Hobson PN, and Stewart C.S. (Eds), London, Blackie Academic and Professional, UK, pp. 10-72.*
- **Stewart CS, Bryant MP. (1988).** The rumen bacteria. *In : Hobson PN, editors. The rumen microbial ecosystem.* Elsevier Science Publisher, New York, 21-75. 527 p
- **Takahashi J., Chaudhry A.S., Beneke R.G., Young B.A. (1997) :** “Modification of methane emission in sheep by cysteine and a microbial preparation”, *Sci. Total Environ., 204, 117-123.*
- **Tan ZL, Nagaraja TG, Chengappa MM. (1996).** *Fusobacterium necrophorum* infections : virulence factors, pathogenic mechanism and control measures. *Vet. Res. Comm., 20, 113-140*
- **Taniguishi K., Yanatani Y. Otani I. (1979).** Rumination by goats fed on diets with varying forage ration. *J. Appl. Biol. Sci., 18: 233-240.*
- **Tiret L. (2001).** Physiologie de la digestion. *Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. 69 p*

- **Tiret L. (2001).** Physiologie de la digestion. *Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique.* 69 p
- **Tokua M., Chagan T., Ushida K., Kojima I. (1999).** Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. *Current Microbiology*, 39 : 123-128.
- **Tsuda T., Sasaki Y., and Okawasashima R.Ed:** Physiological aspects of seventh international symposium on ruminant physiology. *Academic press. San Diego:* 655 661.
- **Vermorel M., Jouany J-P. (1989)** : “Effects of rumen protozoa on energy utilization by wethers of two diets based on ammonia-treated straw supplemented or not with maize”, *Asian Austral. J. Anim. Sci.*, 2, 475-476.
- **Wallace. R.J., (1996).** The proteolytic systems of ruminal microorganisms. *INRA. Elsevier.*, 45, suppl., 301-308 p.
- **Whitford M.F, Teather R.M., Forster R.J., (2001).** Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology*, 1, 5.
- **Williams AG, Coleman GS. The Rumen Protozoa (2001).** In : Hobson PN, Ed. *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Science Publishing, New York, 77-111. 527 p
- **Wright A. D., Kennedy P., O'Neill C.J., Toovey A.F., Popovski S., Rea S.M., Pimm C.L., Klein L. (2004)** : “Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens”, *Vaccine*, 22, 3976-3985.
- **Yaakoub F, (2006).** Evaluation *in vitro* de la dégradation des principaux fourrages des zones arides. Thèse de magister en Nutrition. *Université El-Hadj Lakhdar de Batna* ,150p.
- **Zhou Zhenming , Zhongtang Yu et Qingxiang Meng, (2012).** Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations *in vitro* ruminal cultures. *Bioresource Technology* 103 , 173–179.

Annexe 1. Composition des milieux de culture dans 1L d'eau distillée

Milieux	Composition	Quantité
gélose nutritive	extrait de viande	1,0g
	extrait de levure	2,5g
	peptone	5,0g
	chlorure de sodium	5,0g
	agar-agar	15,0g
	pH	7,0
gélose Hektoen	preteose-peptone	12,0 g
	extrait de levure lactose	3,0 g
	saccharose	12,0 g
	salicine	12,0 g
	sels biliaires	1,5 g
	fuchsine acide	9,0 g
	bleu de bromothymol	0,1 g
	chlorure de sodium	0,065 g
agar-agar	5,0 g	
gélose au sang	pH	7,6
	Mélange spécial de peptones	23.0g
	Amidon	
	Chlorure de sodium	1.0g
	Agar-agar	5.0g
	Sang	50ml
gélose Chapmann	pH	07.3
	Peptone	10,0 g
	Extrait de viande de bœuf.	1,0 g
	Chlorure de sodium	75,0 g
	Mannitol	10,0 g
	Rouge de phénol	0,025 g
	Agar-agar	15,0 g
	pH	7,4

Annexe 2. Préparation de la salive artificielle selon Menke & Steinguass, 1988.

Composant	Quantité (ml) pour 1000ml de SA
Solution A	0.12
Solution B	240.0
Solution C	240.0
Solution D	1.22
Solution E	95.0
Eau distillée	470.0

Résumé

Le méthane est un gaz produit en grande quantité par les animaux d'élevage suite à la dégradation de la ration alimentaire. Cette production représente une perte d'énergie estimée entre 2 à 12% de l'énergie contenue dans les aliments consommés par le ruminant. La réduction de la production de méthane par les ruminants représente sur un intérêt environnemental à long terme.

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'effet des produits nitreux (l'urée, tryptophane et KNO_3) sur la production du Méthane et réduction de l'effet de serre pour la protection de l'environnement.

L'urée, tryptophane et KNO_3^- sont testés en utilisant trois concentrations de chaque produit : 1 ; 0,5 et 0,2mg/30ml. La technique standard de fermentation *in-vitro* a permis de retenir la production quantitative et qualitative des gaz fermentaires.

Les résultats de la fermentation *in-vitro* par le microbiote ruminal d'ovins révèlent que l'urée, et le KNO_3 ont une capacité remarquable pour réduire la production du méthane en particulier avec des concentrations élevées.

Mots clés:

Méthane, fermentation *in vitro*, produit nitreux, réduction

Summary

Methane is produced in large quantities by livestock following the deterioration of the food ration gas. This production represents a loss estimated at between 2-12% of the energy contained in food consumed by ruminant energy. The reduced production of methane by the ruminant is a long run environmental interest.

This study aimed to investigate the effect of nitrous products (urea, tryptophan and KNO_3) on the production of methane and reduction of greenhouse effect for the protection of the environment.

Urea, and KNO_3 are tested using trio concentrations of each product: 1; 0.5 and 0.2 mg/30ml. The standard *in vitro* fermentation technique has allowed to retain the quantitative and qualitative production of fermentation gases.

The results of the *in vitro* fermentation by ruminal microbiota of sheep reveal that urea, tryptophan and KNO_3 has a remarkable ability to reduce the production of methane in particular the concentration.

Key words:

Methane fermentation *in vitro*, nitrous product, reducing

Diplôme : Master académique en Microbiologie Cellulaire et Moléculaire

Thème : Impact Des Sels A Base De Nitrate Sur La Méthanogenèse Ruminale *In Vitro*

Résumé

Le méthane est un gaz produit en grande quantité par les animaux d'élevage suite à la dégradation de la ration alimentaire. Cette production représente une perte d'énergie estimée entre 2 à 12% de l'énergie contenue dans les aliments consommés par le ruminant. La réduction de la production de méthane par les ruminants représente sur un intérêt environnemental à long terme.

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'effet des produits nitreux (l'urée, tryptophane et KNO_3) sur la production du Méthane et réduction de l'effet de serre pour la protection de l'environnement.

L'urée, tryptophane et KNO_3^- sont testés en utilisant trois concentrations de chaque produit : 1 ; 0,5 et 0,2mg/30ml. La technique standard de fermentation *in-vitro* a permis de retenir la production quantitative et qualitative des gaz fermentaires. Les résultats de la fermentation *in-vitro* par le microbiote ruminal d'ovins révèlent que l'urée, et le KNO_3^- ont une capacité remarquable pour réduire la production du méthane en particulier avec des concentrations élevées.

Mots clés :

Méthane, fermentation in vitro, produit nitreux, réduction.

Promotrice : M^{elle} KHEDDOUMA A.

Devant le jury :

* Présidente : M^{elle} HALASSI I.

MAB univ. Khenchela

* Examinatrice : M^{elle} YAKHLEF W.

MAB univ. Khenchela

* Examinatrice : M^{elle} CHORFI K.