



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abbès Laghrou Khenchela  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master académique en  
**Biologie**  
Option : Microbiologie

**Thème**

**Effets Des Produits A Base D'azote Sur  
La Flore Méthanogène *In Vitro* Dans Un  
Réacteur Fermé (Batch Reactor).**

Présenté par :

**BENACHI Safa**

Devant le Jury

**Président : M. BOUAZZA L.**

(MCA) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

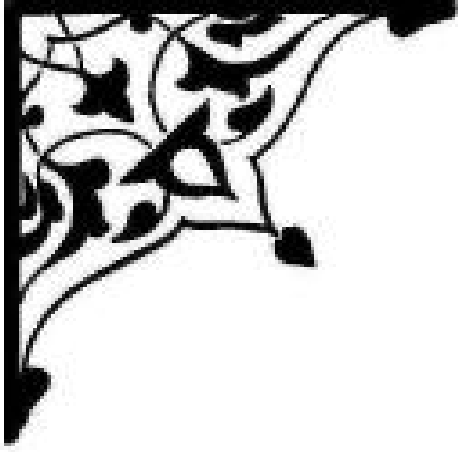
**Promotrice: M<sup>eme</sup> KHEDDOUMA A.**

(MAA) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

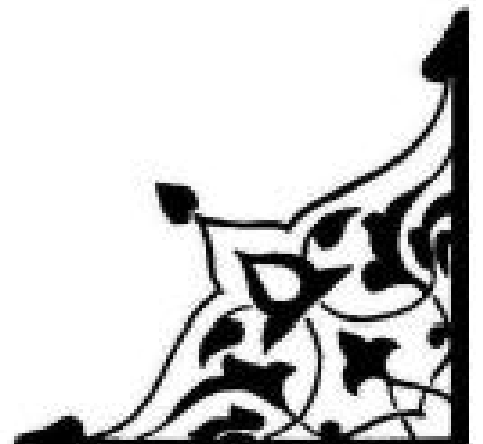
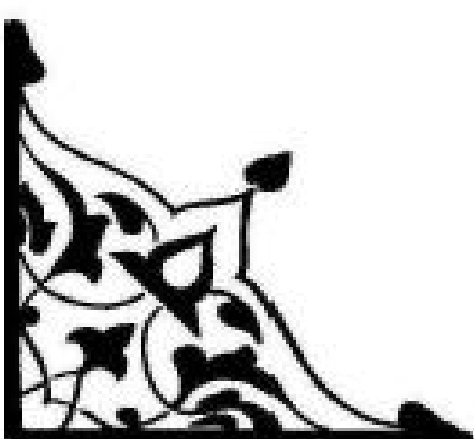
**Examineur: M. ABAIDIA A.**

(MAA) Univ. Abbès Laghrou - Khenchela

**Année Universitaire : 2016-2017**



*REMERCIEMENT*



*Je remercie tout d'abord ALLAH tout puissant qui m'a donnée le courage et la volonté et de m'avoir accompagné tout le long de la réalisation de ce travail.*

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

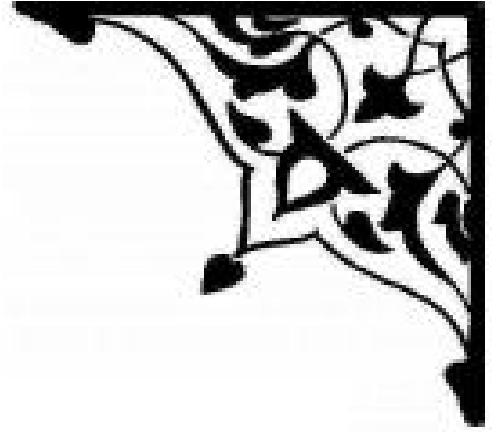
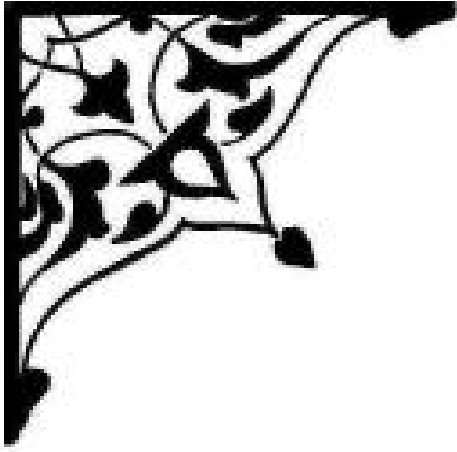
*Je tiens à remercier les membres du jury de notre mémoire ; M. BOUAZZA L. qui nous fait l'honneur de présider le jury et M. ABAIDIA A. pour son rôle d'examineur. Je les remercie grandement pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon travail.*

*Je tiens à remercier ma promotrice M<sup>me</sup> KHEDDOUMA A. pour l'attention qu'elle a porté à mon travail, pour toute l'aide qu'elle m'a fournie pendant la réalisation de ce modeste travail. Malgré votre occupation vous étiez toujours disponible. Merci encore pour la patience ainsi que votre munificence. Je n'ai pas assez des mots pour décrire votre surveillance et direction. J'ai l'honneur d'apprendre à côtés de vous. Que Dieu vous protège.*

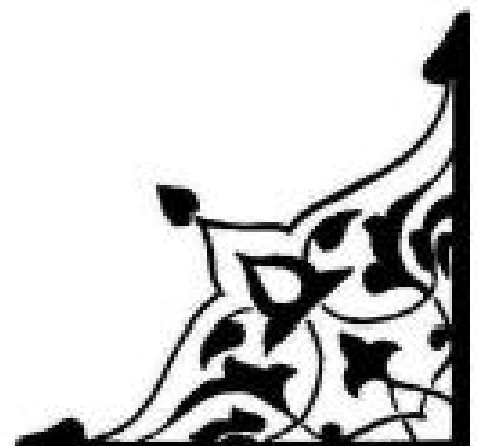
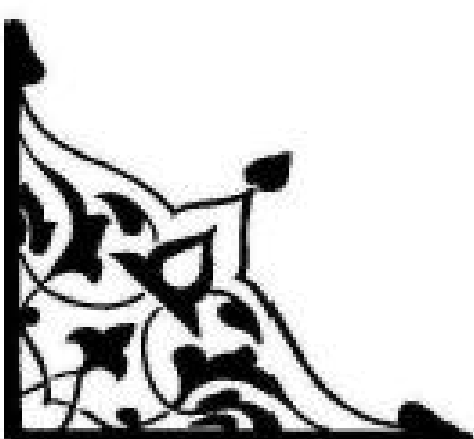
*Ce travail n'aurait pu jamais avancer sans l'aide précieuse de M. RAHMANI B. et M. AOUIDANE L. qu'ils trouvent ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.*

*Je remercie encore tous mes enseignants de la faculté des Sciences de la nature et de la vie et en particulier M. BOUSSAA A.*

*En fin, je tiens aussi à mentionner le plaisir au personnel de l'abattoir de la wilaya de Khenchela qui m'a aidé pour le prélèvement de mes échantillons.*



# *DEDICACE*





# DEDICACE

Je tiens tout d'abord de remercier *ALLAH* tout le puissant pour m'accompagner et de sa miséricorde.

## Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents, *mon père « Messaoud »* et *ma mère « Rabaia »*, les mots ne jamais exprime ce qui vagabonde dans mon cœur d'amour et de gratitude pour vous, les plus chers que je dois consacrer ce modeste travail, merci pour votre courage, patience, amour, supplication, soutient et je suis désolé si mes moments difficile ont volé votre pensé. Qu'*ALLAH* leur procure bonne santé et longue vie. Je vous aime beaucoup!

A mes adorables sœurs : *Khawla, Asma, Romaisa, Oumaïma*, vous étiez toujours présentes avec tous vos bons conseils. Votre soutient et affection m'ont été d'un grand secours au long de mes années d'étude ainsi ma vie personnelle. Je vous dédie ce modeste travail avec tout le bonheur et de réussite.

Ma petite puce *Meriem*, je la souhaite beaucoup de réussite et bonheur dans sa vie. Que dieu vous protège, Je vous aime beaucoup !

A mon marie *Lotfi*, même un infini merci ne suffirait pas ! Malgré les sacrifices que tu as faits pour moi, tu as toujours été présent dans la réalisation de mes projets, et c'est avec toi que je partage aujourd'hui la plus belle chose de notre vie.

A mon unique oncle *Zohir*, qui a été présent avec moi dans tous mes difficiles moments, merci oncle que dieu vous protège! A sa femme et mes tantes.

A mes oncles : *Ibrahim, Nor Eddin, Abd El Hamid, AbdAlah*, je n'ai pas assez de mots pour vous décrire pour votre soutient, et support dans mon travail ainsi dans ma vie personnelle.

A mon cousin *Mohamed*.

A mon chère cousine *Zineb*, qui m'a aidé dans mes recherches vétérinaires.

A mes grands-parents et surtout ma grand-mère *Mebarka*, pour leurs soutient ainsi leur volonté de m'aider dans mon travail.

A toute la promotion de biologie *Khenchela 2016/2017*.

Introduction	01
<b>Etude Bibliographique</b>	
I. La physiologie du rumen	03
I.1. Anatomie du rumen	03
I.1.1. Le rumen (la panse)	03
I.1.2. Le feuillet (omasum)	04
I.1.3. Le réseau (cailllette)	04
I.2. Les conditions physico-chimiques du milieu ruminal	05
I.2.1. Le pH	05
I.2.2. La température	07
I.2.3. Le potentiel d'oxydoréduction	07
I.2.4. La pression osmotique	07
I.3. L'anaérobiose et les voies de production de l'ATP	07
II. La Fistulation	11
II.1. Historique	11
II.2. Principe et but	12
III.3. Application	12
III.3.1. Préparation de l'animal pour la procédure	12
III.3.2. L'anesthésie locale	13
III.3.3. Opération chirurgicale	15
II.3.4. Surveillance et soins post opératoires	18
II.3.5. Soins de longue durée	19
III. La flore ruminal	20
III.1. Les bactéries	20
III.1.1. Les bactéries cellulolytiques	23
III.1.2. Les bactéries amylolytiques	24
III.1.3. Les bactéries a base de lactate	24
III.2. Les méthanogènes	25
III.3. Les protozoaires	25
III.4. Les champignons	27
III.5. Les virus	29
IV. La méthanogenèse	30
IV.1. Le méthane	30

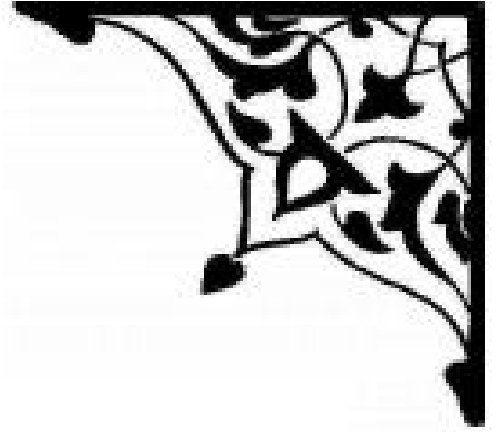
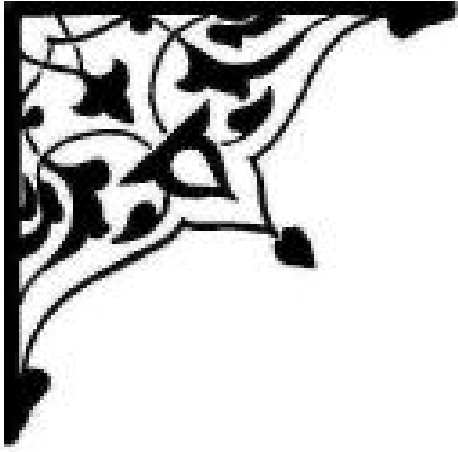
IV.2. Les différentes origines de la méthanogènes	30
IV.2.1. Définition	30
IV.2.2. Les origines de la méthanogenèse	31
IV.3. Les microorganismes producteurs du méthane	32
IV.4. Le génome méthanogène	32
V. Stratégies de réduction de méthane ruminal	35
V.1.L'utilisation des antibiotiques	35
V.2. Manipulation biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal	36
V.2.1. L'élimination des protozoaires du rumen (la défaunation)	36
V.2.2. Les agents biologiques	36
V.3. L'utilisation des additifs chimiques	37
V.4. L'utilisation extraits de plantes	40
V.5. La réduction du méthane par l'utilisation des produits nitreux	40
V.5.1.Les nitrates	40
V.5.2. Le 3-nitrooxypropanol	41
V.5.3.Les nitrites	41

### **Matériel et Méthodes**

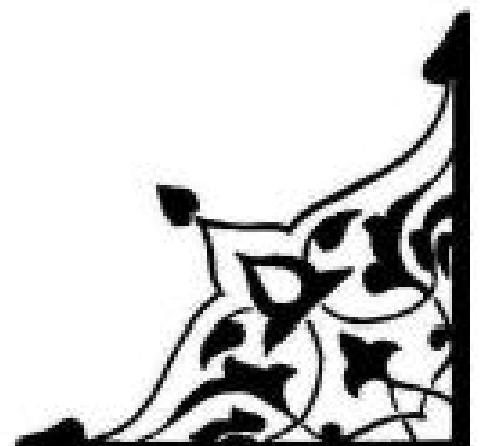
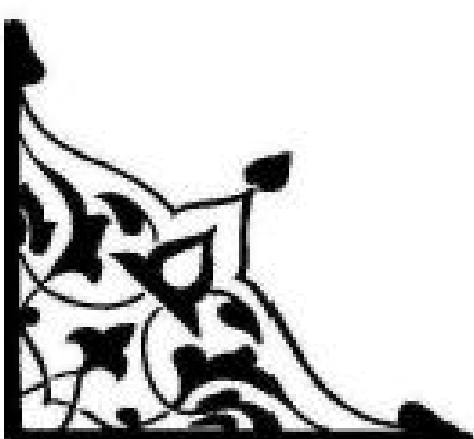
I.L'échantillonnage	42
II. Etude physico-chimique	43
II.1. La température	43
II.2. Le pH	44
II.3. La matière sèche	44
III. Le suivi de l'effet des additifs nitreux sur la flore ruminal	46
III.1. Préparation du milieu de culture (la salive artificiel)	46
III.2. L'inoculation	47
III.3. Incubation	48
III.4. Mesure de la croissance bactérienne (Densité optique)	49
III.5. Mesure du pH	49
IV. Le comptage de protozoaires	49

## Résultats et Discussion

I. Résultats de l'étude physico-chimique	51
I.1. Mesure de la température	51
I.2. Mesure de pH	51
I.3. Mesure de la matière sèche	51
II. Le suivi de l'effet des produits nitreux sur la flore ruminal ( <i>in vitro</i> )	52
II.1. L'effet des nitrates sur la flore ruminal	52
II.2. L'effet des nitrites sur la flore ruminal	54
III. Le comptage des protozoaires	55
IV. Suivi du pH du milieu au cours de l'incubation	56
Conclusion	57
Référence bibliographique	

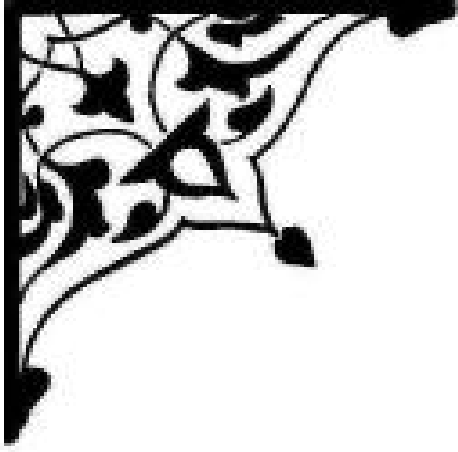


*LISTE*  
*DES FIGURES*

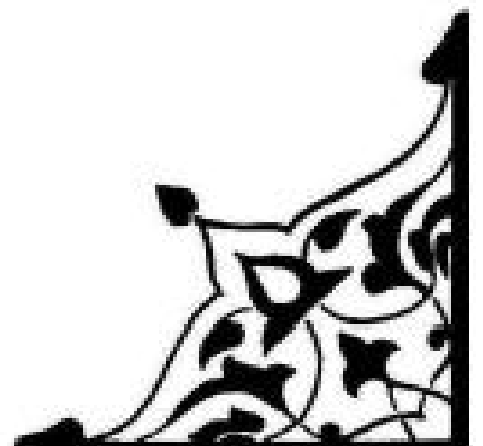
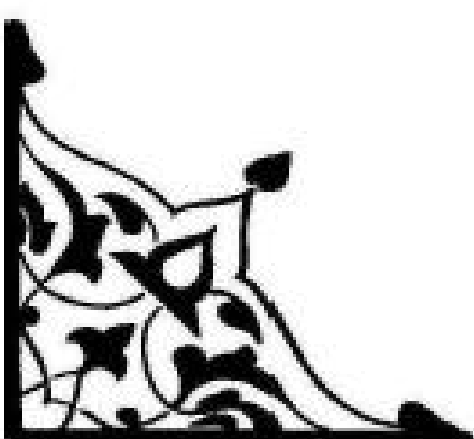


<b>Figure 1.</b> Les quatre parties de l'estomac des ovins	<b>5</b>
<b>Figure 2.</b> Production de l'ATP par la voie PTE (phosphorylation par transport d'électrons)	<b>8</b>
<b>Figure 3.</b> Photographie de l'animal placé en position latérale droite	<b>13</b>
<b>Figure 4.</b> Photographie des points d'anesthésie en « L » inversé	<b>14</b>
<b>Figure 5.</b> Photographie des deux régions d'incision	<b>15</b>
<b>Figure 6.</b> Photographie de l'extériorisation du rumen	<b>16</b>
<b>Figure 7.</b> Photographie de l'insertion de la canule	<b>16</b>
<b>Figure 8.</b> Les canules d'insertion	<b>17</b>
<b>Figure 9.</b> Schéma de la chaîne trophique de la méthanogenèse et ses différentes étapes	<b>31</b>
<b>Figure 10.</b> Fonctionnement du rumen et modifications induites par l'ajout de nitrate dans la ration	<b>41</b>
<b>Figure 11.</b> Photographie du Thermos préchauffé à 39°C	<b>42</b>
<b>Figure 12.</b> Photographie de prélèvement de jus de rumen	<b>43</b>
<b>Figure 13.</b> Photographie de la mesure de la température	<b>43</b>
<b>Figure 14.</b> Photographie du pH mètre	<b>44</b>
<b>Figure 15.</b> Photographie du creuset avec le jus de rumen	<b>45</b>
<b>Figure 16.</b> Photographie de la salive artificielle	<b>47</b>
<b>Figure 17.</b> Photographie des flacons remplis placée à l'étuve à CO <sub>2</sub>	<b>48</b>
<b>Figure 18.</b> Photographie du prélèvement avec des seringues chaque 2 heures	<b>49</b>
<b>Figure 19.</b> Photographie du dénombrement des protozoaires par la cellule de Mallasez	<b>50</b>
<b>Figure 20.</b> Cinétique de la croissance bactérienne à 600 nm en fonction du temps et en	

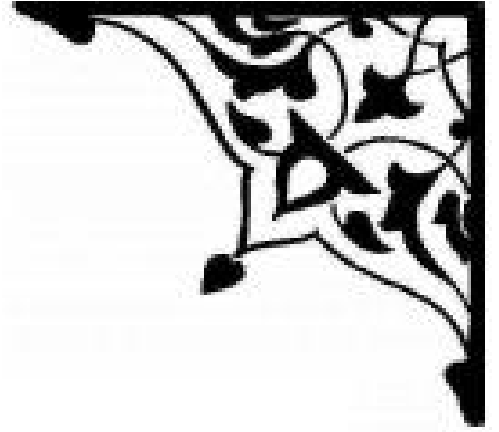
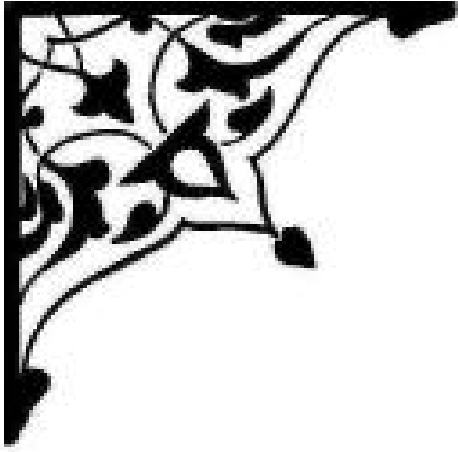
présence de nitrate comme additif (avec différentes concentrations)	<b>52</b>
<b>Figure 21.</b> Photographie montre la production de gaz après 5 heures d'incubation	<b>53</b>
<b>Figure 22.</b> Cinétique de la croissance bactérienne à 600 nm en fonction du temps et en présence de Nitrite comme additif (avec différentes concentrations)	<b>54</b>
<b>Figure 23.</b> Cinétique du nombre de protozoaires en présence de Nitrate et de Nitrites comme additifs	<b>55</b>
<b>Figure 24.</b> Evolution du pH au cours de l'incubation, en présence de Nitrate et de Nitrite comme additifs	<b>56</b>



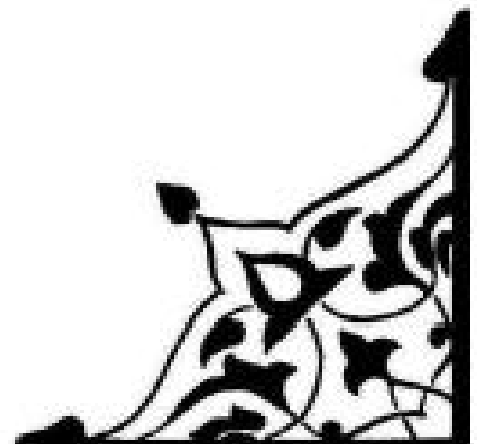
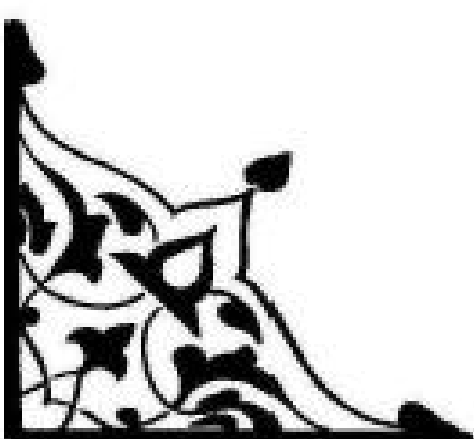
***LISTE  
DES TABLEAUX***



<b>Tableau I.</b> Caractéristique de quelques bactéries du rumen	<b>22</b>
<b>Tableau II.</b> Les principales espèces des champignons isolées du tube digestif des ruminants	<b>29</b>
<b>Tableau III.</b> Substrats et habitats typiques des <i>Archaea méthanogènes</i>	<b>33</b>
<b>Tableau IV.</b> Traitements possibles pour diminuer la méthanogenèse ruminal	<b>39</b>
<b>Tableau X.</b> Les différents constituants de la salive artificielle	<b>46</b>
<b>Tableau VI.</b> Préparation de la solution MFS (methylgreen-formalin-saline)	<b>50</b>



***LISTE  
DES ABBREVIATIONS***



**AAHL** : Le personnel des laboratoires australiens de santé animale

**ACS** : Animal Care Service

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ADP** : Adénosine -Diphosphate

**AGV** : Acide Gras Volatile

**ALA** : Acide linoléique

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ATP** : Adénosine-Triphosphate

**BES** : Acide 2-bromoethane sulfonique

**COA** : Co enzyme A

**CSM** : farine de graines de coton

**ENSAIA** : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des industries alimentaires

**FAD** : Flavine Adénine Di nucléotide

**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique

**L** : Lombaire

**NAD** : Nicotinamide Adénine Di nucléotide

**PCR** : Réaction en Chaîne par Polymérase


**PH** : Potentiel d'hydrogène

**Pi** : Phosphate inorganique

**PTE** : Phosphorylation par voie d'électron

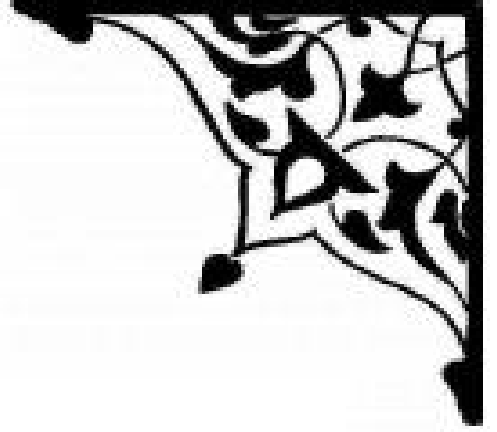
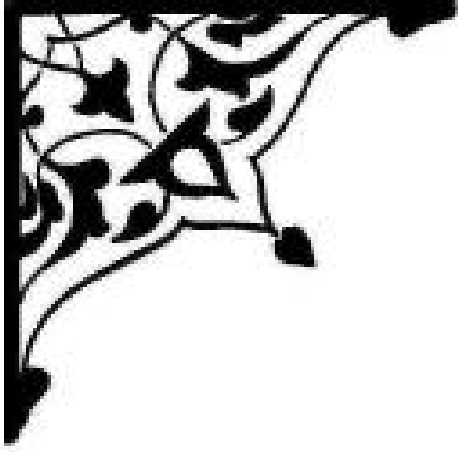
**PTS** : Phosphotransférase

**SF6** : hexafluorure de soufre

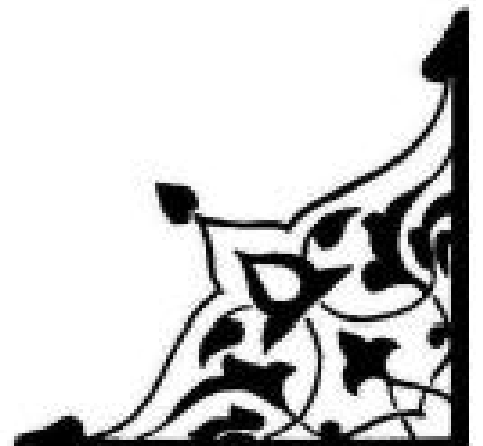
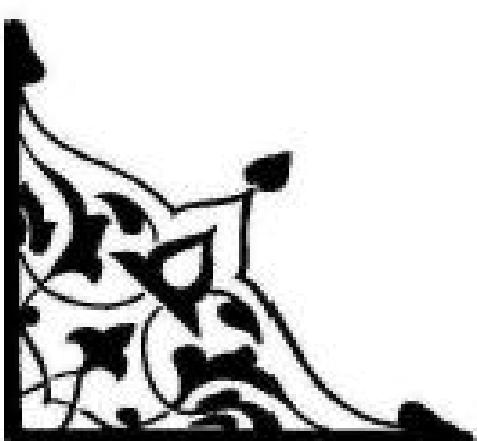


*« Un pessimiste voit la  
difficulte dans chaque  
opportunitè, un optimiste voit  
l'opportunitè dans chaque  
difficulte »*

*Winston churchill*



***INTRODUCTION***  
***GENERALE***



Les ruminants diffèrent des autres mammifères par leur nourriture qu'est soumise à une fermentation microbienne dans le rumen avant de passer à l'estomac réel et au tractus intestinal où se produit une digestion mammaire normale. Les processus qui se déroulent dans le rumen en raison de l'activité microbienne comprennent la dégradation des hydrates de carbone tels que la cellulose qui ne peut être utilisée que si elle est digérée par des microorganismes [22].

Les produits résultants de la fermentation microbienne constituent alors une source d'énergie (acide gras volatils) et de protéines (cellules microbiennes) disponibles pour le métabolisme des tissus de l'animal. Cependant, la fermentation ruminal engendre également des produits métaboliques non valorisables par l'animal, principalement le CH<sub>4</sub> et le CO<sub>2</sub>.

La méthanogenèse biologique est le résultat de l'activité de micro-organismes anaérobies stricts : les *Archaea*, qui utilisent principalement l'acétate, le méthanol, l'hydrogène/CO<sub>2</sub>, le formiate et les méthylamines comme substrats. 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 à quelques semaines, respectivement. Les systèmes avec rétention longue permettent la transformation complète des substrats en CO<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>, ceux avec une rétention courte engendrent la formation de produits intermédiaires qui s'accumulent dans les milieux de fermentation [105].

La production de méthane dans le rumen représente une perte d'énergie sur le plan de la production animale, puisque une partie de l'aliment ingéré est érucitée sous forme de gaz CH<sub>4</sub> dont la formation ruminal au dépend du CO<sub>2</sub> mobilise à perdre une partie de l'énergie métabolique microbienne [104].

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) et d'autres techniques basées sur des molécules substituant fixatrices de l'H<sub>2</sub>, tels que les composés azotés (nitrates et/ou nitrites). Les produits nitreux inhibent la méthanogenèse ruminale jusqu'à 90% *in vitro*, tels que le nitroéthane, le 2- nitroéthanol, le 2-nitro-1-propanol et l'acide 3-nitro-1 propionique qui inhibent la production de CH<sub>4</sub> ruminale *in vitro* [114].

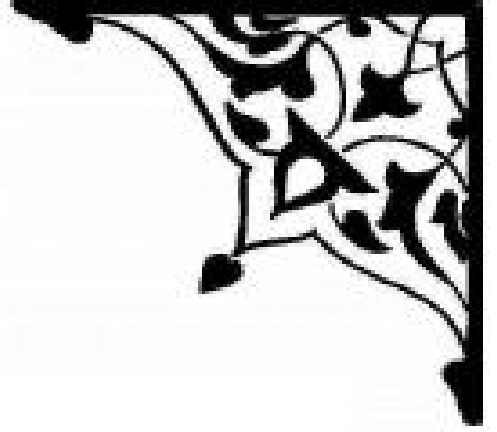
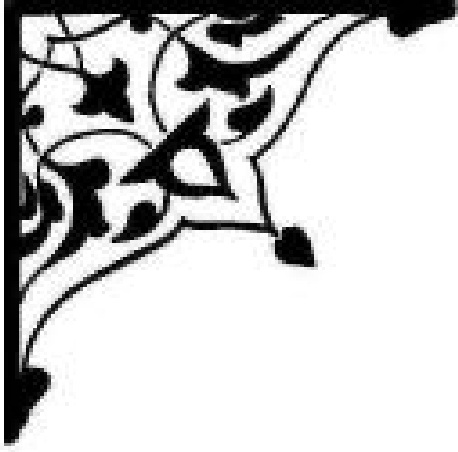
Malheureusement, ces méthodes de réduction agissent directement ou indirectement sur la flore du rumen. L'utilisation des antibiotiques été une des stratégies de réduction de méthane qui ont une action significative sur les bactéries Gram positifs, encore l'utilisation des probiotiques (agents biologique) qui rentrent en compétition avec les bactéries méthanogènes sur l'utilisation d'hydrogène, les additifs chimiques comme inhibiteur de la méthanogènèse , ou l'utilisation des extraits des plantes par leurs effet bactéricide en inhibant l'orientation des fermentations ruminales, soit par l'utilisation des produits nitreux à base d'azote avec différentes concentrations.

Dans ce contexte que nous avons entamé l'étude de l'effet de différentes concentrations des produits nitreux (nitrates et nitrites) sur la flore ruminale *in vitro*.

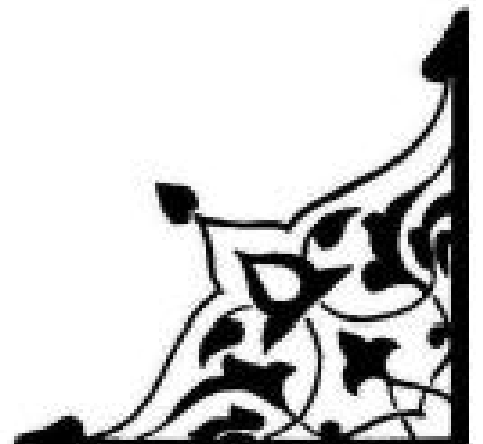
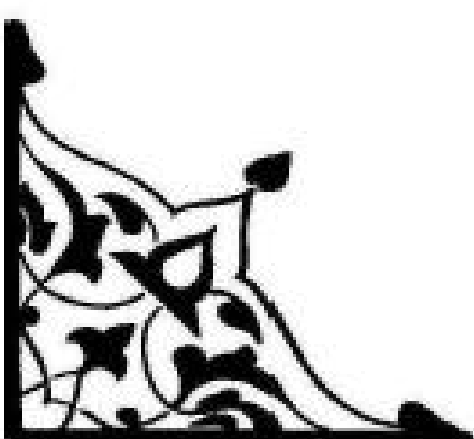
Pour cela, ce travail est composé de trois parties principales et d'une conclusion générale. Le premier chapitre est l'étude bibliographique consacrée à l'étude de la flore ruminal, la méthanogènèse et les techniques de réduction du méthane.

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 l'effet des produits nitreux sur la flore ruminale



***PHYSIOLOGIE  
DU RUMEN***



## I. La physiologie du rumen

### I.1. Anatomie du rumen

L'estomac des ruminants occupe les 4/5 de la cavité abdominale, elle est constituée de quatre estomacs ; dont le premier estomac est la panse (ou rumen) où se déroule le premier arrêt des nutriments pour leurs remâche à fin de faciliter la digestion ; après, les nutriments se déplacent au réticulum (ou réseau). Ensuite au feuillet (ou omasum) pour arriver à la caillette ou (abomasum), ces deux dernières pour d'autres botanistes forment que le troisième estomac [35].

#### I.1.1. Le rumen (la panse)

Le rumen a été longtemps considéré comme un simple compartiment digestifs où environ 50% des aliments ingérés par le ruminant sont hydrolysés puis fermentés par une population microbienne dense et variée qui fournit de 70 à 90% des nutriments utilisés par l'animale [1].

Il est de loin le plus volumineux des réservoirs pré-gastriques. Il s'ouvre largement vers l'avant sur le réseau qui peut être considéré comme un diverticule du rumen. Quand on parle de la digestion dans le rumen, on inclut toujours le réseau. La surface intérieure du rumen, à l'exception des piliers charnus qui le divisent en plusieurs sacs, est constituée par un épithélium corné, hérissé de papilles de formes et de dimensions variables, nombreux, serrées les unes contre les autres, et qui jouent un rôle majeur dans l'absorption des produits du métabolisme des microorganismes du rumen : acides gras volatils (AGV) et l'ammoniac [3].

Le rumen dont son nom vient de sa muqueuse réticulée et parsemée également de papilles absorbantes, joue un rôle central dans la circulation des particules. C'est du réseau que partent, à une fréquence de l'ordre d'une minute, les contractions qui assurent la motricité de l'ensemble des réservoirs gastriques. Les particules qui franchissent l'orifice réticulo-omasal doivent avoir une taille moyenne inférieure ou égale à 1 mm. Les aliments solides sont donc séquestrés dans le rumen tant qu'ils n'ont pas acquis la taille minimale. Celle-ci est atteinte en un temps plus ou moins long (de quelques heures ou plusieurs jours) sous l'action combinée des enzymes de la population microbienne et de la mastication lors de l'ingestion et de la rumination ou (mastication mérycique) [3].

### I.1.2. Le feuillet (omasum)

Le feuillet est un organe sphérique (bovin) ou ovoïde (mouton) à l'intérieur duquel on trouve de très nombreuses lames recouvertes d'un épithélium kératinisé, qui possède également des papilles. La cavité du feuillet est limitée à un canal qui communique en amont avec le réseau par un sphincter (sphincter réticulo –omasal), en aval avec la caillette par un orifice beaucoup plus large et dilatable [3].

C'est un réservoir volumineux, sa paroi intérieure est tapissée de très nombreuses lamelles muqueuses. Semblable aux feuillets d'un livre, d'où son nom, ces lamelles déposées parallèlement au passage des aliments [2].

### I.1.3. Le réseau (caillette)

La caillette est le seul réservoir sécrétoire de l'estomac des ruminants. Sa cavité est tapissée par une muqueuse glandulaire, analogue à celle des monogastriques, toujours recouverte d'une couche de mucus. Les fonctions digestives de la caillette des ruminants sont analogues à celles de l'estomac des mammifères monogastriques.

Le contenu du rumen est un milieu relativement constant qui évoque à certains égards celui d'un réacteur en continu de micro-organismes anaérobies [3].

Le rumen se caractérise par :

Une concentration élevée en eau : 85% à 90%,

Une température constante de 39° à 40°C ;

Un potentiel d'oxydoréduction variant de -250 à -400 mV (milieu fortement anaérobie) ;

Un pH généralement compris entre 6 et 7.

Une pression osmotique constante proche de celle du sang ;

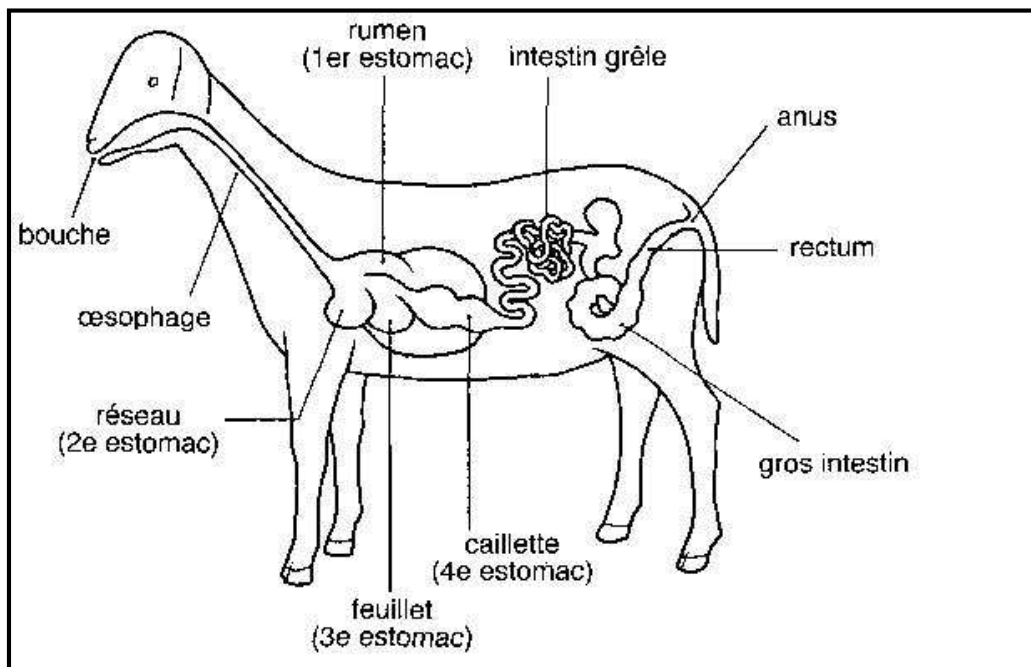
Un apport régulier de nutriments et d'eau fourni à la fois par l'ingestion des aliments et par la rumination,

Une élimination continue des produits du métabolisme, soit par absorption à travers la paroi du rumen (acides gras volatils, ammoniac), soit par passage dans la partie postérieure du tube digestif (résidus alimentaires, cellule microbiennes), soit par éructation (méthane gaz carbonique).

Une relative constante de l'atmosphère gazeux situé au niveau du sac dorsal ( $\text{CO}_2$  : 60 à 70%,  $\text{CH}_4$  : 30 à 40%) ;

Un brassage permanent assuré par les contractions périodiques de la paroi et par la rumination,

Le rumen donc est un milieu particulièrement bien adapté au développement d'une population microbienne anaérobie dont les principaux constituants sont les bactéries et les protozoaires [3].



**Figure 1.** Les quatre parties de l'estomac des ovins [8].

## I.2. Les conditions physico-chimiques du milieu ruminal

### I.2.1. Le pH

Le pH joue un rôle important dans la régulation de l'activité microbienne, il est pratiquement stable (entre 6 et 7). Mais une fermentation rapide baisse le pH à moins de 5, ce qui est favorable à la croissance des microorganismes qui produisent essentiellement le propionate et le lactate. La salivation abondante et continue chez le dromadaire assure au rumen un pouvoir tampon, par rapport d'une grande quantité d'ions bicarbonate et phosphate.[2]

Bien que le pH soit l'un des principaux facteurs déterminant l'activité microbienne, son influence est en réalité encore mal analysée dans ces mécanismes [7].

Par comparaison avec le pH sanguin maintenu à l'état normal dans une gamme inférieure à pH=0.1, et dont les variations pathologiques extrême reste contenues dans une gamme n'excédant pas à un pH d'amplitude[6].

Le pH du rumen peut apparaitre comme très fluctuant. Il est difficile d'assigner les limites précises à la gamme des valeurs normales du pH du rumen. Les mesures faites dans les conditions du terrain, sur de grands effectifs d'animaux recevant des régimes variés et en état de santé apparemment correct conduisent invariablement à gammes du trop large. Les valeurs les plus basses de cette gamme concernent des animaux qui peuvent être en acidose latente, les plus hautes pouvant résulter tous simplement d'une interruption un peu longue de l'ingestion. La définition d'une gamme normale ne peut donc se faire que vis-à-vis d'un rumen sain et en fonctionnement [6].

Des déviations excessives du pH du rumen sont la conséquence de déséquilibres des fermentations induites par rapport d'aliments dont les caractéristiques chimiques, physiques ou quantitatives étaient inadaptées. La déviation dans le sens de l'acidose fournit l'exemple le plus typique des interactions entre l'aliment et le pH du milieu et la micro population. L'apport excessif et brutal de substrats amylacés générateurs d'acide lactique est la cause d'une baisse marquée du pH du rumen (acidose lactique aigue). Les valeurs de pH les plus basses trouvées lors de la mort des animaux sont généralement égale ou inférieure à 5,0. Des valeurs quelques fois très inférieurs par exemple 3,0, ont été signalés mais il s'agit généralement de travaux anciens dont les conditions de mesure sont mal précisé, ou encore des mesures effectués sur des prélèvements *post mortem* qui peuvent refléter la poursuite de la fermentation lactique [6].

La liaison entre le pH et la proportion relative des AGV été décrites par **Kaufman et Rohr en 1967** ; la relation directe qui existe entre la ration, le pH ruminal et le bilan des fermentations permet d'en tirer les conséquences au plan nutritionnelle. Cela explique que si, pour la production de viande, la seule limite à la baisse de pH est la santé des animaux puisque l'accroissement de la proportion relative du propionate (C3) qui accompagne la baisse de pH augmente l'efficacité énergétique de la ration pour la croissance, il n'en va pas de même en production laitière [6].

L'accroissement de la proportion de C3 stimule en effet l'utilisation des nutriments par les tissus de réserve, au détriment de la mamelle. Le maintien du pH du rumen au voisinage de la neutralité (pH supérieur 6,0) par addition de substances tampons à la ration, ou par

substitution de glucides lentement fermentescibles aux céréales permet de limiter l'augmentation de la proportion du C3 et de conserver à la ration une efficacité satisfaisante [6].

En ce qui concerne les mécanismes reliant le pH à l'activité microbienne, une première relation a été mise en évidence avec la pression partielle d'hydrogène ( $H_2$ ), la fermentation des glucides conduits à l'acétate préférentiellement. A forte pression d'hydrogène les principaux produits formés sont le butyrate et le propionate. L'hydrogène excédentaire ne peut plus être éliminé par fixation sur les radicaux carbonés courts comme le  $CO_2$ , par la méthanogène [6].

### **I.2.2. La température**

Elle est généralement supérieure à celle du corps de l'animal: 39 à 40.5°C. Cependant, elle peut atteindre 41°C lors de la grande fermentation [2].

### **I.2.3. Le potentiel d'oxydoréduction**

Le rumen constitue un écosystème fortement anaérobie, son potentiel d'oxydoréduction moyen est de -350mv. 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 [2].

### **I.2.4. La pression osmotique**

Elle est identique à celle du sang dans les conditions normales d'alimentation. 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 [2].

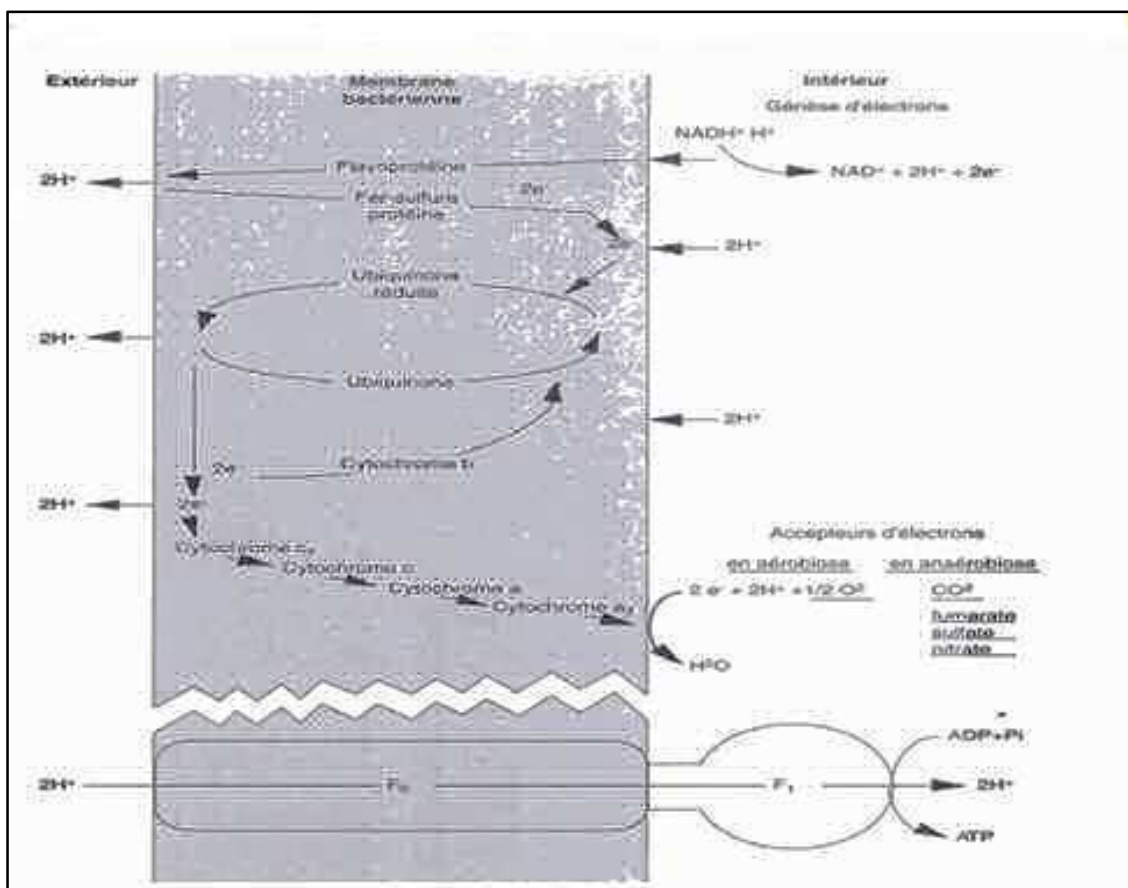
## **I. 3. L'anaérobiose et les voies de production de l'ATP**

L'ATP produit à partir des réactions de catabolisme dans la cellule sert à transporter l'énergie qui est nécessaire aux réactions de synthèse  $ATP \longrightarrow ADP + Pi$ .

L'ATP synthétisée au cours de réactions chimiques impliquant des substrats capables de perdre un groupement phosphate en générant de l'énergie (Voie de phosphorylation liée

aux substrats= c'est la voie **PLS**). La plus part de l'énergie produite au cours des réactions cataboliques est transformées directement en ATP selon la voie de PLS.

Une autre voie bien connue en anaérobiose a pu être mise en évidence chez certaines bactéries du rumen. L'établissement d'un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane cellulaire qui est liées aux transports intra membranaire d'électrons (Phosphorylation par voie d'électron-Voie de PTE) lui-même initié par un transfert de protons de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule créé une force proton mobile FPM. Cette force peut être utilisée par certains microorganismes pour produire de l'énergie (Cas des bactéries méthanogènes) ; le transfert d'énergie dans la voie PTE se fait via l'ATP, qui est produit le complexe ATP-ATP ase situé dans la membrane au cours du retour des protons vers l'intérieur de la cellule (Figure 02). Dans le rumen l'accepteur final d'électrons peut être le fumarate qui est réduit en succinate, le CO<sub>2</sub> réduit en CH<sub>4</sub>, le sulfate réduit jusqu'au stade de sulfure ou bien le nitrate réduit en nitrite [5].



**Figure 2.** Production de l'ATP par la voie PTE (phosphorylation par transport d'électrons) [5].

La contribution de la voie PTE à la production totale de l'énergie dans le rumen est probablement faible. Elle intervient en particulier lors de l'oxydation des cofacteurs réduits NADH, NADPHH et FADH qui génère les électrons à l'origine du processus de PTE. L'ester qui libère de CoA et le propionate. La seconde voie dite « directe » transforme le lactate en acétyl CoA lesquels est ensuite réduit et hydrolysé pour libérer le COA et le propionate, la contribution de cette dernière voie à la production de propionate dans le rumen est généralement mineure. Elle devient plus importante dans le cas de régime riches en concentrés qui favorisent la production de lactate et son utilisation par *Megasphaera elsdenii*. [5].

Les AGV supérieurs sont formés par condensation de l'acétyl CoA et de propionyl-CoA, les réactions inverse à la B-oxydation qui sont mises en jeu, conduisent à l'oxydation d'équivalent réduits.

La production de CH<sub>4</sub> par réduction du CO<sub>2</sub> dans le rumen a un effet déterminant sur l'orientation des fermentations et sur leurs rendements en ATP. Les réactions intermédiaires qui interviennent dans la formation du CH<sub>4</sub> ont une énergie libre faible en valeur absolue voire positive. Seule l'énergie libre de la dernière étape de réduction du méthanol est importante (-26.9Kcal). L'énergie libre de l'ensemble de méthanogènes (-32.4Kcal) est suffisante pour permettre la synthèse d'ATP probablement selon le processus de PTE [5].

Les microorganismes du rumen consomment l'ATP lors du transport des substrats dans les cellules bactériennes, la plus part des aliments ingérés par le ruminant se trouvent sous forme de polymères insolubles. Ils doivent être dégradés en molécules plus simple par des enzymes extracellulaires des bactéries avant d'être utilisée par ces dernières la faible concentration en molécules fermentescibles dans le milieu ruminal nécessite que celles-ci soient transportés par un mécanisme actif à l'intérieur des cellules pour y être métabolisées et produire de l'ATP. Ce processus est moins important pour les protozoaires qui ingèrent des particules alimentaires et les hydrolysent par leurs enzymes endocellulaires. Les produits formés sont alors métabolisées *in situ* sans devoir être préalablement transportés [5].

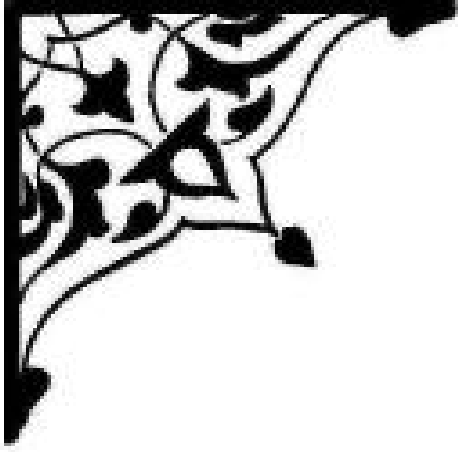
Trois systèmes de transport ont été identifiés chez les bactéries du rumen :

Des protons ou des cations sont Co-transportés avec le soluté vers l'intérieur de la cellule. L'énergie provient alors de la « Force Proton Motrice » ou de tout autre gradient électrochimique qui se crée ainsi à travers la membrane.

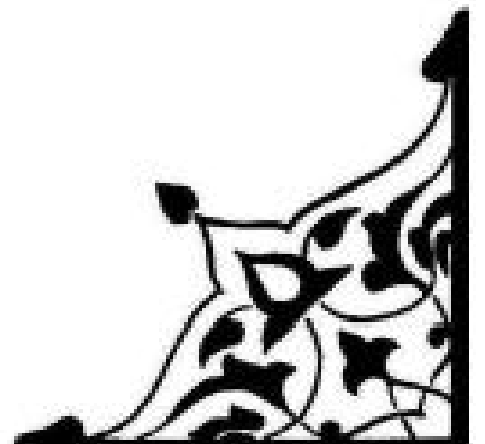
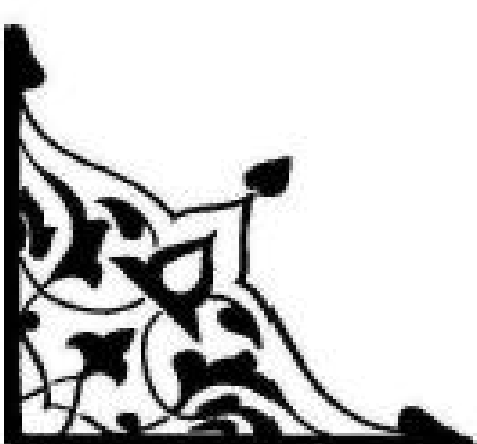
Le substrat s'associe à une protéine spécifique liée elle-même membrane périplasmique et qui assure le transport à travers la membrane cellulaire en consommant de l'ATP.

Le substrat est chimiquement transformé lors de son passage à travers la membrane. Ainsi le système de glucose phosphotransférase (PTS) transforme le glucose en glucose 6-p en utilisant un phosphoénolpyruvate lors de transport chez *E. coli*. Ce dernier mode de transport relativement économe en énergie est le plus utilisé par les bactéries du rumen [6].

Les microbes du rumen utilisent l'ATP produit au cours des fermentations pour couvrir leurs besoins énergétiques d'entretien et pour assurer leur croissance. L'ATP réellement utilisé pour la croissance sera donc d'autant plus importants que l'énergie nécessaire à l'entretien des bactéries sera faible. Selon (Marr et al 1963) l'entretien peut se calculer à partir des cellules supplémentaires que l'on obtiendrait si tout l'ATP était utilisé pour la croissance [5].



*LA*  
*FISTULATION*



### II. La fistulation

#### II.1. Historique

Il s'agit d'une procédure de fistule ruminale décrite pour la première fois par Schalk (1928) pour les bovins et modifiée pour les moutons par Hecker (1969), une opération préparatoire est effectuée brièvement lorsqu'une petite partie de la paroi du rumen est extériorisée par laparotomie puis une pince métallique est appliquée pour obturer l'apport sanguin afin de produire une adhérence entre la paroi du rumen et le bord d'une incision cutanée. Durant plusieurs jours, la fistule se développe par adhérence progressive de la paroi du rumen à la peau, avec nécrose et déchirement du pli du rumen. Après cela la canule est insérée à travers la fistule [18].

La pratique de la fistulation (ou canulation) ruminale est attestée en 1831 dans le cadre des expériences de Marie-Jean-Pierre Flourens sur les mécanismes de la rumination. Dans un mémoire de l'Académie des Sciences, Flourens décrit la manière dont il a pratiqué des ouvertures dans chacun des quatre "estomacs" de plusieurs moutons en établissant ce qu'il appelle des « anus contre nature » [11].

Par la suite, cette opération est pratiquée sur d'autres animaux, principalement des ruminants; son objet principal est en effet de fournir un accès aisé au rumen pour permettre l'étude de sa physiologie et le prélèvement d'échantillons sans sacrifice de l'animal [12]. La plupart des études sur la physiologie du rumen ont porté sur des animaux fistulés [47].

La première attestation de l'utilisation de cette technique sur des bovins date de 1854 (N). La technique connaît plusieurs évolutions au cours de la première moitié du XX<sup>e</sup> siècle. En particulier, le choix des matériaux pour la conception de la canule (aluminium, chrome, ébonite, lucite, etc.) a fait l'objet de plusieurs travaux scientifiques [14].

Il semble qu'aucun dispositif mécanique n'ait été prévu pour l'obturation de la canule avant les travaux de Schalk et Amadon en 1928 [15].

Les systèmes d'obturation doivent permettre de limiter la perte de fluides et de gaz, et donc de réduire au minimum les interférences dans le fonctionnement normal du rumen [16].

La pratique de la fistulation ruminal est répandue dans le monde entier du fait de sa simplicité de mise en œuvre, du très faible risque d'infection et de l'absence apparente de perturbation de l'animal [16].

La pose d'une canule permet, entre autres :

L'étude du transit et des flux digestifs via l'infusion de marqueurs indigestibles.

L'analyse des produits terminaux de la digestion.

L'isolement et la quantification des populations bactériennes du rumen [17].

En 2013, en France les vaches fistulées sont notamment utilisées par l'INRA (l'Institut National de la Recherche Agronomique). On en trouve notamment à l'Unité de recherche sur les herbivores de Theix, sur la commune de Saint-Genès-Champanelle [19]. On trouve également des vaches fistulées à la ferme de la Bouzule, propriété de l'ENSAIA (L'école Nationale Supérieure d'Agronomie et des industries alimentaires) [20].

## II .2. Principe et but

### II.2.1. Principe

Le principe de la technique de fistulation du rumen est de faire une ouverture initiale à travers la paroi du corps dans la cavité péritonéale mais pas dans le rumen [47]. Le site usuel de la fistule du rumen est sur le côté gauche derrière les côtes bien qu'il puisse être introduit également dans le rumen antérieur. Il devrait être aussi élevé que possible pour réduire la perte de liquide, mais devrait être en dessous des muscles plus épais de l'arrière [47].

### II.2.2. But

Le but d'établir une fistule canulée étanche entre la lumière ruminal et l'environnement externe est de permettre l'examen des métabolites du rumen et de la population microbienne dans les essais de digestibilité *in vivo* de l'inoculant pour les essais de digestibilité *in vitro* et la surveillance des milieux de culture microbiens du spectacle évaluation de la motilité du rumen [18].

## II.3. Application

### II.3.1. Préparation de l'animal pour la procédure

Apporter les animaux à l'abri des ovins au moins une semaine avant la chirurgie pour permettre aux animaux de s'acclimater à l'environnement et à la manipulation humaine

Fournir un accès ad-libitum (autant qu'il plaise) aux aliments et à l'eau avant la chirurgie. L'expérience a indiqué qu'il est plus facile de localiser le rumen si la chirurgie n'est

pas effectuée par le jeûne aussi ne pas suralimenter les animaux car cela peut entraîner une difficulté à saisir la paroi du rumen.

Administrer l'injection du complexe prophylactique B (par exemple 5 ml d'injection intramusculaire d'une injection du complexe B, et cliver la zone chirurgicale le jour avant la chirurgie.

Administrer un antibiotique à action prolongée (par exemple oxytétracycline 20 mg / kg) et anti-inflammatoire (par ex flunixin 2 mg / kg) 30 minutes avant la chirurgie.

L'animal est amené en salle d'opération et levé sur la table d'opération et soigneusement retenu en position latérale (**Figure 3**).



**Figure 3.** Photographie de l'animal placé en position latérale droite [98].

Identifier la zone où la fistule sera située autour du flanc gauche (30 cm de la dernière côte et 5 cm sous la colonne vertébrale selon la taille de l'animal utilisé) et couper la zone si nécessaire[18].

### II.3.2. L'anesthésie locale

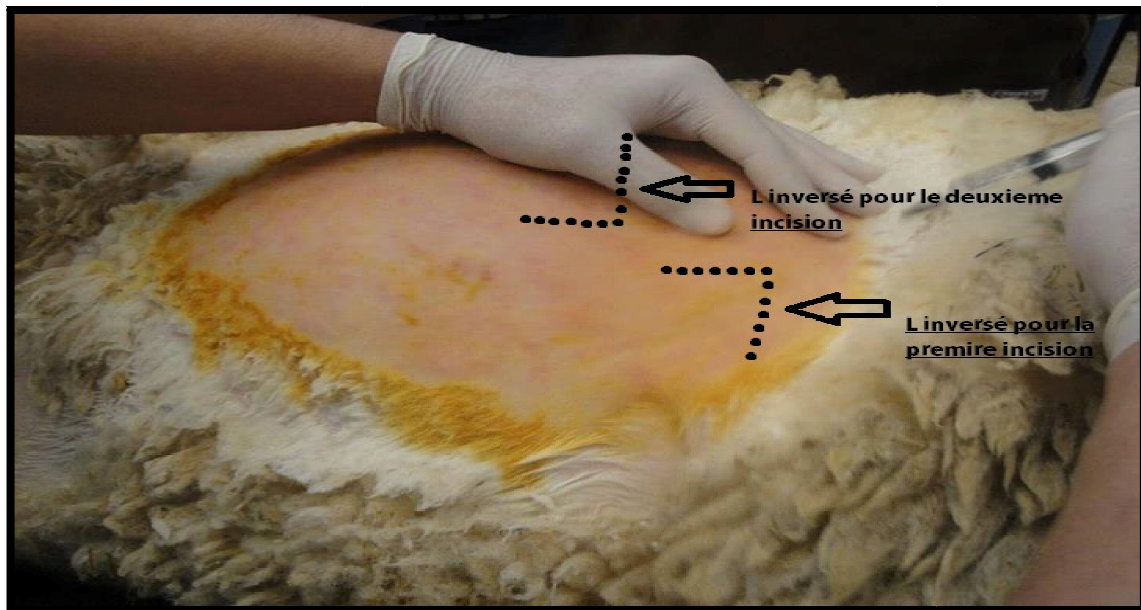
L'une des deux méthodes d'anesthésie locale peut être réalisée sur le flanc selon la compétence de l'opérateur

Une infiltration locale.

Bloc nerveux latéral paralomaire (bloc de Cornell)[18].

### A. Infiltration locale

Effectuer un bloc «L» inversé par injection sous-cutanée et intramusculaire autour de la partie antérodorsale de l'attache flanquant et frotter les régions où l'anesthésie locale doit être administré (Figure 4). Effectuer des injections par la Lignocaine. La dose totale ne doit pas dépasser 10 mg / kg de Lignocaine, par exemple pour un mouton de 50 kg ne doit pas dépasser 25 ml ; attendre 3 minutes jusqu'à ce que l'anesthésie prenne effet [18].



**Figure 4.** Photographie des points d'anesthésie en « L » inversé [98].

### B. Bloc nerveux

Localiser les extrémités des processus vertébraux transversaux L1, L2 et L4 (Lombaire). Clip et frotter la peau sur ces points de repère. En utilisant une aiguille hypodermique de 1 pouce et demi injecté 2 ml de Lignocaine aspirée à 2% avant chaque injection pour éviter une administration intraveineuse. L'administration réussie causera une anesthésie de la peau et des couches musculaires en environ 10 minutes et durera pendant la procédure courte [18].

### II.3.3. Opération chirurgicale

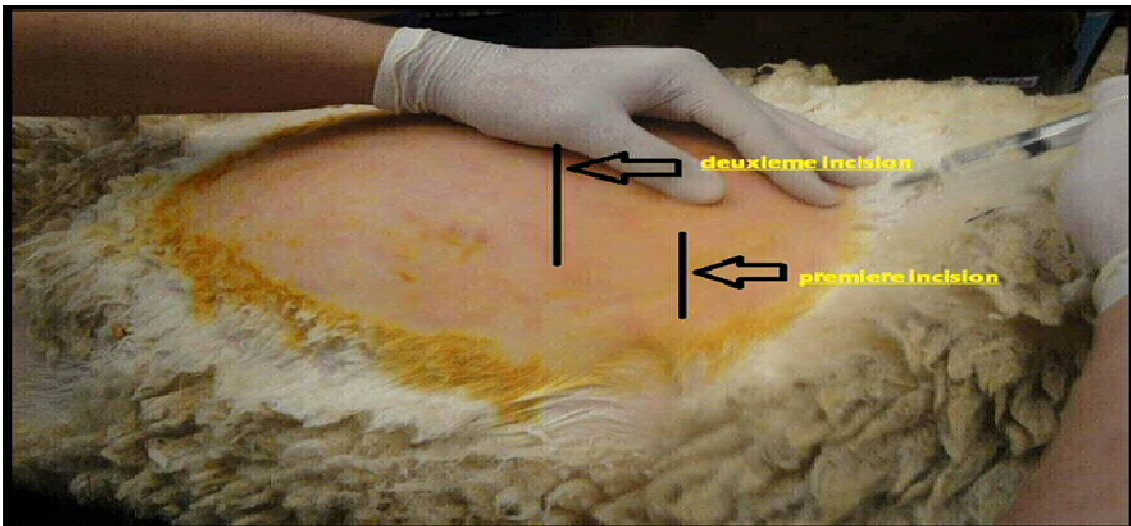
#### A. Extériorisation du rumen (Jour1)[18]

Effectuer trois gommages chirurgicaux de la zone clippée 4% chlorhexidine gommage chirurgical suivi de 70% éthanol. Frotter une zone à partir du site d'incision et de travailler dans un mouvement en spirale progressivement vers les marges de la zone rasée.

Laver les mains; porter des gants stériles et des vêtements de protection désignés. Ne touchez pas les surfaces ou objets non stériles.

Confirmer que le niveau d'anesthésie locale est adéquat.

Faire une incision cutanée initiale avec une cicatrice stérile: faire une incision antéropostérieure de 4 à 5 cm de long sur le site de la fistule prothétique(Figure 5)



**Figure 5.** Photographie des deux régions d'incision [98].

*1<sup>er</sup>* : pour l'entrée au rumen ; *2<sup>eme</sup>* : pour placé la fistule.

L'incision doit être de 6 à 7 cm de la dernière côte et de 5 à 6 cm de la colonne vertébrale, selon la taille de l'animal utilisé.

Utiliser principalement la technique de dissection émoussée pour pénétrer dans les couches internes du muscle abdominal.

Saisir le péritoineum avec une pince à dents de rats, une tente et un ange.

Localiser le rumen et maintenir avec la pince à tissu Allis. Il faut faire attention à ce stade pour s'assurer que c'est en fait le rumen qui a été localisé. Ceci est mieux fait en manipulant le rumen entre un pouce ganté et index, de sentir les papilles. Une deuxième personne est utilisée pour confirmer ceci avant de précéder.

Environ 3 cm de la paroi du rumen doivent être exposés. Fixer la pince sur la partie retirée du rumen. La pince est serrée pour occlure l'approvisionnement en sang à la partie extériorisée du rumen [18] (**Figure 6**).



**Figure 6.** Photographie de l'extériorisation du rumen [98].

### **B. L'évacuation et l'insertion de la canule (jour 9-15) [18]**

Observer les moutons au moins deux fois par jour afin de préempter le temps d'effondrement. La taille de la fistule diminue rapidement à la suite de l'effondrement, ce qui pourrait rendre l'insertion difficile.



**Figure 7.** Photographie de l'insertion de la canule [98].

Il est habituellement nécessaire d'étirer le diamètre de la fistule avant que la canule puisse être insérée. Cela peut être fait en insérant d'abord le doigt d'un gant en caoutchouc et en insérant progressivement des tiges solides en forme de crayon dans le doigt de gant. Une alternative consiste à insérer progressivement l'outil conique.

Si l'ouverture de la fistule n'est pas assez large, étirer doucement en insérant un tendeur en plastique dans la fistule. Cela peut prendre un peu de temps; si elle dure plus de 30 minutes, il est recommandé d'administrer l'anesthésie local à l'animal comme décrit précédemment. Si la fistule a rétréci au-dessous de 1,5 cm de diamètre, l'anesthésie locale facilitera le processus pour les moutons et l'opérateur.

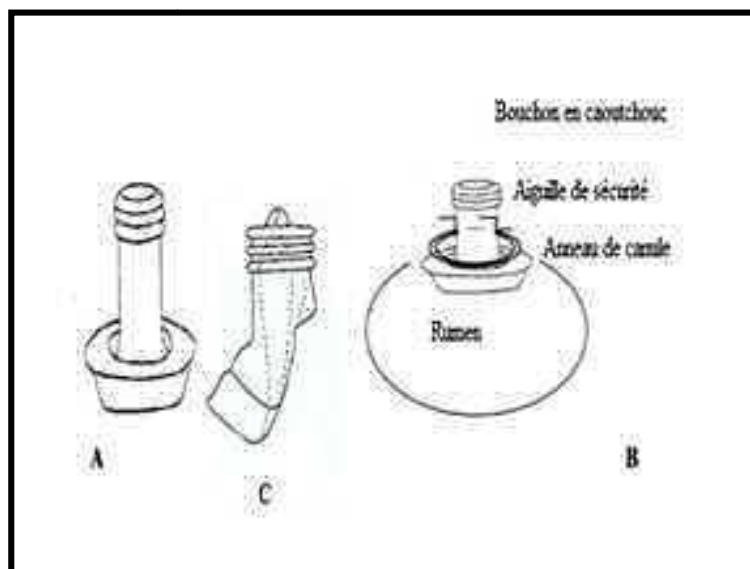
Tournez la canule à l'envers (**figure 8A**). Appliquez un mince revêtement d'obstétrique lubrifiante sur la bride interne et externe de la canule et autour de la fistule.

Fixer la canule, introduire la bride interne de la canule dans la fistule et la déplier à l'intérieur du rumen (**figure 8B**).

Glissez un anneau de la canule du péritoine sur la canule.

Insérer un bouchon de caoutchouc de taille appropriée pour sceller l'ouverture de la canule.

Administrer flunixin 1,1 mg.kg immédiatement après l'insertion de la canule pour soulager toute douleur et l'inconfort[18].



### **C. Nettoyage et ensuite insertion de la canule (9-10 jours après insertion de la canule primaire) [18].**

En retenant doucement l'animal; enlever la canule en coupant longitudinalement et en pliant et en retirant doucement du rumen.

Vérifier la fistule et éliminer tout tissu nécrotique autour du site de chirurgie.

Insérer une nouvelle canule (plier et lubrifier comme décrit précédemment).

### **II.3.4. Surveillance et soins post opératoires [18]**

Après la chirurgie, retourner les animaux à des petits enclos individuels dans une maison d'animaux permettre à l'eau d'accès et du foin pour stimuler la fonction du rumen. Maintenir sous observation étroite pendant plusieurs heures après la chirurgie initiale et après l'insertion de la canule.

Évaluer quotidiennement le site d'incision pour détecter des signes d'enflure, de saignement, d'irritation ou d'infection.

Nettoyer et surveiller le site chirurgical de l'infection et s'habiller avec crème antiseptique ou un onguent, comme la crème antiseptique Salvon si nécessaire. Administrer la flunixin à 1,1 mg / kg pour gérer les températures élevées et appliquer une poudre antibiotique topique (par exemple la poudre de Tricine) ou un antibiotique systémique (oxytétracycline 20 mg / kg répéter au bout de 2 jours si nécessaire).

Surveiller l'apport alimentaire et la température corporelle au moins une fois par jour.

Tout animal qui ne boit pas, ne mange pas ou ne manifeste pas de comportement anormal 24 heures après la chirurgie doit être inspecté par un vétérinaire et prendre les mesures appropriées.

Nettoyer le site chirurgical et le bord extérieur de la canule chaque semaine avec une solution antiseptique.

Appliquer un produit chimique de prévention des mouches, par exemple CLIK, afin de minimiser l'activité de la mouche autour de la canule. Documenter les activités post-opératoires dans les dossiers médicaux des animaux. La période de protection après l'application sera de 16 à 24 heures.

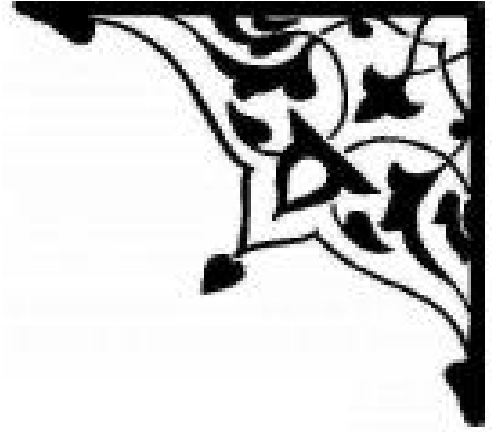
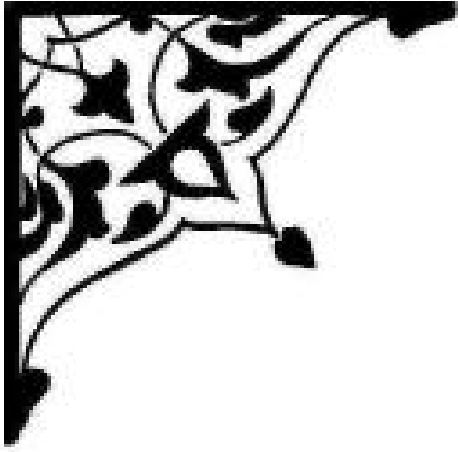
### II.3.5. Soins de longue durée[18]

Observer la présence et l'ajustement de la canule quotidiennement. Si une canule sort accidentellement, réinsérer immédiatement pour réduire le risque de déshydratation. En cas de fuite excessive, nettoyer à l'eau tiède.

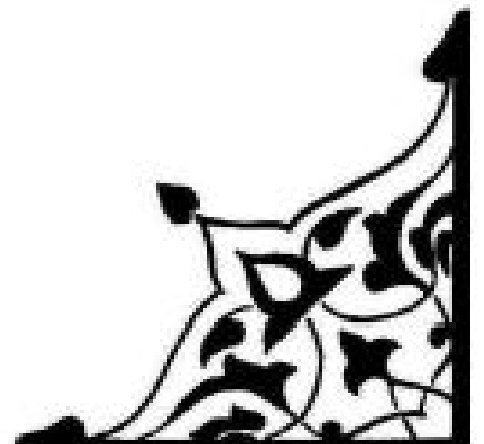
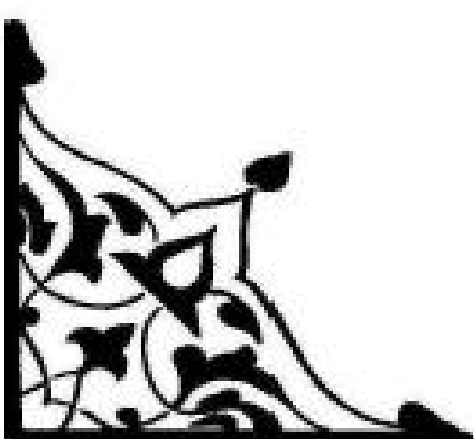
Surveiller et maintenir les moutons selon ACS : Animal Care Service.

Retirer la canule au moins une fois par an. Profitez de cette occasion pour examiner visuellement la surface interne du rumen. Rincez la canule et le gommage à l'eau tiède avant réinsertion, si un détergent a été utilisé pour nettoyer la canule, assurez-vous qu'il est rincé complètement avant la réinsertion de la canule. Remplacez la canule si elle a perdu sa souplesse ou si elle est craquée.

Appliquer un produit de prévention de la mouche, par exemple CLIK, afin de minimiser l'activité de la mouche autour de la canule. La période de protection après l'application sera de 16 à 24 heures.



***LA FLORE***  
***RUMINAL***



### III. La flore ruminal

La flore ruminal constitue l'une des particularités de la digestion des ruminants, sa composition varie en fonction des changements des conditions d'environnement pour cette raison celle-ci varie selon les espèces des ruminants mais encore de l'âge. Une véritable symbiose existe entre le ruminant et sa flore ruminal, les flores microbiennes autorisent la digestion de la cellulose et l'apport de protéine d'origine microbienne. Cette symbiose est un équilibre fragile qui peut si l'écosystème ruminal est perturbé se déplacer vers la production de substances toxiques [34]. La microflore ruminal est constituée de bactéries ( $10^{10}$ - $10^{11}$  cellules/g), de bactériophages ( $10^7$ - $10^9$  particules / g), de protozoaires ( $10^4$ - $10^6$  cellules / g), de champignons ( $10^2$ - $10^4$  cellules / g) et d'archées méthanogéniques ( $10^9$ - $10^{10}$  cellules / g) [66].

Certaines des bactéries, des protozoaires et des champignons possèdent les enzymes nécessaires pour hydrolyser les liaisons entre les résidus de glucides structuraux des plantes en sucres [41].

#### III.1. Les bactéries

Les bactéries constituent environ la moitié des organismes vivants, mais font plus de la moitié du travail digestif du rumen. Ils sont classés dans les digesteurs de fibres, les digesteurs d'amidon, de sucre, et de lactate à l'aide des bactéries utilisant l'hydrogène. Ils coopèrent ensemble et se croisent [32].

Le rumen contient plus de 60 espèces de bactéries, elles composent environ la moitié de la masse des microorganismes du rumen. La digestion des glucides alimentaires s'effectue en deux étapes; les osides (glucides complexes) sont d'abord dégradés en oses (glucides simples) puis les oses sont utilisés (fermentés) par les microorganismes. Les bactéries du rumen sont classifiées parfois selon le type de substrat qu'elles hydrolysent, on peut parler de bactéries cellulolytiques, amylolytiques, dextrinolytiques et saccharolytiques. L'hydrolyse des osides produit principalement du glucose, du fructose, de l'xylose et des acides uroniques (provenant des pectines et des hémicelluloses) qui sont convertis en xylose [39].

Des études détaillées sur la croissance et le métabolisme de toute espèce de bactéries isolées du rumen pourraient être bénéfiques aux connaissances de base en bactériologie, il est évident qu'en essayant d'appliquer cette connaissance à la fermentation ruminal, les espèces étudiées devraient être celles fonctionnelles dans le rumen. Il est plutôt de savoir que de

nombreuses espèces de bactéries présentes dans le rumen ne sont pas fonctionnelles, mais sont simplement passagers occasionnels apportés avec la nourriture [23].

Les bactéries sont les plus responsables de la majorité des activités de fermentation dans rumen. Les bactéries ruminales jouent un rôle dans la biotransformation des complexes de polysaccharides en sucre simple, qui sont fermenté en acide gras volatile [52].

De nombreuses espèces de bactéries anaérobies facultatives ont été isolées du rumen, mais dans de nombreux cas peu de preuves ont été présentées pour indiquer que ces bactéries étaient importantes, comprennent les membres des genres *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Proteus* et *Micrococcus* [22].

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 4ème jour chez 75% des jeunes des ruminants. 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.(Tableau I)[2].

Les produits de fermentation doivent être compatibles avec ceux présents dans le rumen ou y être métabolisés. Cependant, les espèces de bactéries du rumen, produisent *in vitro* de grandes quantités d'éthanol, qui ne semble pas être présent ou métabolisé dans le rumen dans les conditions habituelles. La production d'éthanol par ces cultures pures est probablement due à l'environnement artificiel et une étude des facteurs affectant sa production pourrait conduire à une nouvelle connaissance des interactions qui se produisent dans le rumen. Les caractéristiques culturelles telles que le pH, la température de croissance de la culture pure ainsi que les besoins nutritionnels doivent être compatibles avec l'environnement présent dans le rumen. En outre, le rumen peut contenir des substances qui inhibent la croissance d'espèces qui pourraient autrement fonctionner [22].

Tableau I. Caractéristique de quelques bactéries du rumen [2].

Espèce	Gram	Morpho	%G+C	Produits: majeurs et mineurs	Type
<i>Prevotella ruminicata</i>	-	Bâton	49-50	Acétate, succinate (Formate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovalérate, lactate)	Hémicellulose, protéines
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	-	Bâton	40-42	Formate, acétate, succinate (lactate)	Amidon
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	-	Bâton	47-49	Acétate, succinate (formate, propionate, isovalérate)	Cellulose
<i>Setenomonas ruminantium</i>	-	Croissant	54	Lactate, propionate, acétate, H <sub>2</sub> , Co <sub>2</sub>	Protéines sucres
<i>Butyrivibrio Fibrisolvens</i>	-	Bâton courbé	36-41	Formate, butyrate, acétate, H <sub>2</sub> , Co <sub>2</sub> (Lactate, succinate)	Répondue cellulolytique
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	-	Bâton		Propionate, succinate, acétate H <sub>2</sub> , Co <sub>2</sub> (lactate)	Lipides
<i>Vibrio (wolinetella) succinogenes</i>	-	Vibron	47	Succinate H <sub>2</sub> , Co <sub>2</sub>	Baisse H <sub>2</sub>
<i>Succinivibrio dextinosolvens</i>	-	Vibron		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 <sub>2</sub> (Lactate)	Lactate
<i>Sucinomonas amylolytica</i>	-	Coque ou bâton		Succinate (acétate, propionate)	Amidon
<i>Ruminococcus albus</i>	+	Coque	42-46	Acétate, éthanol, Co <sub>2</sub> (formate, lactate)	Cellulose
<i>Ruminococcus flavigens</i>	+	Coque	39-44	Acétate, succinate, H <sub>2</sub> (formate, lactate)	Cellulose
<i>Streptococcus bovis</i>	+	coque	37-39	Lactate, Co <sub>2</sub> (formate, acétate, éthanol)	Amidon
<i>Lachnospira multiparus</i>	+	Bâton		Formate, acétate, lactate, H <sub>2</sub>	Pectine
<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	Bâton		Formate, butyrate, lactate, Co <sub>2</sub> (succinate, éthanol)	Xylanes, sucres
<i>Lactobacillus ruminis</i>	+	Bâton	44-47	Lactate	Sucres
<i>Methanomicrobium sp</i>			49	CH <sub>4</sub>	formate
<i>Methanobacter ruminantium</i>			31	CH <sub>4</sub>	Formate
<i>Methanobacterium formicum</i>			41	CH <sub>4</sub>	Formate

Les bactéries travaillent ensemble. Certains nécessitent des facteurs de croissance, tels que les vitamines B, qui sont fabriqués par d'autres. Certaines bactéries aident à nettoyer le rumen des produits finis des autres, comme les ions hydrogène, qui pourraient s'accumuler et devenir toxiques pour d'autres organismes. C'est ce qu'on appelle l'alimentation croisée [32].

### III.1.1. Les bactéries cellulolytiques

Les bactéries cellulolytiques (digestives) sont des bactéries dont leur membranes ont la capacité de dégrader la cellulose qui sont partager de nombreuses genres bactériens appartient principalement aux *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et aux *Actinobacteria* dont le genre *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Bacillus*, *Fibrobacter*, *Cytophaga*, *Provetalla*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*[50].

Mais d'un point de vue fonctionnel, elles peuvent être divisées en trois groupes : les bactéries anaérobies dont la grande partie est proche *Clostridium* et également *Ruminococcus*, *Fibrobacter* et *Butyrivibrio*, et les bactéries cellulolytiques aérobie à enzyme extracellulaires appartenant au groupe des Gram positif qui comprend *Cellulomonas*[51].

Les digesteurs de fibre sont quelques unes des bactéries dans le rumen. Ils sont très sensibles à l'acide. Lorsqu'un ruminant présente une acidose (pH <6,0), le rumen produit une proportion plus faible d'acétate en propionate parce que les digesteurs de fibres qui produisent principalement de l'acétate ne fonctionnent pas bien. En outre, des niveaux élevés de matières grasses disponibles dans le rumen (généralement plus de 5% de l'alimentation) réduisent la croissance des digesteurs de fibres. La raison exacte de l'effet négatif de la graisse sur les digesteurs de fibres est inconnue. Certains pensent qu'il réduit la capacité du microbe à déplacer les éléments nutritifs dans et hors de son corps. D'autres pensent que les couches de graisse fibre de particules rendant difficile pour les microbes de digestion de la fibre d'entrer dans faire leur travail. On distingue comme espèces bactériennes: *Ruminococcus flavefacians*, *Ruminococcus albus*, *Bacteriodes succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens* [32].

L'amidon et les digesteurs de sucre constituent une partie importante de la population bactérienne du rumen. Des amidons et des digesteurs de sucre sont toujours présents, se nourrissant par croisement des sous-produits des digesteurs de fibres. On distingue: *Bacteriodes ruminocola*, *Bacteriodes amylophilus*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*[32].

*Streptococcus bovis*, "La mauvaise herbe de Rumen" n'est présent que lorsque de grandes quantités d'amidon ou de sucres sont nourris et que le pH est faible. Il produit de l'acide lactique, un acide plus fort que beaucoup d'autres produits dans le rumen. Lorsque les conditions sont favorables pour *Streptococcus bovis*, il se développera de façon explosive

(doublant toutes les 13 minutes). Ce type de croissance produit l'acidose du rumen. *Streptococcus bovis* est contrôlé par les ionophores[32].

Les bactéries cellulolytiques sont trouvés dans le rumen sous deux formes : des bacilles (parmi lesquelles sont majoritairement isolées *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrisolvens*) et des coques (représentés par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*).

### III.1.2. Les bactéries amylolytiques

Certain nombre des bactéries cellulolytiques ruminales sont également amylolytiques (comme certaines souches de *F. succinogenes*, et la plupart des souches de *B. fibrisolvens*). Les espèces non cellulolytiques – *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium* comprennent de nombreuses souches dégradant l'amidon [53].

D'autres espèces bactériennes sont capables de dégrader l'amidon, notamment *Ruminobacter amylophilus*, *Succinomonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantium* ou encore *Prevotella ruminicola* [53].

### III.1.3. Les bactéries à base de lactate

Certaines bactéries, telles que *Streptococcus bovis*, produisent un acide fort appelé acide lactique. *Megasphaera elsdenii* utilise de l'acide lactique pour se développer. Cela aide à nettoyer le rumen un peu et augmenter le pH du rumen, aidant à la croissance de la fibre digesteurs intolérants à l'acide[33].

On a suivi la croissance et le métabolisme des bactéries amylolytiques du rumen *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Bacteroides ruminicola*, cultivées dans des cultures pures et Co-cultures avec les bactéries lactilytiques du rumen *Megasphaera elsdenii* et *Veillonellae alcalescens*. L'interaction des bactéries amylolytiques avec *V. alcalescens* représente une chaîne alimentaire simple. L'interaction avec *M. elsdenii* est plus complexe, puisqu'il existe une concurrence simultanée pour les produits de la dégradation de l'amidon [35].

### III.2. Les méthanogènes

Les méthanogènes sont les seuls microorganismes connus capables de produire du méthane, ce qui les rend intéressants lorsqu'ils étudient les stratégies de réduction du méthane. Un certain nombre d'expériences ont été menées pour étudier la population de méthanogène dans le rumen des bovins et des moutons. Les espèces de méthanogène du rumen diffèrent selon le régime alimentaire et la localisation géographique de l'hôte[33].

Ils sont des membres du domaine des *Archaea* ; ils s'agit des bactéries anaérobies strictes, représentent environ 4% de microorganismes du rumen. Quelques espèces de méthanogènes ont été isolées du rumen ; difficile à isolée en culture pure qui nécessitent un potentiel d'oxydoréduction de l'ordre de -350mv et sont très sensible à l'acide parmi ces espèces il ya : *Methanobacterium ruminantium* qui est la principale bactérie qui produit le méthane à partir du formate et d'hydrogène. *Methanobacterium formicium* et *Methanobacterium sohngeii* qui utilisent l'acétate le propionate et le butyrate comme substrats [2].

### III.3. 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 [48].

Les ciliées appartiennent à deux groupes les *Holotriches* et les *Entodiniomorphes*, parmi les premiers on distingue les genres : *Isotricha* et *Dasytricha* (famille des *Isotrichidae*), mais pour les *Entodiniomorphes* ont distingués les genres : *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscox*, *Polyplastron* et *Eudiplodinium* qui sont les plus fréquents [65].

Les protozoaires ne sont pas indispensables à la digestion mais leur présence améliorent la digestibilité, uniformisent la fermentation entre les repas[2].

Jusqu'à 50% de la masse microbienne dans le rumen peut être constituée de protozoaires. Ils sont en fait prédateurs des bactéries dans le rumen ils mangent les bactéries pour le dîner. Les protozoaires sont environ 40 fois plus gros que les bactéries du rumen.

Les protozoaires du rumen produisent des produits finals de fermentation semblables à ceux produits par les bactéries, en particulier l'acétate, le butyrate et l'hydrogène.

Les bactéries du méthane du rumen se fixent et vivent à la surface des protozoaires du rumen pour un accès immédiat à l'hydrogène.

Ces protozoaires mangent de grandes quantités d'amidon à un moment et peut le stocker dans leur corps. Cela peut aider à ralentir la production d'acides qui réduisent le pH du rumen, profitant au rumen.

Les protozoaires du rumen se multiplient très lentement dans le rumen plus de 15-24 heures par opposition aux bactéries qui peuvent prendre aussi peu que 13 minutes pour se multiplier. Pour cette raison, les protozoaires du rumen se cachent dans le tapis de fibre plus lent du rumen, de sorte qu'ils ne sont pas lavés avant d'avoir une chance de se multiplier. Les régimes à faible teneur en matières grasses réduisent la rétention de fibres dans le rumen et peuvent diminuer le nombre de protozoaires dans le rumen [32].

Des divers paramètres ruminiques chez les animaux faunes, indique que l'environnement ruminal peut être fortement altéré par la présence de, ces changements de l'écosystème ruminal auront un effet sur les activités bactériennes. La présence de protozoaires dans le rumen a été montrée pour influencer le volume du rumen et le temps de rétention de la concentration et la proportion des acides gras volatils, les niveaux des autres métabolites acides et ammoniacs le pH de l'environnement et le nombre et le type des bactéries ruminales[26].

Une des premières études sur le rôle des protozoaires a été celle de (Becker *et al.* 1929), qui a échoué chez les animaux adultes et n'a pas trouvé de différence dans le taux de digestion de la cellulose. A cette époque, il y avait aussi un certain nombre d'enquêtes sur les ciliés du rumen et (Margolin 1930 et Westphal 1934) ont conclu que les protozoaires ne digèrent pas la cellulose, alors que (Trèves 1926 et Hungate 1924 1943) avaient des preuves que les ciliés produisaient de la cellulase [26].

D'abord décrit en 1843, les protozoaires du rumen avec leur aspect frappant ont été supposés importants pour le bien-être de leur hôte. Cependant, en dépit de contribuer jusqu'à 50% de la biomasse dans le rumen, le rôle des protozoaires dans l'écosystème microbien du rumen reste incertain. L'élimination des protozoaires ciliés augmente l'apport en protéines microbiennes jusqu'à 30% et réduit la production de méthane jusqu'à 11%. Des récentes découvertes suggèrent que les protozoaires holotriches jouent un rôle disproportionné dans le

soutien de la méthanogenèse tandis que les petits *Entodinium* sont responsables d'une grande partie du renouvellement des protéines bactériennes [37].

Dès leur première découverte par Gruby et Delafond (1843), les études sur les protozoaires du rumen se sont appuyées sur l'identification morphologique par microscopie optique. Il n'existe actuellement aucune collection de cultures de ciliés du rumen, donc les chercheurs doivent utiliser des photomicrographies pour l'identification [67].

Comme les autres ciliés, les protozoaires du rumen contiennent deux types de noyaux: un micronoyau et un macronoyau. Le micronoyau possède des chromosomes clairement visibles, est diploïde et ne synthétise qu'une trace d'ARN. Le macronoyau ne contient pas de chromosomes discernables, à plusieurs fois la quantité diploïde d'ADN, se divise amitotiquement et fournit pratiquement tout l'ARN nécessaire à la vie végétative de la cellule [68]. Dans les ciliés du rumen, alors que les petits protozoaires tels que *Entodinium*, ont tendance à être sous-représentés, les protozoaires plus grands tels que *Epidinium* ou *Polyplastron* ont tendance à être surreprésentés par une approche pyrosequencing comparé à l'énumération microscopique [69].

Bien que ces protozoaires constituent une grande partie de la biomasse du rumen, leur rôle dans la fermentation du rumen et leur contribution au métabolisme et à la nutrition de l'hôte constituent encore un domaine de controverse considérable [70]. Les protozoaires du rumen ne sont pas indispensables à la survie de l'animal et la défaisance (élimination des protozoaires du rumen à l'aide d'une grande variété de produits chimiques et de techniques physiques) et d'animaux sans protozoaires a été utilisée pour étudier le rôle des protozoaires ciliés dans la fonction du rumen ont été affectés par des interventions alimentaires [70].

La plupart des études ont été réalisées à l'aide de moutons (87%), tandis que le reste a utilisé du bétail (13%). La production de méthane a été mesurée dans des chambres (75% en chambres ouvertes ou calorimètres respiratoires) ou avec la méthode des traceurs SF6 (hexafluorure de soufre) [28].

### III.4. Les champignons

Les champignons habitent le rumen et dégradent activement les parois des cellules végétales. Les champignons du rumen produisent des niveaux élevés de cellulases et d'hémi cellulases et sont particulièrement performants dans la production de xylanases. Ces enzymes sont régulées par le substrat (en particulier les sucres solubles) disponible pour les

organismes. Les champignons dégradent les parois végétales non identifiées (c'est-à-dire sans réaction histochimique pour les phénoliques), ce qui indique que les enzymes sont capables d'hydrolyser ou de solubiliser toute la paroi de la plante. Ces organismes sont mieux en mesure de coloniser et de dégrader les tissus contenant de la lignine que les bactéries phénoliques soientsolubilisées mais ne sont pas métabolisés à partir de la paroi de la plante par des champignons. Les champignons anaérobies sont uniques parmi les microorganismes du rumen car ils pénètrent dans la cuticule. D'autres données suggèrent que les champignons sont inhibés par certains micro-organismes du rumen. L'interaction des champignons du rumen avec d'autres organismes en relation avec la dégradation des fibres dans le rumen nécessite une étude supplémentaire [29].

Depuis que les champignons du rumen ont été découverts dans le rumen d'un mouton il ya plus de deux décennies, ils ont été rapportés dans une large gamme d'herbivores nourris avec des régimes riches en fibres. La colonisation et la dégradation étendues des tissus végétaux fibreux par les champignons suggèrent qu'ils ont un rôle dans la digestion des fibres. Tous les champignons du rumen étudiés jusqu'à présent sont fibrolytiques. Ils produisent une gamme d'enzymes hydrolytiques, qui comprennent les cellulases, les hémicellulases, les pectinases et les estérases d'acide phénolique, pour leur permettre d'envahir et de dégrader les tissus végétaux lignocellulosiques. Bien que les champignons du rumen ne semblent pas être essentiels à la fonction générale du rumen, puisqu'ils peuvent être absents chez les animaux nourris avec des régimes faibles en fibres [30].

Des champignons chytridiomycètes anaérobies se retrouvent dans les tractus gastro-intestinaux des moutons, des bovins et des chèvres ainsi que dans de nombreux autres ruminants domestiques et non ruminants [31].

La consommation de pâturages matures ou de régimes composés en grande partie de foin ou de paille ainsi que la production d'enzymes hautement actives dégradant les fibres conduit à penser que les champignons anaérobies peuvent avoir un rôle important à jouer dans l'assimilation des aliments fibreux par les ruminants [31].

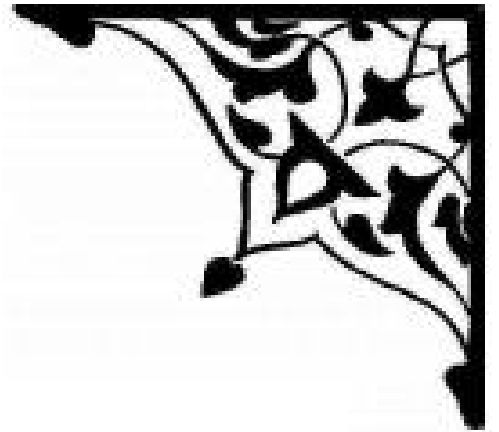
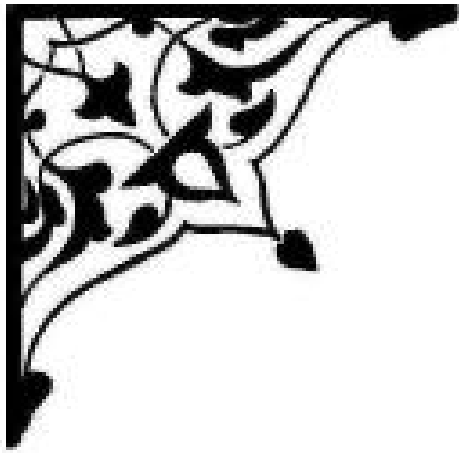
De leur biologie et de leur métabolisme inhabituels, la majeure partie des recherches ultérieures a mis en évidence le potentiel biotechnologique de leurs cellulases, xylanases et estérases phénoliques. Des populations de champignons dans le rumen et les facteurs alimentaires qui les influencent [31].

**Tableau II.** Les principales espèces des champignons isolées du tube digestif des ruminants[2].

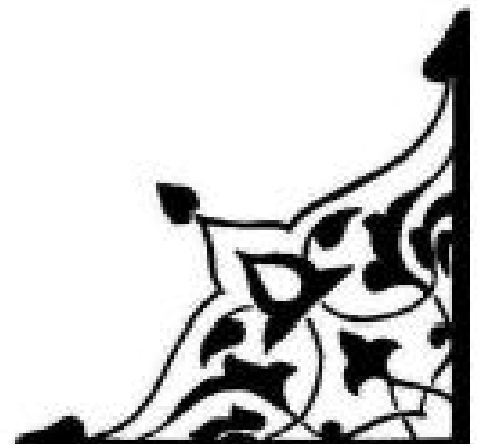
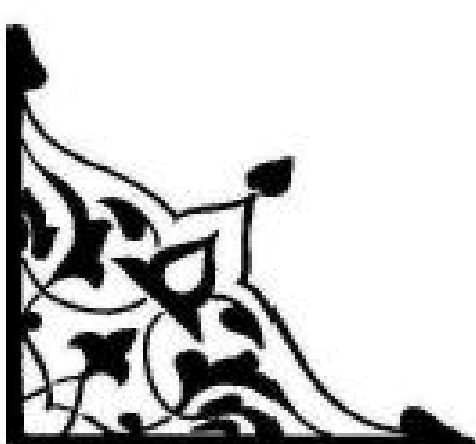
Type de thalle	Nombre des flagelles sur la zoospore	Genre Espèce	Origine	Référence
Monocentrique avec rhizoïdes filamenteux	>4	<i>Neocallimastix frontalis</i> <i>Neocallimastix patriciarum</i> <i>Neocallimastix harleyensis</i> <i>Piromyces communis</i> <i>Piromyces mae</i> <i>Piromyces dumbonica</i> <i>Piromyces rhizinflata</i>	Rumen Rumen Rumen Rumen Caecum de cheval Caecum d'elephant Feces d'ane	Orpin (1975) Orpin et Munn(1986) Web et Theodoron(1991) Orpin (1977) Li et al (1990) Li et al (1990) Breton et al (1991)
Monocentrique avec rhizoïde bulbeux	>4	<i>Caecomyces communis</i> <i>Caecomyces equi</i>	Rumen Caecum de cheval	Orpin (1976) Gold et al (1988)
Polycentrique	>4	<i>Orpinomyces joyonii</i> <i>Orpinomyces bovis</i>	Rumen Rumen	Breton et al (1989) Barr et al (1989)
	>4	<i>Anaeromyces micronatus</i> <i>Ruminomyces elegaris</i>	Rumen Rumen	Breton et al (1990) Ho et al (1990)

### III.5. Les virus

125 types morphologiques de bactériophages ont été observés dans le rumen. Leur rôle parmi la population microbienne n'est pas bien connu. Bien qu'ils lysent *Streptococcus bovis* et *Bifidobacterium thermophilus in vitro*[2].



*LA*  
**METHANOGENESE**



### IV. La méthanogenèse

#### IV.1. Le méthane

Le méthane est un puissant gaz à effet de serre malgré sa faible durée de vie dans l'atmosphère il a une influence forte sur le climat et son évolution. Les sources de méthane sont nombreuses et variées. Elles sont parfois naturelles parfois d'origine humaine avec de fortes nombreuses interactions entre les deux. La compréhension du fonctionnement de ces sources et l'analyse de l'effet du méthane sur le climat mobilise des compétences scientifiques et technologiques extrêmement nombreuses [71].

Son potentiel de réchauffement global est de 21, c'est-à-dire qu'il a un impact sur l'effet de serre environ 21 fois plus puissant que le dioxyde de carbone [38].

Le rôle du méthane dans le processus de réchauffement de la planète est évalué et sa contribution au méthane atmosphérique des gaz d'origine digestive issus principalement des ruminants. Le méthane ruminal représente environ 90 % de l'ensemble des fermentations digestives. L'acétate et le butyrate favorisent la production de méthane tandis que la formation de propionate constitue une voie alternative d'utilisation de l'hydrogène dans le rumen. Les différentes possibilités offertes actuellement pour diminuer les émissions de méthane sont analysées, à la fois en terme de réduction par animal et par unité de produit animal [40].

Chez les ruminants, le méthane produit au cours des fermentations digestives est rejeté par éructation dans l'atmosphère ce qui représente à la fois une perte sur la quantité d'énergie fixée par les animaux d'élevage et une contribution à l'effet de serre [42].

#### IV.2. Différentes origines de la méthanogènes

##### IV.2.1. Définition

La méthanogenèse est la production biologique du méthane, qui est à l'origine de trois voies principales: réduction du dioxyde de carbone, fermentation de l'acétate et dismutation du méthanol ou des méthylamines. Des recherches sur la biochimie des voies ont révélé de nouvelles enzymes avec des exigences de métaux et de cofacteurs qui ont introduit de nouveaux principes de biochimie[54].

La méthanogenèse biologique est le résultat des microorganismes strictement anaérobies qui sont ; les *Archaea* qui se distinguent des bactéries par :

Une génétique très différente.

La présence dans la paroi cellulaire glycéride étherique au lieu de glycéride sous forme d'esters.

La présence d'une chaîne d'enzymes et de cofacteur unique ; assurant la méthanogénèse comme dépôt final d'hydrogène gazeux libéré dans des consortia de réducteur de proton.

La chaîne assure la réduction du  $\text{CO}_2$  en stade successif et dépôt pour son activité de coenzyme lié à des oligoéléments comme : Ni, Fe, Mo et le Tengstène [2].

#### IV.2.2. Les origines de la méthanogénèse

Les substrats des différentes espèces sont l'acétate, le méthanol, l'hydrogène/ $\text{CO}_2$  ; 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  $\text{CO}_2$  et en  $\text{CH}_4$  avec transformation d'intermédiaires qui s'accumulent dans les fermentations du tube digestif (**Figure 9**). La stœchiométrie générale des fermentations dans les deux systèmes est illustrée dans la figure suivante :

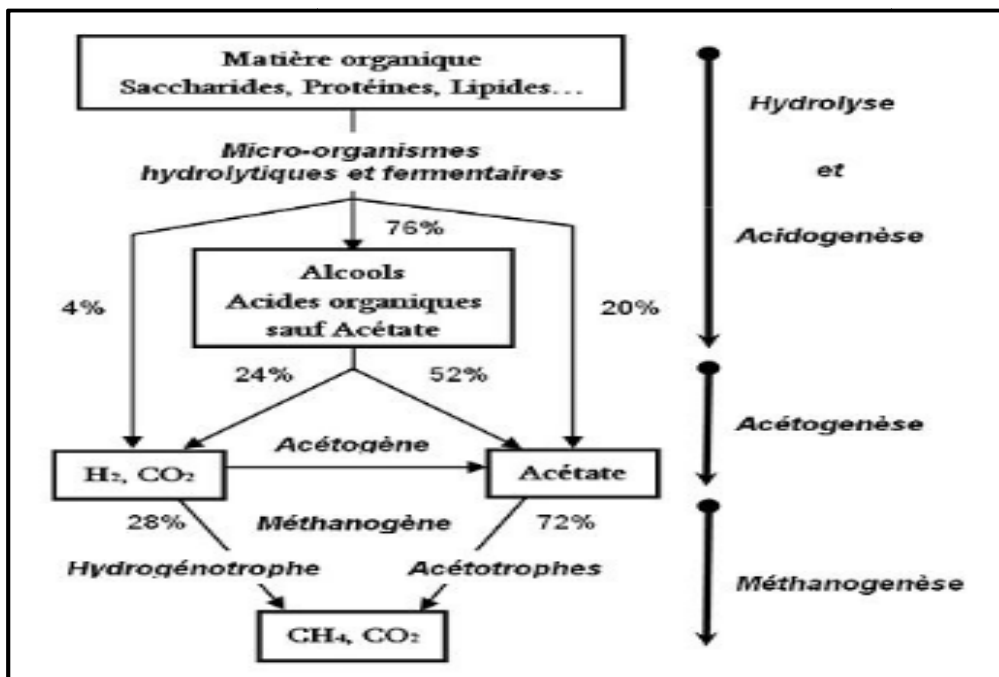


Figure 9. Schéma de la chaîne trophique de la méthanogénèse et ses différentes étapes[2].

### IV.3. Les microorganismes producteurs du méthane

Le CH<sub>4</sub> est formé dans le rumen quand l'hydrogène (H<sub>2</sub>), libéré par les microorganismes fermentaires (bactéries, champignons et protozoaires), est utilisé par d'autres microorganismes, les Archaea méthanogènes, dans la réduction du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). En tant qu'unique producteurs de CH<sub>4</sub> [56].

Ils font tous partie du domaine des *Archaea*, phylum *Euryarcheota* et sont organisés en 5 ordres : *Méthanobacteriales*, *Méthanococcales*, *Méthanomicrobiales*, *Méthanosarcinales* ; *Méthanopyrales*, regroupent 10 familles et 31 genres [44].

La méthanogenèse chez les ruminants a des conséquences environnementales importantes. Les méthanogènes tels que : *Methanomicrobium mobile*, *Methanobacterium formicicum*, *M. bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *M. smithi*, *Methanosarcina barkeri* et les méthanogènes ont été isolés du rumen par des méthodes culturelles. Cependant, les méthodes moléculaires révèlent une diversité génétique considérable de méthanogènes dans le rumen, même à l'intérieur des mêmes espèces de ruminants. Certains des méthanogènes sont non cultivables [45].

### IV.4. Le génome méthanogène

Les premières études menées sur les gènes individuels des microorganismes du rumen étaient basées sur la détection de gènes provenant des bibliothèques d'ADN génomique via des criblages fonctionnels ou plus récemment via amplification par PCR des gènes d'intérêt et de leurs homologues [55].

Le séquençage du génome entier facilite la compréhension de la physiologie des méthanogènes. Aujourd'hui les génomes de 18 espèces cultivées ont été séquencés et leur taille varie de 1.6 Mpd jusqu'à 5.8 Mpd. Les espèces du genre *Methanosarcina* possèdent les plus grands génomes à cause de leur métabolisme assez versatile (**Tableau III**). Le génome d'une espèce non cultivée du groupe RC 1 a été reconstruit et a révélé des gènes rares chez les méthanogènes, qui codent pour des enzymes impliqués dans la détoxification de l'oxygène, le métabolisme des hydrates de carbone et la sulfato réduction [44].

Tableau III. Substrats et habitats typiques des *Archaea méthanogènes*[44].

Ordre	Famille	Genre	Substrats	Habitats typiques
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> (formate)	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces, rumin
		<i>Methanobrevibacter</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	TGI des animaux, digesteurs, rizières
		<i>Methanopyruva</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , méthanol	TGI des animaux
		<i>Methanothermobacter</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> (formate, CO)	digesteurs anaérobiques
		<i>Methanothermus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Sources chaudes
		<i>Methanococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	Sédiments marins
		<i>Methanodermococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	Sédiments marins géothermales
		<i>Methanocaldococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Sédiments marins géothermales
		<i>Methanohalobium</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Sédiments marins géothermales
		<i>Methanocaldococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	digesteurs anaérobiques, rumin
<i>Methanomicrombiales</i>	<i>Methanomicrombiaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	digesteurs, sédiments eaux douces, eaux salées, rizières, champs pétroliers ; sources chaudes
		<i>Methanopyrus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	digesteurs anaérobiques
		<i>Methanocaldococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	digesteurs anaérobiques
		<i>Methanopyrus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	sédiments eaux douces, eaux salées, rizières, TGI
		<i>Methanocaldococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	Sédiments marins
		<i>Methanopyrus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	champs pétroliers
		<i>Methanopyrus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux salées
		<i>Methanopyrus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces
		<i>Methanocaldococcus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , formate	champs pétroliers
		<i>Methanopyrus</i>	(H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , CO), Acétate,	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces, eaux salées, rumin
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	Méthylamines	sédiments eaux salées
		<i>Methanosarcina</i>	Méthylamines	Sédiments hypersalins
		<i>Methanosarcina</i>	Méthylamines	Sédiments hypersalins
		<i>Methanosarcina</i>	Méthylamines	Sédiments hypersalins
		<i>Methanosarcina</i>	Méthylamines	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces
		<i>Methanosarcina</i>	Méthylamines	TGI des animaux
		<i>Methanosarcina</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , Méthylamines	Sédiments hypersalins
		<i>Methanosarcina</i>	Méthylamines	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces
		<i>Methanosarcina</i>	Acétate	Sédiments marins géothermales
		<i>Methanosarcina</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>	H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	
		<i>Methanopyrus</i>		

Les analyses phylogéniques ont mis en évidence 31 protéines exclusivement présentes chez pratiquement tous les méthanogènes, ainsi que les 10 protéines restreintes à quelques espèces de méthanogène [44].

Les enzymes impliquées dans la méthanogenèse sont codées par des gènes pour certains, exclusivement présents chez les *Archaea méthanogènes*. Seuls les méthanogènes possèdent la quasi-totalité des protéines impliquées dans la méthanogenèse et la synthèse des Coenzymes [44].

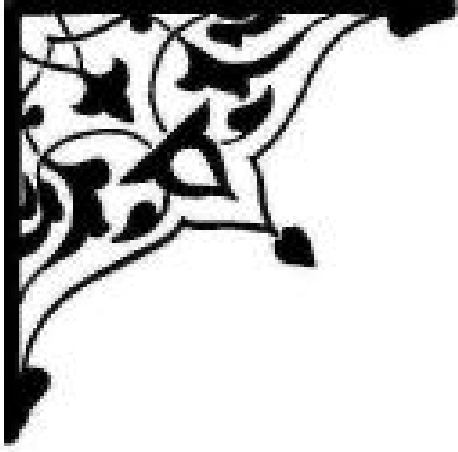
Chez les procaryotes en général, les protéines impliquées dans la synthèse des coenzymes sont plus largement distribuées que celles réalisant la méthanogenèse [72].

Le *rrs* est devenue le marqueur phylogénétique par excellence avec une vaste couverture de séquences comprenant tous les phylums connue à partir desquels on peut tirer des conclusions sur la classification des nouvelles séquences [73].

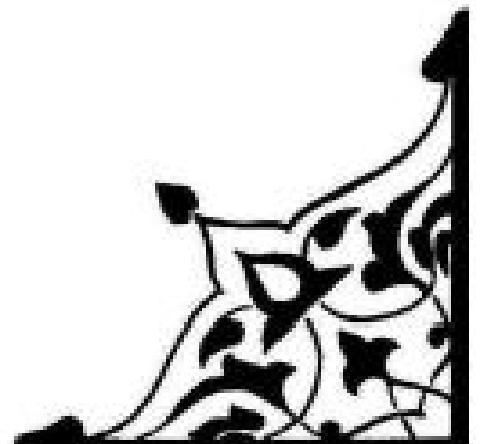
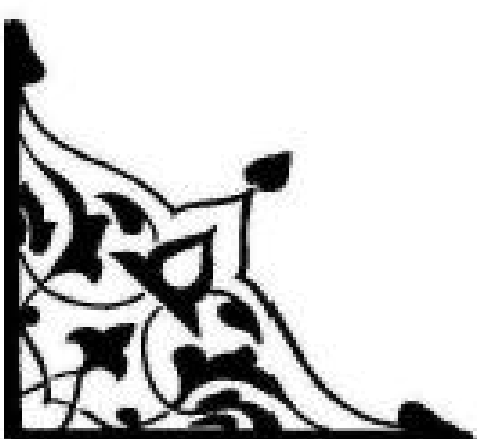
Un gène particulier, le *mcr A*, a reçu beaucoup d'attention ces dernières années étant identifié en tant que marqueur moléculaire de la communauté méthanogène au même niveau que le *rrs* [44].

Plusieurs groupes ont signalé la surveillance de populations de méthanogènes à partir d'échantillons environnementaux par le biais du ciblage du gène ribosomique 16S [74].

Bien que les chercheurs aient traditionnellement utilisé le gène 16S de l'ARNr pour la diversité phylogénétique, de nombreuses recherches se penchent maintenant sur la diversité des *Archaea méthanogéniques* en étudiant la divergence des séquences au sein du gène de la sous-unité A de la réductase méthyl-coenzyme M [74].



***STRATEGIES  
DE REDUCTION  
DE METHANE***



### V. Stratégies de réduction de méthane ruminal

#### V.1. L'utilisation des antibiotiques

Des stratégies de réduction du méthane qui ont été étudiées sont la défaisance et les vaccins. Ces méthodes d'atténuation visent directement ou indirectement la population méthanogène du rumen, ce qui se traduit par des degrés variables d'efficacité [33].

Les antibiotiques (monensine, lasalocide, salinomycine, avoparcine) ont une action inhibitrice significative sur les bactéries Gram positif qui produisent des quantités importantes d'hydrogènes[75]. La sélection microbienne qui en résulte favorise la formation du propionate et diminue celle du méthane [76]. L'effet inhibiteur des antibiotiques sur la méthanogenèse se maintient habituellement pendant plusieurs mois [77].

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 attribué 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 additifs alimentaires à partir du premier janvier 2006, ce qui condamne définitivement l'utilisation de ces produits en alimentation animale [57].

Toutes les expérimentations animales ont été approuvées par le comité d'éthique et d'expérimentation animale. L'antiméthanogène est un hydrocarbure aliphatique halogène, [78]. Le personnel des laboratoires australiens de santé animale (AAHL) a préparé le complexe anti méthanogène, contenant 10-12% de bromochlorométhane en poids pour toutes les périodes expérimentales. La formulation de bromochlorométhane, mélangée dans 100 g de farine de graines de coton (CSM), a également été administrée deux fois par jour, à 08:00 et 16:00 heures chaque jour, dans un alimentateur spécialisé. Les animaux de contrôle ont été alimentés en CSM, deux fois par jour, sans bromochlorométhane. Tous les bœufs consommaient constamment le CSM en 1 h. Un apport individuel a été assuré de sorte que 0,5 à 2,0 kg de l'aliment offert restent non consommés après 24 h. Cinquante jours après le début de la période expérimentale et 28 jours après l'addition du bromochlorométhane à l'alimentation 500 ml de digestum du rumen ont été recueillis avant le premier aliment quotidien et 4, 8, 12 et 24 h par la suite, rassemblés à partir de cinq sites différents dans le rumen [43].

### V.2. Manipulations biotechnologiques de l'écosystème microbien ruminal

#### V.2.1. L'élimination des protozoaires du rumen (la défaunation)

L'élimination des protozoaires du rumen permet à la fois de diminuer la production d'hydrogène et de supprimer la fraction d'archae méthanogènes fixée à la surface et dans les cellules des protozoaires ciliés, ce qui explique la baisse de la méthanogenèse de 30 à 40 % généralement observée après la défaunation du rumen [79]. 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 Ranilla *et al.*, 2004). En outre, la défaunation améliore la digestion de l'azote mais diminue celle des parois végétales [57].

Sur un plan pratique, la défaunation peut être obtenue à l'aide d'agents chimiques doués de pouvoir tensio-actif puissant, d'extraits de plantes riches en saponines, ou de certains acides gras. 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 [57].

Les voies d'approche les plus prometteuses pour réduire la production ruminal de CH<sub>4</sub> consisteraient à rechercher de nouveaux produits doués d'activité antiméthanogéniques ou à favoriser la formation d'accepteurs d'électrons autres que CO<sub>2</sub> ou le formate, ou à agir dans le sens d'une réduction de la population de protozoaires. Cette réflexion globale sur la contribution des ruminants à l'effet de serre doit tenir compte du fait que ces animaux jouent un rôle essentiel dans l'équilibre de notre écosystème en transformant l'importante biomasse végétale mondiale en protéines animales (viande et lait principalement) qui constituent la base de l'alimentation humaine. Cet aspect doit contrebalancer les aspects négatifs liés à la production de méthane et à ses conséquences [40].

#### V.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* ou *Saccharomyces cerevisiae* ; d'autres que n'ont pas observé d'effet ou ont noté une augmentation de la production de méthane [80].

Il faut cependant préciser que peu d'études ont été entreprises jusque-là sur les probiotiques avec l'objectif ciblé de réduire la méthanogenèse. Leur faible coût, permet d'envisager leur utilisation dans le cas où leur efficacité est démontrée. L'ajout des bactéries acétogènes dans le rumen (*Peptostreptococcus productus* ATCC 35244) stimule la voie d'acétogenèse réductrice à la condition stricte que les bactéries méthanogènes aient été préalablement inhibées par l'ajout de BES ou de probiotique (bactérie *Lactobacillus plantarum*) [81]. 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'un part, et leur caractère hétérotrophe qui les incite à utiliser d'autres sources de carbone que le CO<sub>2</sub> 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 [57].

Bien que le rumen soit un milieu fortement anaérobie, des bactéries capables d'oxyder le méthane ont pu en être isolées [82]. La part de CH<sub>4</sub> naturellement oxydé dans le rumen ne représente que 0.2 à 0.5 % du méthane produit et la possibilité de l'augmenter reste faible [83]. Une bactérie oxydante de méthane, préalablement isolée du tube digestif de porcelet, a pu réduire la production de méthane dans un rumen artificiel, mais ce résultat n'a pas pu être validé in vitro. En outre, cette approche ne présente pas d'intérêt au niveau des pertes de Carbone et d'énergie pour l'animal puisque le CH<sub>4</sub> est transformé en CO<sub>2</sub>[57].

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 [84]. Le vaccin ne serait toutefois efficace que sur une fraction des archae méthanogènes et l'effet à long terme n'est pas connu [57].

### V.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 méthanogenèse lorsqu'ils sont ajoutés à la ration des ruminants [85]. Si l'on admet une efficacité de fixation de l'hydrogène de 60% par les diacides organiques, il serait nécessaire de compléter 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 [86], ce qui est inapplicable en raison des conséquences sur le Ph ruminal et du cout de traitement. Différentes solutions sont en cours d'études pour pallier ce problème. Récemment (Wallace *et al.*, (2006)) 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 CH<sub>4</sub> et une augmentation de l'efficacité alimentaire de 20%. Sur le plan réglementaire, bien que ces acides soient largement employés en alimentation humaine et chez les animaux monogastriques, leur utilisation comme additif en alimentation des ruminants devra faire l'objet d'une autorisation délivrée par l'autorité européenne [57].

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 vitro* est mal connue, limitée et/ ou transitoire et le risque de toxicité qu'ils présentent est potentiel ou prouvé [57].

Les recherches conduites au cours des deux dernières décennies ont permis de montrer que certains additifs alimentaires peuvent être utilisés pour réduire la méthanogenèse ruminal [87] (Tableau IV). Parmi ces produits, les acides gras ou certains lipides semblent les plus prometteurs à la fois par leur efficacité et par leur caractère naturel. Ils peuvent remplacer partiellement les céréales pour accroître le niveau énergétique de la ration et présentent l'avantage de ne pas modifier le pH ruminal s'ils sont distribués à un faible niveau ou sous forme de sels d'acides [88]. En outre, l'ajout d'acides gras polyinsaturés permet d'améliorer la valeur santé des produits animaux destinés à la consommation de l'homme [89].

L'inhibition de la méthanogenèse dépend de la nature et de la quantité de lipides ajoutés, les acides gras étant plus efficaces que les triglycérides et les acides gras longs polyinsaturés, en particulier l'acide linoléique (ALA), étant plus actifs que les acides gras saturés ou monoinsaturés [42].

**Tableau IV.** Traitements possibles pour diminuer la méthanogénèse ruminal [42].

Traitement	Microbes ciblés (mode d'action)	Efficacité (facteurs limitants)
<b>Additifs d'origine chimique</b>		
Antibiotiques ionophores (interdits en Europe depuis le 01/06)	Bactéries Gram+ et archaea	Transitoire
Analogues halogénés de CH <sub>4</sub>	Archaea	Transitoire ; toxicité
Extraits de plantes, huiles essentielles	Bactéries, protozoaires, archaea	A démontrer in vivo
Acides aminés soufrés ou thiopeptide	Accepteurs d'électron	A démontrer in vivo ; coût
Sulfates, nitrates, fumarate, malate	Accepteurs d'électron	Aléatoire ; coût
Acides gras	Archaea et accepteurs d'électron	Efficacité démontrée
<b>Probiotiques</b>		
Levures ou bactéries vivantes	Acétogènes	A démontrer in vivo
Bactéries oxydatives	Oxydation de CH <sub>4</sub> en CO <sub>2</sub>	A démontrer in vivo
<b>Procédés biotechnologiques</b>		
Défaunation du rumen	Protozoaires	Transitoire
Bactériocines	Bactéries Gram +, archaea	A démontrer in vivo
Sélection d'animaux CH <sub>4</sub> -	?	Permanence de l'effet à démontrer

D'un point de vue pratique, la graine de lin, riche en ALA, déjà utilisée dans l'alimentation des ruminants présente une efficacité antiméthanogéniques démontrée *in vivo*. (Machmüller *et al.*, (2000) ont montré qu'un ajout de 2,5 % d'huile de lin à la ration d'agneaux en croissance a diminué leur production de méthane de 10%. La quantité d'hydrogène utilisée pour réduire les acides gras insaturés n'intervient que de manière très limitée dans la diminution de la synthèse de méthane [90].

Les acides gras saturés à chaîne moyenne comme l'acide laurique et l'acide myristique présents dans l'huile de coprah ou de palmiste ont des effets négatifs importants sur la population des *Archaea* et des protozoaires et donc sur la production de méthane *in vitro*.

Les lipides ont un effet persistant sur la méthanogénèse mais ils peuvent également avoir une action négative sur la digestion de la matière organique et plus particulièrement de la fraction cellulosique de la ration dans le rumen lorsque ceux-ci sont incorporés à des niveaux importants, ce qui peut constituer un facteur limitant à leur utilisation [90].

Dans les années 2000, des recherches ont permis de mener des expériences visant à diminuer la production de gaz à effet de serre en réduisant la méthanogènes bovine [21].

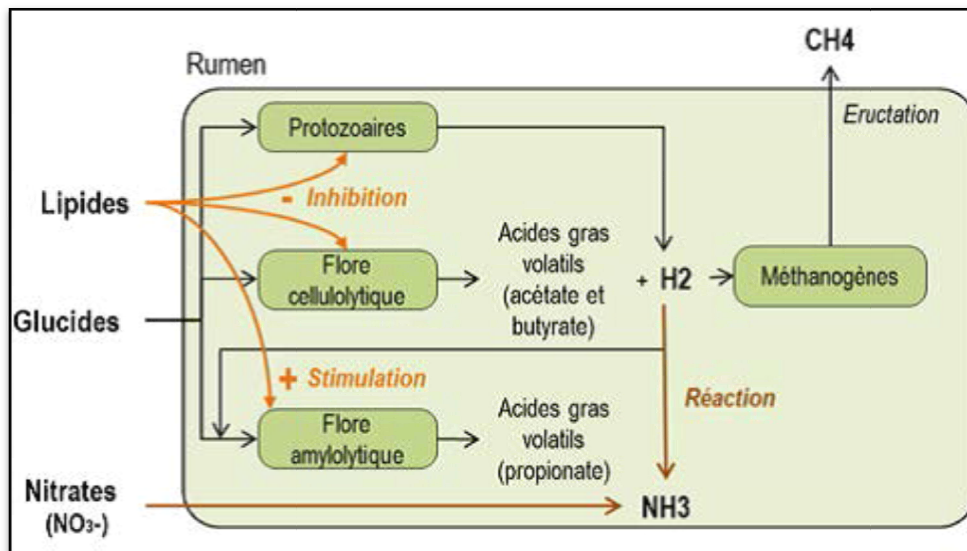
### V.4. L'utilisation des extraits de plantes

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 bactéricide et avoir des effets voisins de ceux obtenues avec les antibiotiques [91]. 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 [92]. De rhubarbe et de bourdaine, le sérum de luzerne obtenu après pressage de luzerne fraîche et élimination des protéines par floculation ont provoqué une diminution de la méthanogenèse [93].

### V.5. La réduction du méthane par l'utilisation des produits nitreux

#### V.5.1. Les nitrate

L'utilisation des nitrates pour la réduction des émissions du  $\text{CH}_4$  s'avère être un moyen assez efficace en conditions in vitro. En effet, on rapporte des diminutions de l'émission allant de 16 à 32 % [94]. En condition normales, les archées méthanogènes du rumen effectuent une réduction du  $\text{CO}_2$  avec les ions hydrogènes pour former le  $\text{CH}_4$ . Or le nitrate, qui est aussi une molécule contribuant au recyclage des ions hydrogènes, sera réduit pour produire de l'ammoniac [95]. Toutefois des précautions doivent être mise en place puisqu'à certain niveau de supplémentation en nitrate, des cas de toxicité sont possibles [96]. Lorsque Jones (1972) a observé une diminution de la production de méthane en réponse au nitrate, l'effet a été interprété comme une conséquence possible de l'augmentation du potentiel redox du milieu; Cependant, la plupart des études ultérieures ont considéré que le nitrate était un autre puits d'hydrogène à la production de méthane [59] (figure 10).



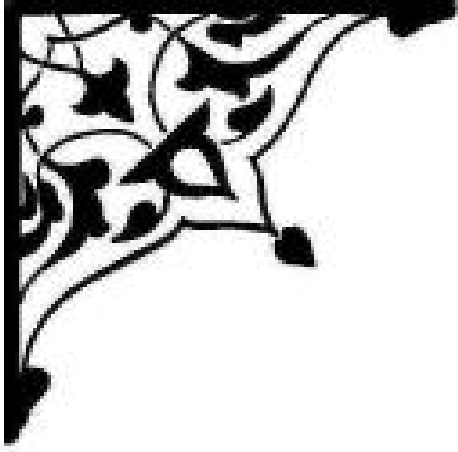
**Figure 10.** Fonctionnement du rumen et modifications induites par l'ajout de nitrate dans la ration [59].

### V.5.2. Le 3-nitroxypropanol

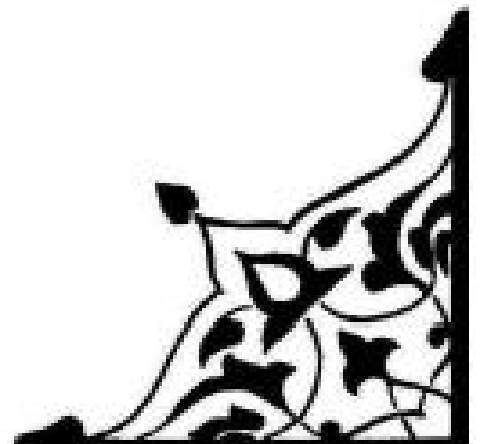
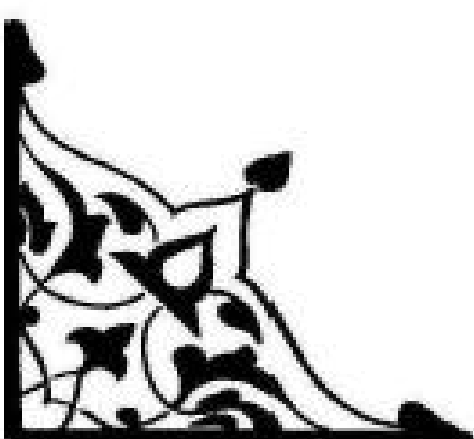
Récemment, on rapporte qu'une supplémentation en Le 3-nitroxypropanol réduirait les émissions de CH<sub>4</sub>. Cette molécule, développée par la firme néerlandaise DSM Nutritional productus), exercerait une activité inhibitrice sur les *archées méthanogènes* du rumen en inhibant la méthyl coenzyme M [97]. En effet, au cours d'une expérience, ces auteurs ont noté des réductions de la production de CH<sub>4</sub>, de l'ordre d'une autre étude, lorsque des doses de 40, 60 et 80 mg/kg de 3-nitrooxypropanol étaient intégrées dans la ration, les auteurs ont noté des diminutions des émissions de CH<sub>4</sub> de 25, 31 et 32 % respectivement. Toujours selon la même étude, on ne notait aucun effet significatif sur la prise alimentaire et la production laitière [58].

### V.5.3. Les nitrites

Le nitrite peut effectivement réduire la production de méthane par le microbiote ruminal complexe. L'addition du nitrite augmente la production d'ammoniac dans le rumen ; il 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 CH<sub>4</sub> des ovins [94].



***MATERIEL  
ET METHODES***



## I. L'échantillonnage

Dans notre étude *in vitro*, le jus de rumen des ovins est utilisé comme inoculum dont laquelle nos échantillons sont prélevés de l'abattoir de Khenchela à partir des ovins sacrifiés à des fins commerciales. Ces ovins appartiennent à la race d'Ouled Djalel (Echriaa, El bidha) et ont reçu un régime alimentaire de foins, choisis aléatoirement d'âge et de sexe différents

Le jus de rumen est collecté des ovins abattus le matin à l'abattoir, ensuite filtrer à travers 4 couches de bande à gaz pour éliminer les débris végétaux, et afin de récupérer une bonne fraction microbienne dans le liquide ruminal (**figure 12**), puis passer directement dans des Thermos préchauffer à 39°C selon la méthode de Nicolie [99] (**figure 11**), ensuite le Thermos est hermétiquement fermés et transférer immédiatement aux laboratoire ou le jus sera utilisé le plus tôt possible dans les 2 premières heures.



**Figure 11.** Photographie du Thermos préchauffé à 39°C.



Figure 12. Photographie de prélèvement de jus de rumen.

## II. Etude physicochimique

### II.1. La température

La température du liquide ruminal est mesurée directement après prélèvement du jus de rumen (Figure 13) à l'aide d'un thermomètre de la marque (COCCO).



Figure 13. Photographie de la mesure de la température.

## II.2. Le pH

Le pH a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations [42]. C'est un paramètre habituellement mesuré dans les études nutritionnelles, car il a été toujours considéré comme central pour comprendre les processus de la digestion dans le rumen [43].

Le pH du liquide ruminal est relevé directement après le prélèvement du jus de rumen à l'aide d'un pH mètre (HANNA instrument) portable à électrodes en verre étalonnée avant l'utilisation (**Figure 14**).



**Figure 14.** Photographie du pH mètre.

## II.3. La matière sèche

La matière sèche est déterminée par dessiccation dans une étuve maintenue à 105°C pendant 8-12h jusqu'à ce que le poids devienne constant. La différence de poids correspond à la perte de l'humidité et le résidu caractérise la teneur en matière sèche dans l'échantillon.

Une quantité ( $P_1$ ) de 5 à 10g du liquide ruminal homogénéisé est placée dans des creusets en porcelaines préalablement séchés et tarés (**Figure 15**). Le tout est placé dans une étuve maintenue à 105°C pendant 24h jusqu'à poids constant ( $P_2$ ). Après 24 heures les creusets sont mis dans un dessiccateur pendant au moins une demi-heure pour refroidir dans une atmosphère sèche [43].

Le pourcentage de la matière sèche (MS) est calculé selon l'expression suivante [43] :

**% MS = (MS/MF) x100 exprimé en g/100g MF.**

**MS** : la matière sèche est calculée comme suit  $MS = P_2 - T$

**MF** : la matière fraîche, est calculés comme suit  $MF = P_1 - T$

Où :

**P<sub>1</sub>** : représente le poids (g) du creuset avant séchage (tare + quantité du liquide ruminal fraîche).

**P<sub>2</sub>** : représente le poids (g) du creuset après séchage (tare + résidus).

**T** : représente le poids (g) du creuset vide (tare)



**Figure 15.** Photographie du creuset avec le jus de rumen.

### III. Le suivi de l'effet des additifs nitreux sur la flore ruminal

#### III.1. Préparation du milieu de culture (la salive artificielle)

La flore microbienne récupérée pour la recherche est un ensemble des bactéries anaérobies, pour cela, une salive artificielle sera utilisée comme milieu de culture.

La composition de la salive artificielle ou naturelle varie avec la vitesse de sécrétion et le type de stimulus qui l'initie. Mais elle est composée principalement de sodium de potassium, calcium salivaire, chlorure salivaire, et de bicarbonate [100]. C'est une solution minérale qui joue le rôle d'un tampon d'une part et d'une autre elle constitue un apport de sels minéraux et d'oligoéléments aux microorganismes du rumen. Elle est composée d'un mélange de différentes solutions décrites par [101].

La salive est composée de cinq solutions : solution de micro-minéraux, solution tampon, solution des macro-minéraux, solution indicatrice de potentiel redox et solution réductrice (Tableau V) [44].

**Tableau V.** Les différents constituants de la salive artificielle [58].

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

Le mélange qui a une couleur bleue (**Figure 16a**) sera chauffé et barboté avec un flux continu de CO<sub>2</sub> jusqu'à le virage vers la couleur rose, la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur rose au blanc transparent (**Figure 16b**).

Le barboteur, est un vase qui contient un liquide à travers lequel on fait passer tous gaz présent dans une solution par le processus du barbotage, ce dernier est réaliser sur le liquide ruminal afin d'assure l'anaérobiose donc l'absence totale du l'oxygène dans la solution obtenue.



**Figure 16.** Photographie de la salive artificielle.

(a) *La salive avant réduction*

(b) *Le virage de la couleur vers la couleur rose après barbotage avec un flux continu de CO<sub>2</sub>*

### III.2. L'inoculation

Les expériences ont été effectuées dans des flacons en verre stérile avec des bouchons en caoutchouc de 200 ml contiennent de la salive artificielle et le jus de rumen 2V :1V et de 0.2g de substrat (l'amidon de blé), avec ou sans additifs nitreux. Les flacons des témoins ne contiennent aucun additifs nitreux (le mélange salive/ jus de rumen et le substrat seulement). La croissance bactérienne est suivis en présence de deux additifs nitreux ; le KNO<sub>3</sub> et le NaNO<sub>2</sub>, Les concentrations utilisées pour chaque additif sont : 5 mg/l, 10mg/l et 15mg/l; avec trois répétitions pour chaque concentration, les flacons sont bien fermés avec des joints d'aluminium et incubés en anaérobiose à 39°C.

### III.3. Incubation

Les flacons sont hermétiquement fermés et incubés à 39°C en anaérobiose dans une étuve à CO<sub>2</sub> (figure 17).

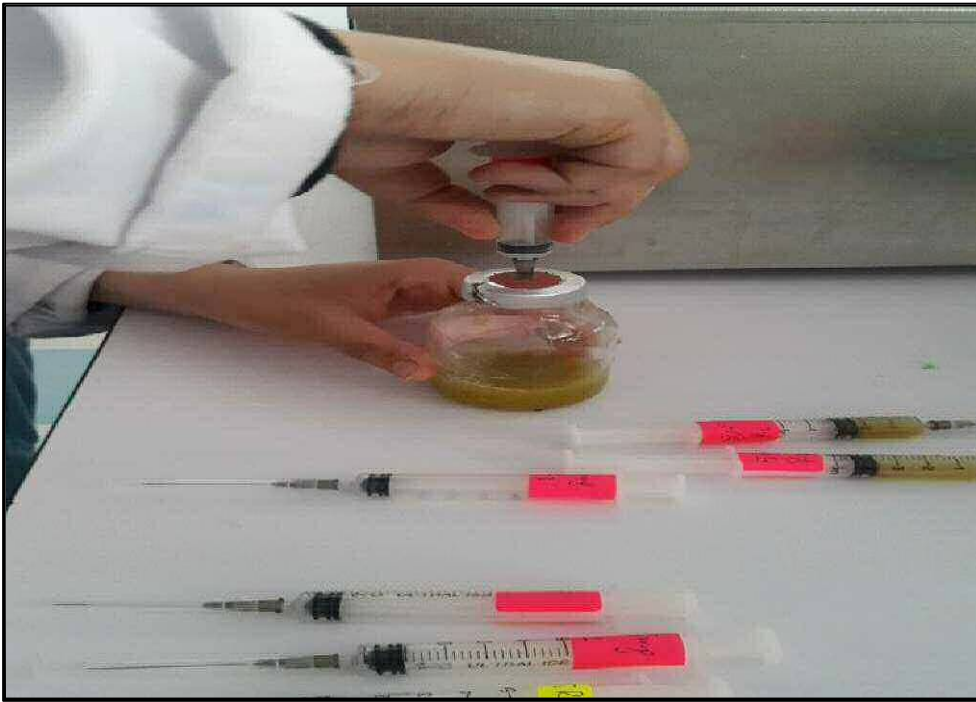


**Figure 17.** Photographie des flacons remplis placée dans l'étuve à CO<sub>2</sub>

### III.4. Mesure de la croissance bactérienne (Densité optique)

Le développement bactérien est montré par l'augmentation de la turbidité du milieu et la production de gaz [45], cette turbidité est proportionnelle à la densité optique de la solution.

Un prélèvement de 1,5 ml est effectué à partir de chaque flacon chaque 2h avec une seringue sans ouvrir les flacons (**figure 18**), afin de doser la biomasse avec un spectrophotomètre UV/visible à 600 nm et pour mesurer le pH.



**Figure 18.** Photographie du prélèvement avec des seringues chaque 2 heures.

### III.5. Mesure du pH

La variation du pH est suivie au cours de l'expérience (par pH mètre), avec chaque dosage de la biomasse.

### IV. Le comptage des protozoaires

Le dénombrement des protozoaires est effectué chaque 2h pendant le temps de l'incubation, par le mélange de 100  $\mu$ l du contenu de chaque flacon 100  $\mu$ l de la solution MFS (Metylgreen-Formalin-Saline) (**tableau VI**). Ce mélange bien homogénéisé est conservé à l'obscurité pendant 30 minutes [107]. Le dénombrement des protozoaires est réalisé sur une cellule de Malassez.

La chambre de comptage couverte par une lamelle, bien fixée, est remplie par capillarité à l'aide d'une pipette pasteur. Le comptage est ensuite réalisé sous microscope en utilisant l'objectif x40, de façon que juste les cellules contenues dans les 25 rectangles subdivisés en 20 petits carrés sont comptés (**figure 18**).

Le nombre de protozoaires est exprimé selon la formule suivante :  $N = n_1 * v * n_2 * f$

N : nombre de cellules par ml

$n_1$  : nombre de cellules comptées

v : volume d'un rectangle en ml

$n_2$ : nombre de rectangles comptés

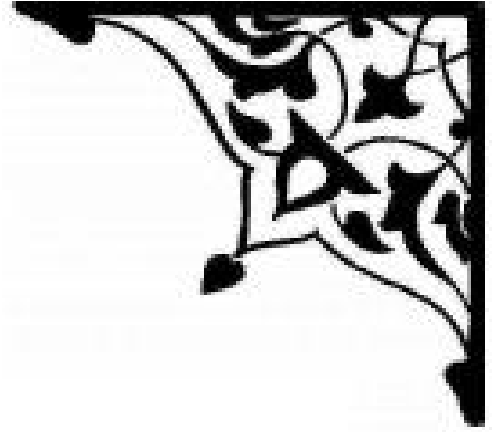
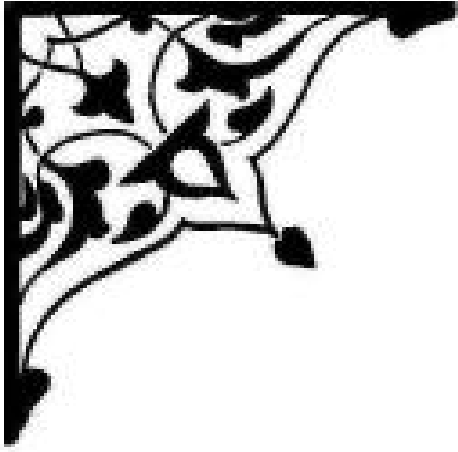
F : facteur de dilution.



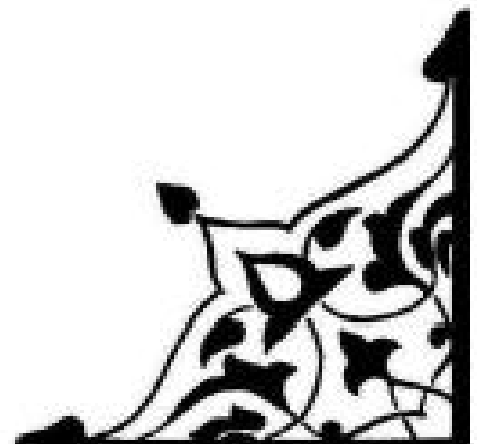
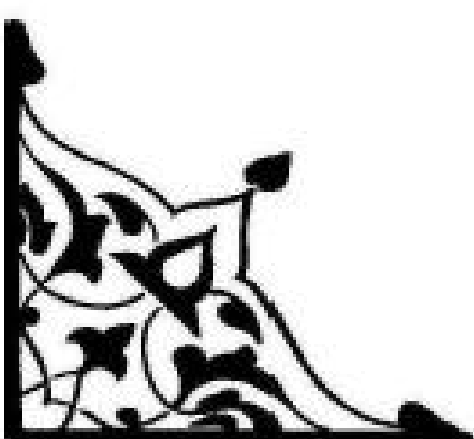
**Figure 19.** Photographie du dénombrement des protozoaires par la cellule de Mallasez.

**Tableau VI.** Préparation de la solution MFS (methylgreen-formalin-saline)

<b>Composants</b>	<b>Quantités</b>
Formaldéhyde 35%	100ml
Vert de méthyle	0,6g
Chlorure de sodium	8g
Eau distillée	900ml



***RESULTATS  
ET DISCUSSION***



### I. Résultats de l'étude physicochimique

#### I.1. Mesure de la température

La mesure de la température de jus de rumen fraîchement collecté a donné une valeur de 40°C. **Brugère en 1983** a montré que la température ruminal est sensiblement supérieure à la température corporelle, elle est comprise entre 39°C et 41°C ; comme elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chute de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide [114].

#### I.2. Mesure du pH

Les valeurs obtenues du pH varient entre (6, et 7.50) ; ceci pourrait être justifié par la nature du régime alimentaire de l'animal.

**Brugère en 1983**, a montré que la valeur de pH du rumen est comprise dans une large gamme, entre 5.5 et 7.3. En effet, un pH du rumen considéré normal ne correspond pas forcément à la neutralité (7.0), au sens physicochimiques du terme puisqu'au cours de la digestion, il apparaît des acides gras volatils (AGV) rendant le milieu acide. Le pH du rumen peut varier sans qu'il y ait de troubles, et la cause de variation la plus importante est constituée par les apports de substrats alimentaires induisant notamment d'importantes variations nycthémérales [114].

De ce fait, le pH joue un rôle prépondérant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. Les éléments responsables des fluctuations de pH du rumen sont, pour les acides : les AGV et l'acide lactique produits lors des fermentations, et pour les bases, les bicarbonates et les phosphates, ainsi que, le cas échéant, l'ammoniac venant de la protéolyse. Le pouvoir tampon est assuré essentiellement par les bicarbonates apportés par la salive (un bovin adulte sécrète chaque jour environ 100 litres de salive), dont la sécrétion dépend en grande partie de l'alimentation [113].

#### I.3. La matière sèche

Le résultat de la matière sèche (MS) obtenue est de 0.40%. Cette valeur révèle un contenu ruminal peu liquide.

Le jus de rumen d'ovin choisit a présenté un taux d'humidité faible (34.9%); **Brugère, en 1983** a montré que la valeur de l'humidité est variable en fonction des apports hydriques réalisés

par les aliments, l'eau de boisson et la salive, qui vont constituer principalement la phase liquide du contenu ruminal. L'eau du rumen représente une masse importante en quantité et elle peut être utilisée, le cas échéant, comme réserve pour l'organisme [114].

## II. Le suivi de l'effet des additifs nitreux sur la flore ruminal (*in vitro*)

### II.1. L'effet des nitrates sur la flore ruminal

Afin de déterminer l'effet de l'accepteur final d'électrons sur la croissance bactérienne, les bactéries ont été inoculées et cultivées dans un milieu de culture contenant différentes concentrations initiales de nitrates en anaérobiose, les résultats obtenus sont présentés dans la figure 20.

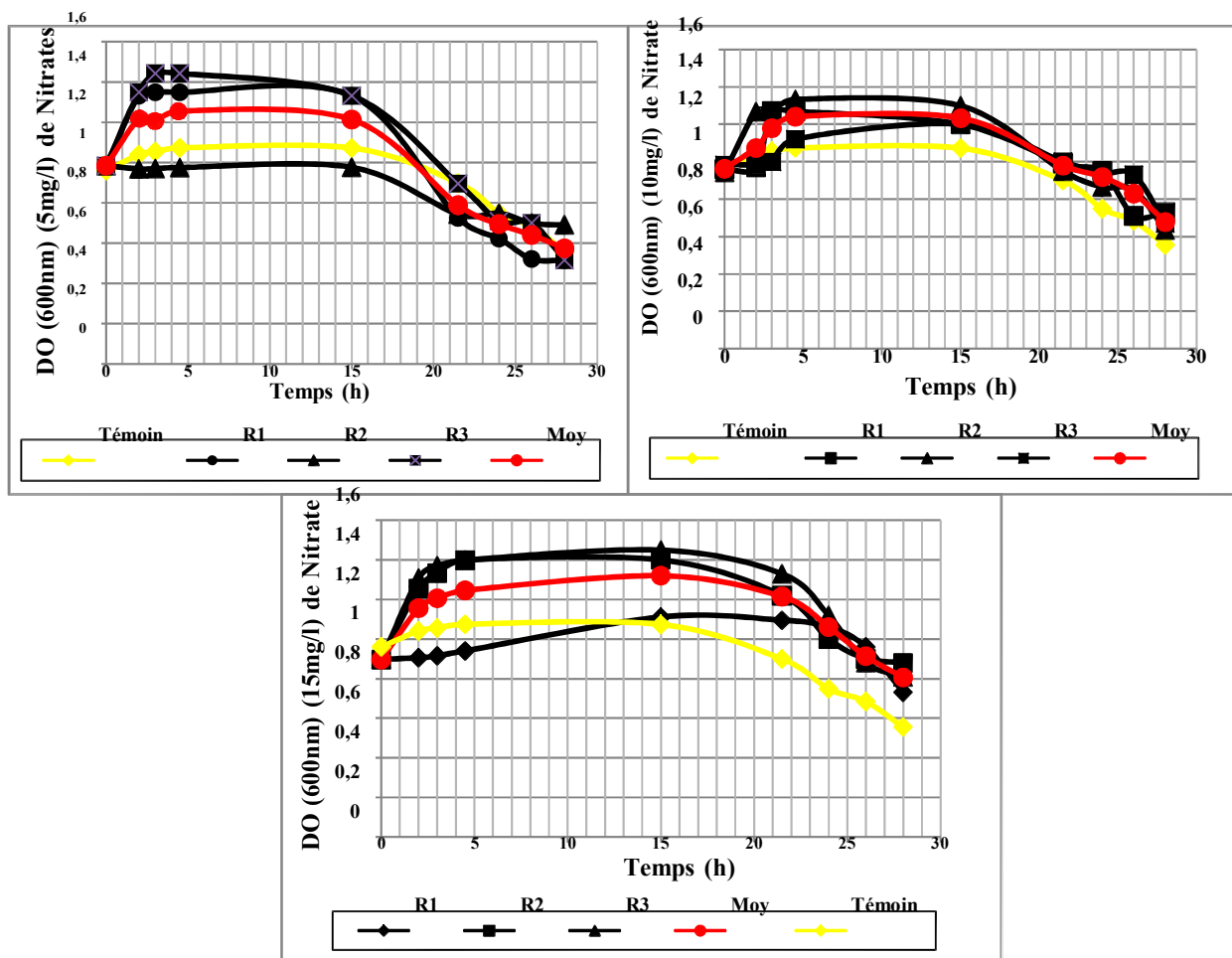


Figure 20. Cinétique de la croissance bactérienne à 600 nm en fonction du temps et en présence de nitrate comme additif (avec différentes concentrations).

Les résultats montrés dans la figure 20 montrent que dans les 5 premières heures, le nombre des bactéries pour les trois concentrations testées augmente est plus élevé que celle du témoin: c'est- à-dire que les bactéries consomment bien le nitrate avec une production de gaz (**Figure 21**).

Cela revient à l'utilisation de nitrate comme source d'azote par les bactéries [103], en plus que le nitrate de potassium stimule bien les bactéries pectinolytiques et amylolytiques et un peu moins les xylanolytique [102]. Ainsi que les nitrates sont utilisés comme accepteurs finaux d'électrons qui sont transférés le long de la chaîne respiratoire [111].

Après 5 heures, on remarque que le nombre des bactéries pour les trois concentrations est encore plus élevé avec une valeur constante par rapport au témoin : cette infime production peut être due au peu d'énergie résiduelle restante qui a permis son utilisation [103].

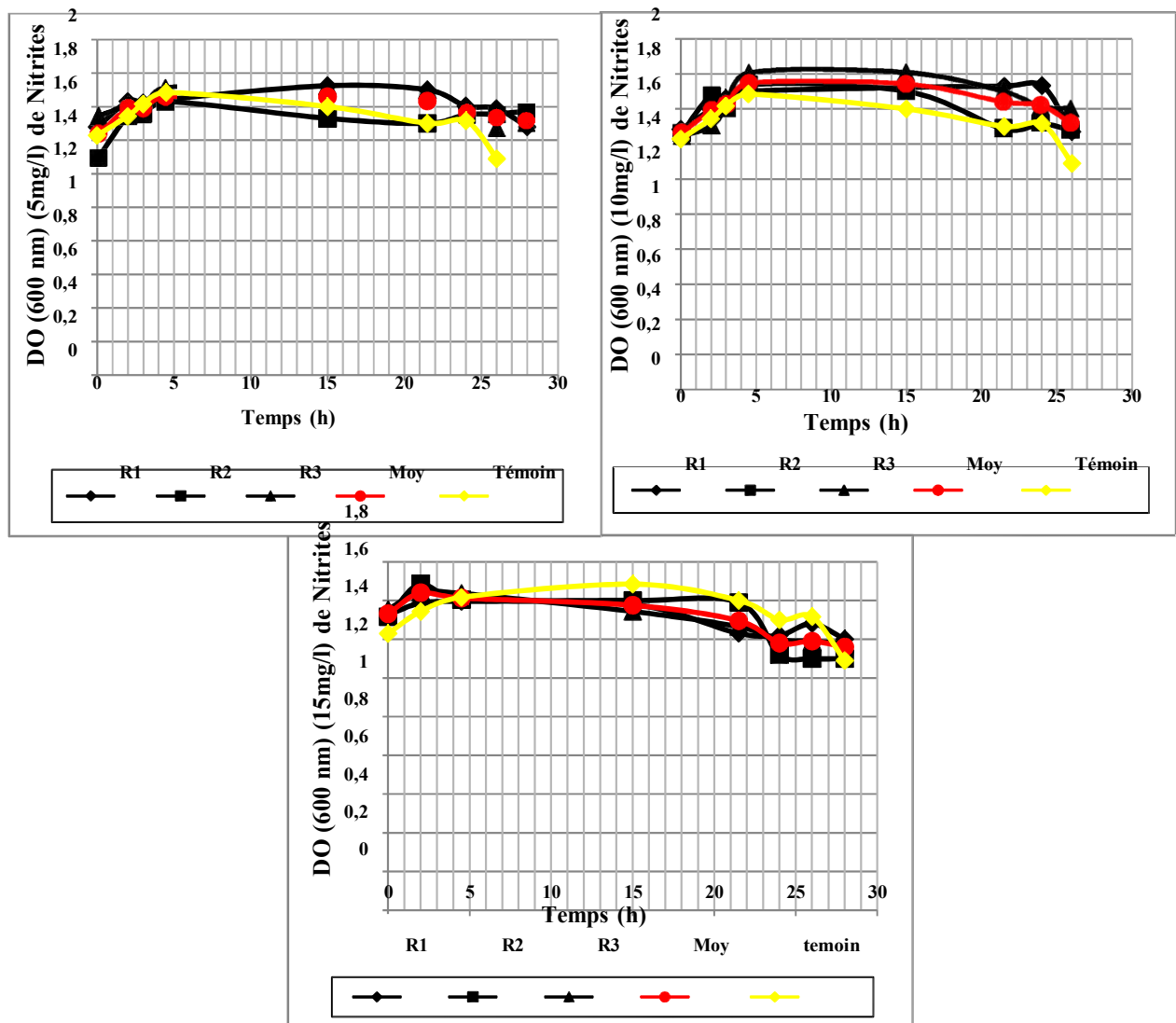
Après 20 heures, le nombre des bactéries a diminué avec le temps comme celui du témoin : ce qui explique la mort des bactéries au fur et à mesure de déficit du produit.



**Figure 21.** Photographie montre la production de gaz après 5 heures d'incubation.

### II.2. L'effet des nitrites sur la flore ruminal

Afin de déterminer l'effet de nitrite sur la croissance bactérienne, les bactéries ont été inoculées et cultivées dans un milieu de culture contenant différentes concentrations initiales de nitrites en anaérobiose, les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 22**.



**Figure 22.** Cinétique de la croissance bactérienne à 600 nm en fonction du temps et en présence de Nitrite comme additif (avec différentes concentrations)

## Résultats et discussion

Les résultats dans la **figure 22**, montrent que l'utilisation de petites concentrations de nitrites (**5mg/l et 10 mg/l**) donne une croissance bactérienne remarquable ; comme celle obtenue par le témoin (absence de nitrite), ceci peut être expliqué par l'utilisation de cet additif par les bactéries soit comme source d'azote, soit pour la chaîne respiratoire.

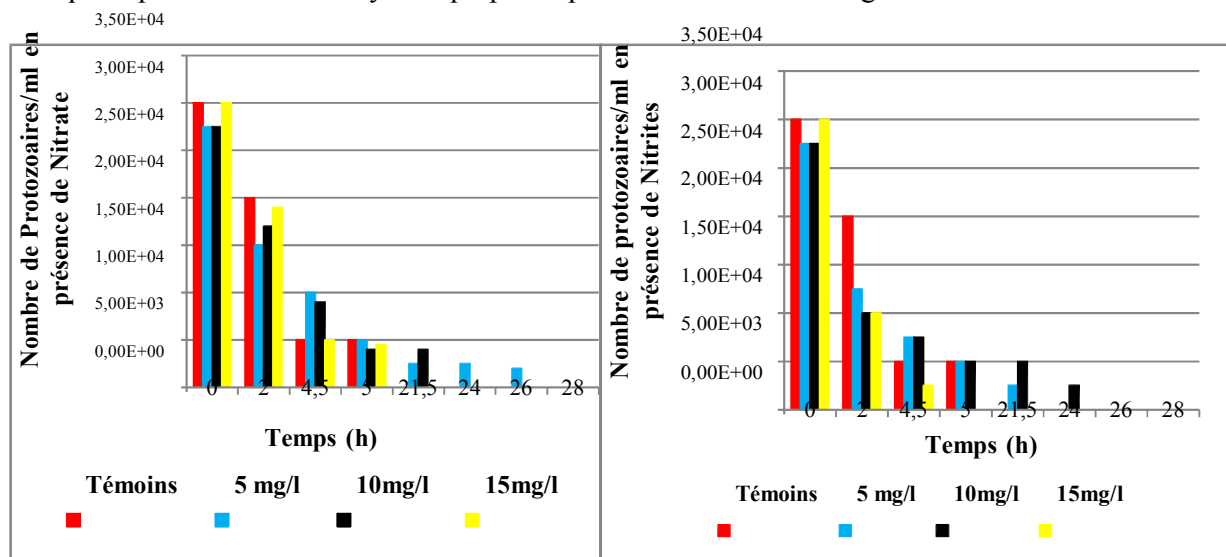
Tandis que, l'ajout des concentrations plus élevées de nitrites (**15mg/l**) provoque la mort des bactéries ; cette concentration semble inhibe leur activité métabolique. Le nitrite ( $\text{NO}_2$ ) est un agent bactéricide puissant [109].

Dans l'intervalle de pH de 4,5 à 5,5, le nitrite devient très bactéricide, car le nitrite existe principalement comme acide nitreux. Au-dessous du pH 4,5 sur le côté plus acide, l'acide nitreux est rapidement transformé en nitrate et en oxyde nitrique. L'acide nitreux présente de loin la plus grande activité antibactérienne vis-à-vis des cellules [109].

Cependant, pour une inhibition totale des bactéries, des quantités considérables de  $\text{NaNO}_2$  sont nécessaires [112].

### III. Le comptage des protozoaires

Les protozoaires ont une grande capacité à ingérer les particules solides de petites tailles, alors qu'ils produisent des enzymes qui participent directement à la digestion.



## Résultats et discussion

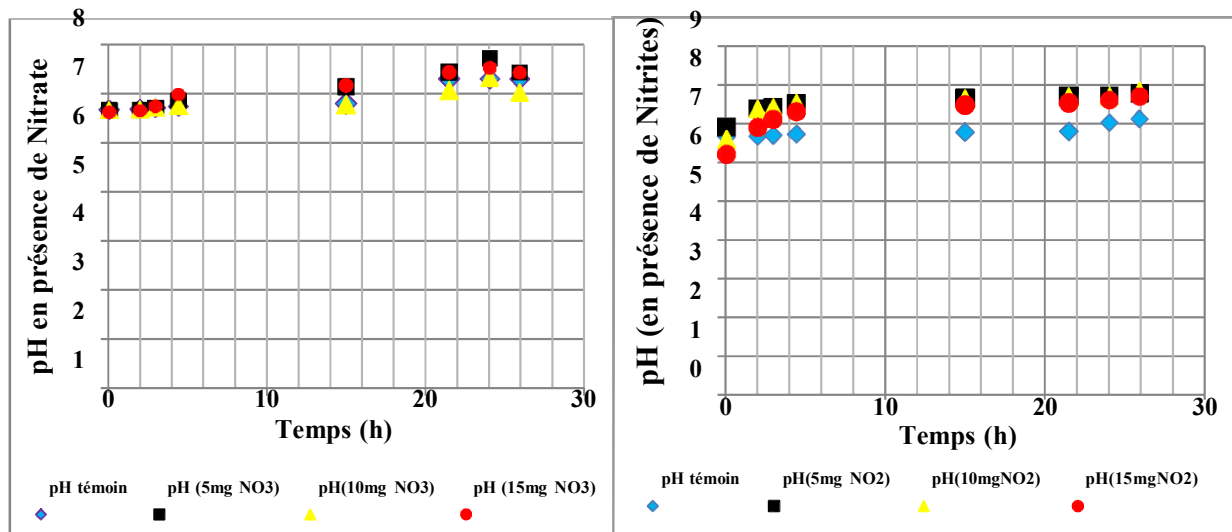
Afin d'étudier l'effet de nitrite et nitrate sur la croissance des protozoaires, les protozoaires ont été inoculés et cultivés dans un milieu de culture contenant différentes concentrations initiales de nitrites et nitrates en anaérobiose, les résultats obtenus avec les trois concentrations sont présentés dans la **figure 23**.

La **figure 23** montre que l'ajout de Nitrate et de nitrite comme additifs avec différentes concentrations, provoque la diminution du nombre de protozoaire comme celle du témoin durant les 5 premières heures, jusqu'à leurs mort après 21 heures.

**Martin, 2014** a montré que le nitrate peut réduire les émissions de méthane de 22%, en utilisant l'hydrogène pour sa réduction. Cette diminution de la disponibilité en hydrogène avec le nitrate a également diminué la quantité et l'activité des méthanogènes, effet appuyé par une toxicité de cet additif pour les protozoaires [113].

D'autre part, **Jouany, 1994** a montré que l'élimination des protozoaires du rumen diminue la dégradation des protéines alimentaires et augmente la synthèse protéique microbienne [106].

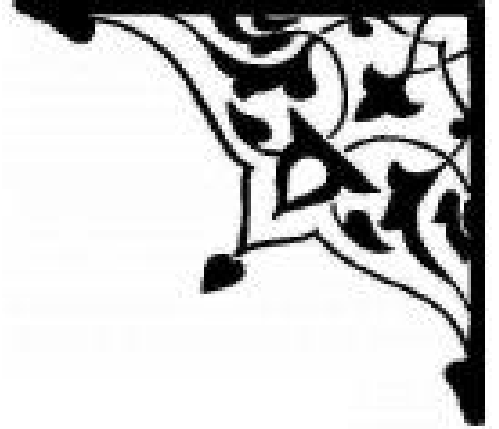
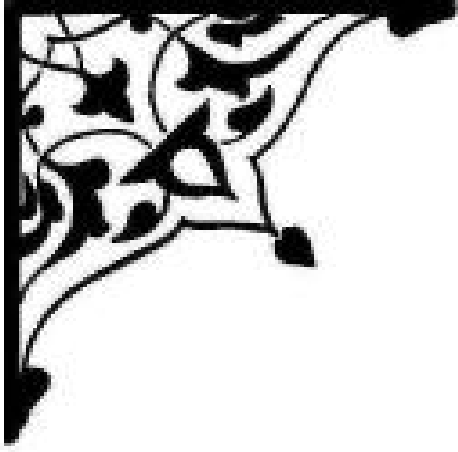
### IV. Suivi du pH du milieu au cours de l'incubation



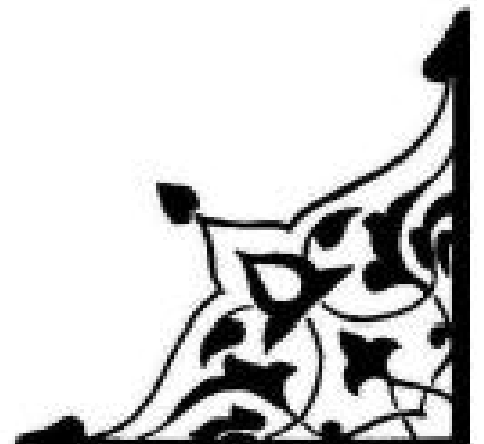
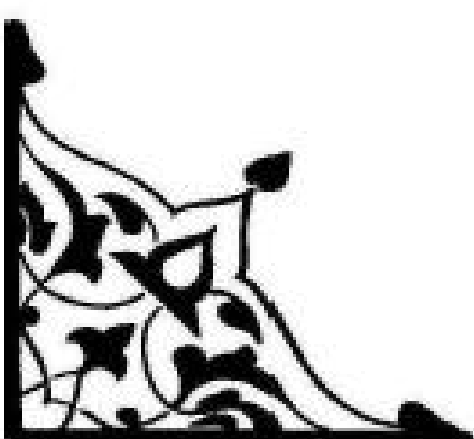
**Figure 24.** Evolution du pH au cours de l'incubation, en présence de Nitrate et de Nitrite comme additifs.

L'évolution du pH au cours de l'incubation en présence de Nitrate et Nitrite est résumé dans la **figure 24** , le pH reste stable dans un intervalle de valeurs entre 6.6 et 7.3, on peut confirmer que cette légère stabilité du pH due à la salive qui constitue une solution tampon pour le rumen. Cette stabilité est favorable à la vie de tous les microorganismes du rumen **[102]**.

L'augmentation de pH final peut être attribuée à la concentration élevée de l'ammoniac issu de la fermentation de l'urée par la microflore ruminal **[109]**. Comme elle pourrait être due aussi à la diminution de concentration de l'hydrogène **[110]**.



**CONCLUSION**  
**GENERALE**



Notre travail avait comme objectif principal l'étude de l'effet différentes concentrations de produits nitreux à base d'azote sur la flore ruminale, en utilisant le jus de rumen frais d'un ovin comme inoculum. Dans ce contexte deux différents produits nitreux étaient utilisés avec des concentrations croissantes. Le Nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ) et le Nitrite de calcium ( $\text{NaNO}_2$ ).

Une première étape été de préparer les différentes solutions de la salive artificielle par combinaison de tous les produits chimiques constituant ces solutions. Puis le prélèvement de notre échantillon (jus de rumen) de l'abattoir.

D'autre part, une étude physicochimique de jus de rumen a donné des valeurs de pH entre 6 et 7.5 et un taux d'humidité faible (34.9%). La mesure de la température a montré que la température de jus de rumen est entre 39 et 40°C.

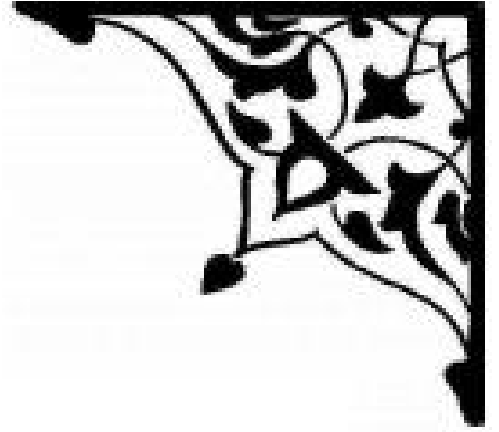
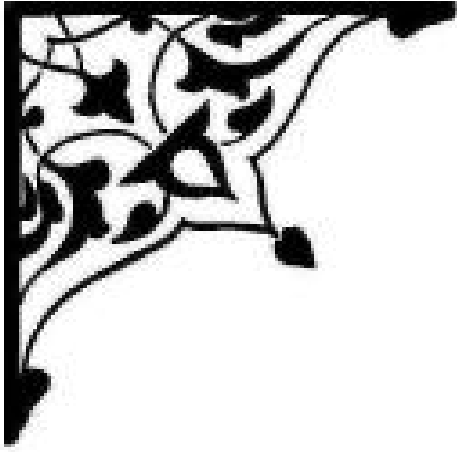
Puis une deuxième étape de la préparation des fermenteurs en batch, par l'utilisation des flacons hermétiquement fermé contenant le milieu de culture, l'inoculum et les différentes concentrations des additifs nitreux, tout en utilisant l'amidon de blé comme substrat. Les fermenteurs sont incubés en anaérobiose totale dans une étuve à  $\text{CO}_2$  à 39°C

Chez le ruminant, la méthanogenèse est un phénomène naturel qui a lieu lors de la digestion microbienne des aliments dans le rumen. La production de méthane est traduite par l'apparition des bulles d'air à la surface des flacons.

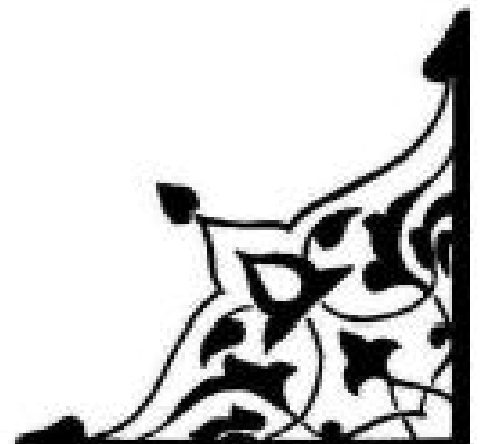
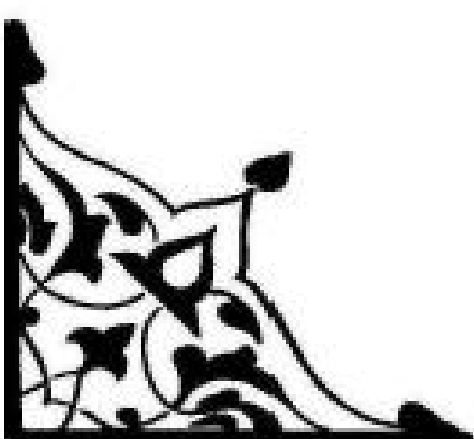
Ces expériences ont montré que le Nitrate peut être utilisé par les bactéries ruminale soit comme source d'azote soit dans la chaîne respiratoire, en favorisant la croissance bactérienne en présence de cet additif par différentes concentrations. Tandis que, l'ajout de nitrites provoque la mort cellulaire à cause de l'effet bactéricide de cet additif surtout avec des concentrations croissantes.

En fin, le dénombrement des protozoaires montre que ces additifs nitreux (nitrate et nitrite) influence directement ou indirectement sur la croissance de ces organismes eucaryotes.

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



*REFERENCE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*



- [1] **Jean-Pierre Jouarry., 2008.** « Mieux comprendre le rumen, un fermenteur, multitâches très efficace ». *Recherche Honoraire INRA.*
- [2] **Kounouz Briki et Sara Debab, 2009** « Etude microbiologique de la microflore ruminal des ovins méthanogènes et additifs alimentaire ». *Mémoire de DES en Microbiologie. Université Mohamed Boudiaf, M'sila, Algérie.*
- [3] **P.Thivend G.Fonty J.P. Jouany, 1985.** « Le fermenteur du rumen ». *INRA Editions, Versailles, France Pages 732, 733, 734.*
- [4] **Robert E. Hungate, 1990.** « Ruminations on the rumen ». *Departement of microbiology university of Colifornia.*
- [5] **J-P. Jouany, L. Broudiscou, R.A.Prins, S.Komisarczuk-Bony, 1995.** « Nutrition des ruminants domestiques ingestion et digestion ». *INRA Editions, Versailles, France , Chapitre 9, pages : 353, 357, 358. Paris*
- [6] **B. Rémond, H. Brugère, C. Poncet, R. Baumont, 1995.** « Le contenu du réticulation-rumen, The rumen an dits microbes ». *INRA Editions, Versailles, France chapitre 7, pages : 267, 268. Paris*
- [7] **B. Rémond, H. Brugère, C. Poncet, R. Baumont, 1995.** « Le contenu du réticulation-rumen, The rumen an dits microbes ». *INRA Editions, Versailles, France, chapitre 7, pages : 269. Paris*
- [8] <http://demo.ginkgo.free.fr/index.php?rang=9.A>
- [9] **J.-P Jouany, L. Broudiscou, R.A. Paris, S. Komisarczuk-Bony, 1995.** « Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen ». *INRA Editions, Versailles, France, pages 353, 357, 358.*
- [10] **C. Dardillat, 1994.** « Fistulation ruminal chez les bovins, ovins et camélidés, ou caecale chez le cheval ». *HAL*
- [11] **M. Flourens, 1877.** « Expériences sur le mécanisme de la rumination ». *Mémoire de l'académie royale des sciences Institut de France n°12-483.*
- [12] **G.E Stoddard, N, N, Allen, W.H, Hall, A. L, POPE D. K Sorensen Et W.R Winchester, 1951.** « A permanent rumen fistula canula for cocus & sheep ». *Journal of animal science n°10-2 p. 417-423.*
- [13] **G. Colin, J,B, Bailliére, 1854.** « Traité de physiologie comparée des animaux ». *INRA Editions, Versailles, France.*
- [14] **G.E Stoddard, N. N. Allen, W. H. Hale, A. L. Pope, D. K Sorensen et W.R Winchester, 2013.** « A permanent rumen fistula canula for cocus & sheep ». *Journal of sciences n°10-2 P.417.*

- [15] **A.F.Schalk et R.S Amadon, 1928.** « Physiology of the ruminant stomach (bovine) : study of the Dynamics factor »
- [16] **Michel Doreau, 2008.** « Apports et limites des techniques alternatives à la chirurgie expérimentales du tractus digestif des herbivores ». *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France, no 161-5 p. 425-433.*
- [17] **Michel Doreau, 2008.** « Interest and limitations of techniques replacing experimental surgery on the digestive tract of herbivores »
- [18] **Animal Ethics committee, 2013.** « Rumen- canulation of sheep, Standard Operating Procédures ». *The university of Western Australia*
- [19] **Pierre Vandeginste, 2008.** « Des vaches à hulots pour regarder passer les chercheurs » *Archive sur rue 89.*
- [20] **Ferme de la Rouzule, 2015.** « Etude *in vitro* de l'extractibilité de deux hydrocarbures Aromatiques polycyclique du sol de jus de rumen ». *Archive consulté le 24 juillet mention des vaches fistules du domaine expérimental de la Rouzule dans un article de 2003*
- [21] **C.Martin, D.P.Morgavi .M. Doreau et J.P Journey 2006.** « Comment réduire la production de méthane chez les ruminants ». *Fourrages NO.187.P.283.300.*
- [22] **Martin. P.Bryant.** « Bacterial species of the rumen » Dairy Cattle Research Branch, *Animal Husbandry Research Division, Agricultural Research Service, Agricultural Research Center, U. S. Departement of Agriculture, Beltsville, Maryland.*
- [23] **Sijpestenjn.A.K., 1948** « Cellulose. Decomposing bacteria from the rumen of Cattle ».
- [24] **Paul Weimer, 2007.** « Rumen microbes : Take a closer look at these interesting creatures that both work for & feed dairy cattle ». *US. Dairy forage Research Center, USDA- Agricultural Research Service Madison Wisconsin. 608-890-0075.*
- [25] **B.Rémond, 1995.** « Influence des ciliés du rumen sur la digestion de différents glucides avec le mouton : le contenu réticulation-rumen »
- [26] **Alan G. Williams Geoffrey S. Coleman, 1962.** « Role of protozoa in the rumen ». *317. 91-11655.*
- [27] [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635774.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635774)
- [28] **Charles J. Newbold, Gabriel de la Fuente, Alejandro Belanche, Eva Ramos-Morales, and Neil R. McEwan., 2015** « The role of ciliate protozoa in the rumen front microbial ». *HALL 6.1313.*
- [29] **D.E. Akin., W.S. Borneman, October 1990.** « Role of rumen fungi in fibre degradation ». *Volume 73, Issue 10, Pages 3023-3032.*

- [30] **Y. W. Ho, N. Abdullah, February 1991.** « The role of the rumen fungi in fibre digestion ». *Article in Asian Australien Journal of animal sciences 12(1) : 104-112.*
- [31] **Geoffrey .L.R.Gorden & Michael W. Philips, 1998.** « The role of anaerobic gut fungi in ruminants ». *Common wealth Scientific& industriel research organisation (CSIRO) Division of animal production locked Bag 1 Delievry Center. Black Town New South wales 2148 Australia.11, 133-168*
- [32] Milk production.com, Rumen Microbiology, 02/10/2000.
- [33] **Sarah E. Hook, André-Denis G. Wright, & Brian W. McBride, 2010.** « Methanogens : Mathan producers of the rumen & mitigation stratégies ». *Article ID 945785, 11 pages.*
- [34] **Guillaume, Hervé, 2007.** « Flore du rumen, Origine, Composition, Evaluation, Conséquences, Physiopathologiques ». *Thèse pour le Doctorat vétérinaire faculté de médecine de CRETEIL.*
- [35] **M. Maroune, S. Bartos, Septembre 1987.** « Interaction between rumen Amylolytique & lactate- utilizing bacteria in growth on strach ».
- [36] **M. A. Cotta., 1988.** « Amylolytique activity of selected species of ruminal bacteria ». *54(3): 772–776.*
- [37] **Leulmi N., 2011.** « La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogenèse ruminal chez l’ovin ». *Mémoire pour l’obtention du Diplôme de Magister en microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine.*
- [38] **Franche-Comté, 2013.** « Le méthane ». *Fiche polluant.*
- [39] **Yvan Chouinard, Ph. D.,** « production et émission du méthane et du gaz carboniques par les ruminants ». *65<sup>e</sup> congrès de l’ordre des agronomes du Québec. Université Laval.*
- [40] **Angela R. Moss-Jean-Pierre. Jouany – JohnMay , 2000.** « Methane production by ruminants : its contribution to global warming ». *New hold Volume 49.*
- [41] **Eric.J.Belhk, Novembre 2007.** « Attenuation of Ruminant Methanogenesis ». *University of Nebraska-Lincoln.*
- [42] **Jean-Pierre Jouany, et Pierre Thivend, 2008.** « La production de méthane d’origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatic ». *INRA Editions, Versailles, France N°20.*
- [43] **Start E. Denman, 2007.** « Quantification & diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response the anti methanogenic compound bromochlorométhane »

- [44] **Popova M., 2011.** « Structure et activité de la communauté des *Archea méthanogènes* du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants ». *Thèse présentée à l'université Blaise Pascal pour l'obtention du grade de Docteur d'université.*
- [45] **S. K. Sirodi- Neha Pandey. B-Dingh-A.K.Piyuya.** « Rumen methanogens : are view » page 255.
- [46] **Start.E. Denman, 2007.** « Quantification and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the anti methanogenic compound bromochlorométhane » 62(3):313-22.
- [47] **Robert E. Hungate, 1966.** « The rumen and its microbes ». *Academic Press · New York And London. Page 148.*
- [48] **Jouany J P.Broundiscoul. Prins R.A & Komisarczuk-Bony .S., 1994.** ; « Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen; Nutrition des ruminants domestiques ». *INRA Editions, Versailles, France 350.381.*
- [49] **Fonty G. Foranoegaudetg ; Komisarczuks & Gouet P., 1988.** « Donnée nouvelles sur les bactéries cellulolytiques. Reproduction Nutrition and Développement ». 28.19.32.
- [50] **Galzer AN.Nikaidation H, 2007.** « Microbial biotechnology ». *2<sup>nd</sup> Edition Cambridge University Press.*
- [51] **Emma Ransam Jones & David L Jones Alan J.MC Carthy & James E.MC Donald, 2012.** « The Fibrobacter : an important phylum of cellulose Degrading Bacteria ». *Microbial Ecology 63 :267-281.*
- [52] **M.Qi.K.D.Jaboker & T.A MC Allister.** « Rumen microbiology ». *Agriculture and Agri-Food Canada Lethbridge. Research canter. Lethbridge .Alberta. Canada.*
- [53] **Hervé G.** « Flore du rumen : origine, composition, évolution, Conséquences, Physiopathologic ». *Thèse pour le doctorat vétérinaire, faculté de médecine de CRETEIL par BELBIS*
- [54] **Daniel Lessener, December 2009.** « Methanogenesis Biochemistry ». *University of Arkanass ».*
- [55] **D.P. Morgavi, W.J. Kelly, P.H. Janssen, G.T. Attwood, 2013.** « La méta génomique des microorganismes du rumen et ses application à la production des ruminants ». *INRA Editions, Versailles, France 26 (4), 347-362.*
- [56] **Diego P Morgavi, January, 2011.** « Méthane production & ruminal microbial interactions ». *INRA Editions, Versailles, France.*

- [57] **C. Martin, D. Morgavi, M. Doreau .J.P.Jouany, 2006.** « Comment réduire la production de méthane chez les ruminants? ». *INRA Editions, Versailles, France, 187, 283-300.*
- [58] **Amélie B., 2016.** « Validation d'une technique de réduction de la production de méthane d'origine digestive chez la vache laitière en condition commerciales ». *Mémoire de maîtrise en science animal. Québec, Canada.*
- [59] **Yang C, Rooke JA, Cabeza I, Wallace RJ, Feb 2016.** « Nitrate and inhibition of Ruminant Methanogenesis Microbial Ecology Obstacles, and Opportunists for Lowering Methane Emission from Ruminant Live store ».12; 7:132.
- [60] **Helfer M., 2012.** « Etude des matériaux de reconstruction prothétique odontologique en salive artificielle ». *Thèse de doctorat, université de Nancy, page 122.*
- [61] **Jean-Yves Simon, 2012.** « Corrosion des Alliages Titane-Molybdène dans une salive artificielle acidifiées ». *Mémoire pour le Certifiant d'études cliniques spéciales Mention Orthodontie.*
- [62] **Guillaume H., 2007.** « Flore du rumen : Origine, Composition, Evolution, Conséquences, Physiopathologiques ». *Thèse de Doctorat vétérinaire, Université de Belbis.*
- [63] **Amokrane S., 2010.** « Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaire lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale » *Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme de Magistère, université de Constantine, Algérie.*
- [64] **Alia O. Et Boutera M., 2015.** « Contribution à l'évaluation de la valeur nutritionnelle de certaines halophytes, broutés par le dromadaire natives des écosystèmes salins Algériens ». *Mémoire de fin d'étude en vue d'obtention da Master, université de Constantine.*
- [65] **Jouany J.P. Broudiscou L. Prins R A And Komisarczuk-Bony S., 1994.** « Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In: Nutrition des ruminants domestiques ». *INRA, Paris pp. 350-381.*
- [66] **Joblin, K. N., 2005.** *Methanogenic Archea.* Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants. *H. P. S. Makkar and C. S. McSweeney, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pages 47-53 in*
- [67] **Ogimoto K., Imai S., 1981.** "Atlas of Rumen Microbiology". *Tokyo: Japan Scientific Societies,*
- [68] **Prescott D. M., Murti K. G., 1974.** "Chromosome structure in ciliated protozoa" *Quant. Biol.38, 609–618. 10.1101/SQB.1974.038.01.065*

- [69] Kittelmann S., Devente S. R., Kirk M. R., Seedorf H., Dehority B. A., Janssen P. H., 2015. “Phylogeny of the intestinal ciliated including first sequences from *Charonina ventriculi* and comparasion of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis”. *Microbial*.81, 2433–2444. 10.1128/AEM.03697-14
- [70] Williams A. G., Coleman G. S., 1992. “The Rumen Protozoa”. *New York: Springer-Verlag*.
- [71] [www.atmo-franche-comte-org](http://www.atmo-franche-comte-org).
- [72] Bapteste, E., Brochier, C. & Boucher, Y., 2005. « Higher level classification of the Archeas ; evolution of methanogeneses and methanogens ». *Archea* 1.353-363.
- [73] Watanabe, T., Kimura, M. & Asakawa, S., 2009. “Distinct memberes of stable methanogenic Archeal community transcribe *mrcA* genes Under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil”. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 276-285.
- [74] Takai kan & Koki Horikoshi, Novembre 2000. « Rapid Detection and Quantification of Members of the Archaeal Community by Quantitative PCR Using Fluorogenic Probes » *66(11): 5066–5072*.
- [75] 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.
- [76] Bogaert C., Gomez L., Jouany J-P., Jeminet G., 1989. “Effects of the ionophores antibiotics lasalocid and cationomycin on ruminal fermentation *in vitro*”. *INRA Editions, Versailles, France* 27, 1-15.
- [77] Jouany J-P., Lassalas B., 1997. “Study of the adaptation of the rumen ecosystem to the antimethanogenic effect of monensine measured *in vivo*”. *INRA Editions, Versailles, France* S69-S70.
- [78] Erika Angarita, Isabel Molina, Gonzalo Villegas, Olga Mayorga, Julián Chará and Rolando Barahona, 1807. « Quantitative analysis of rumen microbial populations by qPCR in heifers fed on *Leucaena leucocephala* in the Colombian Tropical Dry Forest »
- [79] Vermorel M., Jouany J-P., 1989. “Effects of rumen protozoa on energy utilisation by wethers of two diets based on ammonia-treated straw supplemented or not with maize”. *INRA Editions, Versailles, France*, 2, 475-476.

- [80] Takahashi J., Chaudhry A.S., Beneke R.G., Young B.A., 1997. "Modification of methane emission in sheep by cystéine and a microbial preparation", *Sci.Total Environ.*, 204, 117-123.
- [81] Nollet L., Mbanzamihiho L., Demeyer D.I., Verstraete 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"., 71, 49-66.
- [82] Stock P.K., McCleskey C.S., 1964. "Morphology and physiology of *Methanomonas methanooxidans*", *J. Bacteriol.*, 88, 1071-1077.
- [83] Kajikawa H., Valdez C., Hillman K., Wallace R.J., Newbold C.J., 2003. "Methane oxidation and its coupled electron-sink reactions in ruminal fluid, 36, 354-357.
- [84] 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.
- [85] Callaway T.R., Martin S.A., 1996. "Effect of organic acid and monensin treatment on *in vitro* mixed ruminal microorganisms fermentation of cracked corn"., 74, 1982-1989.
- [86] Newbold C.J., Rode L.M., 2006. "Dietary additives to control methanogenesis in the rumen", Soliva C.R., Takahashi J., Kreuzer M. éds., *Greenhouse Gases and Animal Agriculture*, Elsevier Science B.V., in press.
- [87] J-P. Jouany, D. Morgavi, 2007. "Use of "natural" products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production". *Animal*, Vol.1, p.1443-1466.
- [88] J-P. Jouany, 1994. "Manipulation of microbial activity in the rumen". *Archives for Animal Nutrition*, Vol. 46, p.133-153.
- [89] Y. Chilliard, A. Ferlay, M. Doreau, 2001. "Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids", *Live stock Production Science*, Vol. 70, p.31-48.
- [90] Ikwuegbu O.A., Sutton J.D., 1982. "The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep", 48, 365- 375.

- [91] 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.
- [92] Cardozo P.W., Calsamiglia S., Ferret A., Kamel C., 2004. “Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture”, 82, 3230-3236.
- [93] Jouany J-P, Lassalas B., Coulmier D., 2005. “Etude *in vitro* des effets de l’ajout de sérum de luzerne sur les fermentations ruminales”, *Ruminants*, 12, 240.
- [94] Van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Dijkstra, J., Newbold, J. R., Hulshof, R. B. A et Perdok, H. B., 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:4028-4038
- [95] Nolan, J. V., Hegarty, R. S., Hegarty, J., Godwin, I. R et Woodgate, R., 2010. “Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetic in sheep. *Anim. Prod. Sci.* 50:801-806.
- [96] Lee, C. et Beauchemin, K. A., 2014. “A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance”. *Can. J. Anim. Sci.* 94:557-570
- [97] Reynold, C. K., Humphries, D. J., Kirton, P., Kindermann, M., Duval, S. et Steinberg, W., 2014. “Effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission, digestion, and energy and nitrogen balance of lactating dairy cows”. *J. Dairy Sci.* 97:3777-3789
- [98] Groupe de l’ASMV (Association scientifique de médecine vétérinaire), 2012. « Fistulasion d’un ovin ». *Institut de médecine vétérinaire ; Batna.*
- [99] Nicolie J.A., Javanivic M., Zeremtsdk, 1987. « Application of modified *in vitro* obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid”.
- [100] Benkhadra D., 2010. « Comportement physico chimique des inserts dentaires ». *Mémoire présenté Pour Obtenir le Diplôme de magister, université de Biskra.*
- [101] Menke K., Steingass H, 1988. « Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid ». 28, 7-55.
- [102] Djouablia H., 2016. « Effet de la source d’azote sur les principaux groupes bactériens du rumen de bovin – cas des cellulolytiques ». *Mémoire présenté en vue de l’obtention du Diplôme de Master. Université des Frères Mentouri Constantine.*

- [103] **Abla F. et Bouchaar H., 2016.** « Effet de la source d'azote sur l'activité métabolique des principaux groupes bactériens du rumen de bovin : cas du bicarbonate d'ammonium et du nitrate de potassium ». *Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master Université des Frères Mentouri Constantine.*
- [104] **Boultifat L., 2008.** « Evaluation de la contribution spécifique des fractions soluble et insoluble de sous-produits de l'agronomie saharienne à la méthanogènes ruminal d'ovins ». *Mémoire pour l'obtention du diplôme en Magister ; en Microbiologie, Université Mentouri de Constantine.*
- [105] **Daniel Demeyer, Veerle Fievez, Submitted, 2000.** « Ruminants et environnement : la méthanogenèse »; *HAL Id: hal-00889884.*
- [106] **J.-P. Jouany , 1994.** « Le fermenteur dans le rumen et leur optimisation ». *Station de Recherches sur la Nutrition des Herbivores Theix 63122 St Genès Champanelle 7(3), 207-225.*
- [107] **Ogimoto K., Imai S., 1981.**“Atlas of Rumen Microbiology”. *Japan Scientific Society Press, Tokyo, Japan.*
- [108] **Phillipson A.T., 1970.** « Physiology of Digestion and Métabolism in the Ruminant.- *Newcastle: ORIELPRESS* ».- 636p.
- [109] **Korkeala H, Alanko T, Tiusanen T., 1992** « Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria »
- [110] **Bernard J.K., Colhoum M.C., Martin S.A., 1999.** “Effect of coating whole cottonseed on performance of lactating dairy cows”. *J. Dairy. Sci, 82: 1296-1304.*
- [111] **Cheurfi W.,** « Utilisation de bactéries prélevées dans la station d'épuration d'el MNIA Constantine pour la Dénitrification». *Thèse de Doctorat En Science en Chimie Analytiques Et Physique, université de Constantine.*
- [112] **H.Korkeala, T.Alanko and T.Tiusanen, 1992.** « Effect of sodium nitrite and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria »33,27-32.
- [113] **Martin Cécile, 2014.** « Effet additifs du nitrate et de l'huile de lin sur les émissions de méthane des ruminants ». *UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France.*
- [114] **Anderson, R.C., Callaway, T.R., Van Kessel, J.S., Jung, Y.S., Edrington, T.S., Nisbet, D.J., 2003.** “Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis”. *Bioresour.Technol. 90, 59–63.*

## Résumé

Le rumen, ou plus précisément le réticulo-rumen, est une grande chambre dans laquelle l'alimentation ingérée est d'abord soumise à une digestion microbienne car les conditions qui existent sont propices à la survie et à la croissance d'une population microbienne dense et variée. L'une des techniques les plus utilisées pour permettre l'examen de cette population *in vitro* est la fistulation: qui base sur l'insertion d'une canule dans le corps de l'animal, en mettant l'accent sur le rôle des microorganismes (bactéries, protozoaires, *Archae méthanogène* et champignons) sur la méthanogenèse.

L'objectif qui a mené à la rédaction de ce travail est d'étudier l'effet de différents produits nitreux à base d'azote avec différentes concentrations sur la flore ruminal, et pour cela deux études peuvent avoir lieu *in vitro* : d'un part la mesure de la concentration bactérienne par dosage de la DO par spectrophotomètre ; et d'autre part, un dénombrement des protozoaires par l'utilisation des cellules de Mallasez.

Les résultats obtenus ont montré que le nitrate est utilisé par les bactéries en favorisant leurs croissances, soit comme accepteur final d'électrons dans la respiration soit comme source d'azote, mais il présente un facteur inactivant les protozoaires. Les nitrites ont un effet bactéricide surtout avec des concentrations élevées et aussi, ce produit réduit la charge de protozoaires ruminal.

**Mots clés :** Rumen, flore ruminale, Méthanogenèse, Produits nitreux, Anaérobiose.

## **Abstract**

The rumen, or the reticulo-rumen, is a large chamber in which the ingested feed is first subjected to microbial digestion because the conditions that exist are conducive to the survival and growth of a dense microbial population. One of the most widely used techniques for examining this population *in vitro* is fistulation: which is based on the insertion of cannula into the body of the animal.

The aim of this work is to investigate the effect of different nitrous nitrogen products with different concentrations on the ruminal flora, and two studies can be carried out *in vitro*: Measuring the bacterial concentration by spectrophotometer; And a protozoa count by the use of Mallasez cells.

The results obtained have shown that nitrate is used by bacteria by promoting their growth either as a final electron acceptor in respiration or as a source of nitrogen, but it has a factor inactivating protozoa. Nitrites have a bactericidal effect especially with high concentrations and also, this product reduces the load of ruminal protozoa.

**Key Words:** Ruminal flora, Methanogenesis, Nitrous products, Anaerobiosis.

**BENACHI Safa**

**Date de soutenance**

**Diplôme : Master académique en Microbiologie**

**Thème : Effets Des Produits A Base D'azote Sur La Flore Méthanogène *In Vitro* Dans Un Réacteur Fermé (Batch Reactor)**

**Résumé**

Le rumen, ou plus précisément le réticulo-rumen, est une grande chambre dans laquelle l'alimentation ingérée est d'abord soumise à une digestion microbienne car les conditions qui existent sont propices à la survie et à la croissance d'une population microbienne dense et variée. L'une des techniques les plus utilisées pour permettre l'examen de cette population *in vitro* est la fistulation: qui base sur l'insertion d'une canule dans le corps de l'animal, en mettant l'accent sur le rôle des microorganismes (bactéries, protozoaires, *Archae méthanogène* et champignons) sur la méthanogénèse.

L'objectif qui a mené à la rédaction de ce travail est d'étudier l'effet de différents produits nitreux à base d'azote avec différentes concentrations sur la flore ruminal, et pour cela deux études peuvent avoir lieu *in vitro* : d'un part la mesure de la concentration bactérienne par dosage de la DO par spectrophotomètre ; et d'autre part, un dénombrement des protozoaires par l'utilisation des cellules de Mallasez.

Les résultats obtenus ont montré que le nitrate est utilisé par les bactéries en favorisant leurs croissances, soit comme accepteur final d'électrons dans la respiration soit comme source d'azote, mais il présente un facteur inactivant les protozoaires. Les nitrites ont un effet bactéricide surtout avec des concentrations élevées et aussi, ce produit réduit la charge de protozoaires ruminal.

**Mots clés :** Rumen, flore ruminale, Méthanogénèse, Produits nitreux, Anaérobiose.

**Promotrice:** M<sup>emc</sup> KHEDDOUMA A. (MAA) Univ. Abbès Laghrour - Khenchela

**Devant le Jury**

**Président :** M BOUAZZA L. (MCA) Univ. Abbès Laghrour - Khenchela

**Examineur:** M. BABAIIDIA A. (MAA) Univ. Abbès Laghrour - Khenchela