



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 10915

**To cite this version :**

Dusart, Clément. *La digestion ruminale : mise en place d'un modèle d'étude in vitro à long terme en cultures Batch*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 114 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# LA DIGESTION RUMINALE : MISE EN PLACE D'UN MODÈLE D'ÉTUDE *IN VITRO* A LONG TERME EN CULTURES BATCH

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**DUSART Clément**

Né, le 21 Février 1988 à Saint Quentin (02)

---

**Directeur de thèse : Mme Annabelle TROEGELER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Hugues CHAP**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Annabelle TROEGELER**  
**M. Francis ENJALBERT**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE







# LA DIGESTION RUMINALE : MISE EN PLACE D'UN MODÈLE D'ÉTUDE *IN VITRO* A LONG TERME EN CULTURES BATCH

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**DUSART Clément**

Né, le 21 Février 1988 à Saint Quentin (02)

---

**Directeur de thèse : Mme Annabelle TROEGELER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Hugues CHAP**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :  
**Mme Annabelle TROEGELER**  
**M. Francis ENJALBERT**

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE  
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. A. MILON

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootéchnie*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

#### **MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

#### **MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WASET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

#### **MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

#### **ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
Mlle **PASTOR Mélanie**, *Médecine Interne*  
M **VERSET Michaël**, *Chirurgie des animaux de compagnie*

**A NOTRE PRESIDENT DE JURY DE THESE,**

**Monsieur le professeur CHAP,**  
Professeur des Universités Paul Sabatier de Toulouse,  
Biochimie

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre thèse.  
Avec toute ma gratitude, hommages respectueux.

**A NOTRE JURY DE THESE,**

**Madame le maître de conférences TROEGELER-MEYNADIER**  
Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
Alimentation

Qui nous a fortement guidés dans l'élaboration de ce travail.  
Pour sa patience, sa disponibilité et ses conseils.  
Très sincères remerciements

**Monsieur le professeur ENJALBERT**  
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,  
Alimentation

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse.  
Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Merci au personnel du service d'alimentation de l'ENVT pour leur aide, leur disponibilité et leur collaboration.

Aux vétérinaires qui m'ont transmis leur passion du métier : Jean-Marie Lubret à Fruges, Christophe Pouillaude et Vincent Xémar à Bapaume, Philippe Quinet à Calvinet, Jean Sylvestre à Magnac-Bourg, Philippe Vermoote, Arnaud Delambre et Aurélien Halle à Avesnes-le-comte, Yves Marambat à Saint Girons, Marc et Jean-Benoit Lamort à Muno, Carina Detaille et Christophe Gillet à Blâmont.

A mes parents,

Pour m'avoir toujours accompagné et encouragé dans mon parcours, pour m'avoir permis de me réaliser, pour votre amour indéfectible.

A mes grands-parents,

Pour votre soutien sans faille, pour vos conseils avisés, pour les dimanches passés à Athies et pour tous ces bons moments.

A Martin et Thomas,

Pour ces beaux instants passés ensemble.

A Pierre, Hubert et Véronique, Jeanne et Didier, Yves et Tanette,

Pour votre soutien et votre présence.

A Laure,

A ta manière de me supporter, de m'encourager et de me soutenir. Pour tous ces bons moments passés ensemble, de nos voyages jusqu'à nos week-ends de garde, et pour tout ce qu'il nous reste à vivre.

Aux copains du nord,

A Clément, Manon, Adrien, Marie, Amaury, Imane, Pauline...

A ceux de la prépa,

A Maxime, Alban, Alexis...

Aux vétos toulousains avec qui j'ai passé 5 années extraordinaires.

A mes colloc', Bastien, Fag, Céline, Thibault et Alex,

Pour ces moments passés ensemble, ces soirées et aussi pour ces coups de gueules...

A toute la famille, Oliv', Soai, Marion, Charlotte, Aude, Pauline, Ragotte, Doui et Mylène, Carole Claire,

Pour toutes ces booms passées ensemble, aux formations de sécurité routière, aux vendeurs mexicains, au trou d'balle masqué, à tonton...

Au service de bovine,

A Mumu, Golden, Kevin, Marie et bien sûr à P'tit Laurent.

Au VRC,

A mes docteurs,

A Pauline, Marie, Clémence, Claire, Mathieu, Vincent, Fixou...

A mes poulots,



# Table des matières

<b>TABLE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>- 13 -</b>
<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>- 15 -</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>- 16 -</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>- 18 -</b>
<b>PREMIERE PARTIE :.....</b>	<b>- 19 -</b>
<b>I. LE RUMEN ET SON ECOSYSTEME MICROBIEN .....</b>	<b>- 21 -</b>
A. Particularité anatomo-physiologique du tube digestif des ruminants.....	- 21 -
1. Anatomie de l'estomac des ruminants .....	- 21 -
a. Le réticulo-rumen.....	- 21 -
i. Conformation externe .....	- 21 -
ii. Conformation interne.....	- 22 -
b. L'omasum .....	- 24 -
i. Conformation externe .....	- 24 -
ii. Conformation interne.....	- 25 -
c. L'abomasum.....	- 25 -
i. Conformation externe .....	- 25 -
ii. Conformation interne.....	- 25 -
2. Motricité du complexe gastrique .....	- 26 -
B. Conditions physico-chimiques dans le réticulo-rumen .....	- 27 -
1. Les différentes phases du contenu ruminal .....	- 27 -
a. La phase liquide .....	- 27 -
b. La phase solide.....	- 27 -
c. La phase gazeuse.....	- 28 -
2. Le pH.....	- 28 -
3. Le potentiel d'oxydo-réduction .....	- 28 -
4. La température.....	- 29 -
C. Le microbiote.....	- 30 -
1. Les bactéries .....	- 30 -
a. Les bactéries dégradant les glucides.....	- 31 -
i. Les bactéries dégradant les glucides pariétaux .....	- 31 -
ii. Les bactéries dégradant les glucides cytoplasmiques et le lactate .....	- 32 -
b. Les bactéries protéolytiques .....	- 33 -
c. Les bactéries agissant dans le métabolisme des lipides.....	- 33 -
2. Les protozoaires.....	- 34 -
3. Les champignons .....	- 36 -
<b>II. DIGESTION DES ALIMENTS D'ORIGINE VEGETALE PAR LES MICROORGANISMES RUMINAUX.....</b>	<b>- 37 -</b>
A. Digestion des glucides alimentaires .....	- 37 -
1. Les glucides des végétaux .....	- 37 -
a. Les glucides cytoplasmiques .....	- 37 -
i. Les glucides hydrosolubles .....	- 37 -
ii. Les glucides de réserve .....	- 38 -

b.	Les glucides pariétaux .....	- 38 -
i.	La cellulose .....	- 38 -
ii.	Les hémicelluloses .....	- 39 -
iii.	La lignine .....	- 39 -
iv.	Les pectines.....	- 39 -
2.	Les méthodes d'évaluation des teneurs en glucides dans les aliments .....	- 40 -
a.	La méthode de Weende .....	- 40 -
b.	La méthode de Van Soest.....	- 40 -
3.	Dégradation des glucides .....	- 41 -
a.	Adhésion et digestion extracellulaire des glucides alimentaires .....	- 42 -
i.	Dégradation des fibres .....	- 42 -
ii.	Digestion de l'amidon.....	- 42 -
b.	Voies métaboliques de la fermentation des glucides par les bactéries ruminales.....	- 43 -
c.	Produits terminaux et principaux facteurs de variation .....	- 43 -
d.	Absorption des acides gras volatils .....	- 45 -
B.	Digestion des lipides alimentaires.....	- 46 -
1.	Les différents lipides alimentaires .....	- 46 -
2.	Le dosage des lipides alimentaires.....	- 46 -
3.	Le métabolisme ruminal des lipides .....	- 47 -
a.	La lipolyse .....	- 47 -
b.	La biohydrogénation ruminale .....	- 48 -
c.	Synthèse microbienne d'acides gras à chaîne hydrocarbonée impaire et ramifiée .....	- 49 -
4.	Les principaux facteurs de variation des teneurs en AG dans les denrées alimentaires d'origine animale .....	- 50 -
C.	Digestion de l'azote alimentaire.....	- 52 -
1.	Nature de l'azote alimentaire.....	- 52 -
2.	Dosage de l'azote alimentaire.....	- 53 -
a.	Méthode Kjeldahl.....	- 53 -
b.	Méthode Dumas .....	- 53 -
3.	Dégradation de l'azote.....	- 54 -
a.	Protéolyse .....	- 54 -
b.	Hydrolyse des peptides.....	- 55 -
c.	Dégradation des acides aminés.....	- 55 -
d.	Devenir des autres composés azotés de la ration.....	- 55 -
e.	Synthèse microbienne des protéines.....	- 56 -
<b>III.</b>	<b>LES METHODES D'ETUDE DE LA DIGESTION RUMINALE .....</b>	<b>- 58 -</b>
A.	Les études <i>in vivo</i> .....	- 58 -
1.	Etudes avec des animaux non canulés .....	- 58 -
2.	Etudes avec des animaux canulés .....	- 59 -
a.	Etudes du contenu ruminal .....	- 59 -
b.	Bilans <i>in vivo</i> des activités microbiennes.....	- 59 -
c.	Méthode <i>in sacco</i> .....	- 60 -
C.	Les études <i>in vitro</i> .....	- 62 -
1.	Méthodes générales .....	- 62 -
2.	Mise en culture de contenu ruminal en milieu fermé ou « batch » .....	- 62 -
3.	Mise en culture de contenu ruminal en système ouvert .....	- 63 -
b.	Le système Rusitec.....	- 64 -
c.	Le système « Dual flow continuous culture » .....	- 65 -
4.	Les méthodes de dosage de l'activité enzymatique .....	- 67 -

**SECONDE PARTIE : ..... - 69 -**

<b>I. MATERIEL ET METHODE .....</b>	<b>- 71 -</b>
A. Expérimentations .....	- 71 -
1. Substrats, solution tampon et inoculum .....	- 71 -
2. Cultures.....	- 74 -
3. Mesure des activités microbiennes .....	- 74 -
4. Mesure des activités enzymatiques.....	- 76 -
B. Préparation des échantillons collectés.....	- 77 -
1. Matières premières .....	- 77 -
2. Echantillons prélevés lors des cultures pour le dosage de NH <sub>3</sub> et d'AGV .....	- 77 -
3. Echantillons prélevés pour la mesure des activités microbiennes .....	- 77 -
4. Traitement des sachets de nylon .....	- 78 -
C. Analyses chimiques .....	- 78 -
1. Dosage des acides gras volatils.....	- 78 -
2. Dosage de l'ammoniac .....	- 78 -
3. Dosage de la MAT.....	- 79 -
4. Dosage de l'amidon .....	- 79 -
5. Dosage des glucides pariétaux.....	- 79 -
6. Dosage des AG .....	- 79 -
D. Calculs réalisés.....	- 82 -
E. Analyses statistiques .....	- 83 -
<b>II. RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>- 84 -</b>
A. Comparaison des études <i>in sacco</i> et des mesures des activités bactériennes <i>in vitro</i> sur 8 heures à J1 .....	- 84 -
1. Dégradation de l'azote et des glucides .....	- 84 -
a. Résultats .....	- 84 -
b. Discussion .....	- 85 -
2. Biohydrogénation .....	- 86 -
a. Résultats .....	- 86 -
b. Discussion .....	- 88 -
B. Comparaison des activités bactériennes et enzymatiques <i>in vitro</i> sur 3 heures .....	- 89 -
1. Dégradation de l'azote et des glucides .....	- 89 -
a. Résultats .....	- 89 -
b. Discussion .....	- 90 -
2. Biohydrogénation .....	- 92 -
a. Résultats .....	- 92 -
b. Discussion .....	- 92 -
C. Evolution des cultures sur cinq jours : monitoring des fermentations .....	- 93 -
1. Résultats .....	- 93 -
2. Discussion.....	- 94 -
D. Comparaison des activités bactériennes <i>in vitro</i> entre J1 et J5 .....	- 95 -
1. Dégradation de l'azote et des glucides .....	- 95 -
a. Résultats .....	- 95 -
b. Discussion .....	- 96 -
2. Biohydrogénation .....	- 97 -
a. Résultats .....	- 97 -
b. Discussion .....	- 98 -
E. Comparaison des activités enzymatiques <i>in vitro</i> entre J1 et J5 .....	- 99 -
1. Dégradation de l'azote et des glucides .....	- 99 -
a. Résultats .....	- 99 -
b. Discussion .....	- 100 -
2. Biohydrogénation .....	- 101 -
a. Résultats .....	- 101 -

b. Discussion .....	- 102 -
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>- 103 -</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>- 109 -</b>

## Table des abréviations

ADF : acid detergent fiber  
ADL : acid detergent lignin  
AG : acide gras  
AGI : acide gras insaturé  
AGS : acide gras saturé  
AGV : acide gras volatil  
ANP : azote non protéique  
ATP : adenosine tri-phosphate  
BNI : blanc non incubé  
C2 : acide acétique  
C3 : acide propionique  
C4 : acide butyrique  
CB : cellulose brute  
CLA : acide linoléique conjugué  
CLnA : acide linoléique conjugué  
FID : détecteur à ionisation de flamme  
MS : matière sèche  
NH<sub>3</sub> : ammoniac  
C18:0 : acide stéarique  
c9c12-C18:2 : acide linoléique  
c9c12c15-C18:3 : acide  $\alpha$ -linoléique  
c9t11-C18:2 : acide ruménique  
ENA : extractible non azoté  
ECTM : écart type à la moyenne  
MAT : matière azotée totale  
MB : matière brute  
MG : matière grasse  
Mm : cendre brute

NDF : neutral detergent fiber

NFC : non fibrous carbohydrate

OBCFA : acide gras à chaîne impaire et/ou ramifiée, ou « Odd- and branched-chain fatty acids »

Rusitec : rumen simulation technique

t11-C18:1 : acide transvaccénique

## Table des figures

<b>Figure 1</b> : Anatomie des réservoirs gastriques des ruminants (d'après 61). .....	- 21 -
<b>Figure 2</b> : Conformation externe des compartiments gastriques, face droite (d'après 3). ...	- 23 -
<b>Figure 3</b> : Conformation interne des compartiments gastriques (d'après 3). .....	- 24 -
<b>Figure 4</b> : Evolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction ruminiaux (d'après 42). .....	- 29 -
<b>Figure 5</b> : Comparaison des méthodes de Weende et de Van Soest pour le dosage des glucides végétaux. ....	- 41 -
<b>Figure 6</b> : La dégradation et l'utilisation des glucides par les bactéries ruminales.....	- 43 -
<b>Figure 7</b> : La biohydrogénation des acides $\alpha$ -linoléique et linoléique. ....	- 48 -
<b>Figure 8</b> : Le métabolisme ruminal de l'azote. ....	- 57 -
<b>Figure 9</b> : Schéma général du Rusitec (d'après 7). ....	- 64 -
<b>Figure 10</b> : Dual Flow Continuous Culture System (24). ....	- 66 -
<b>Figure 11</b> : Extraction méthylation des acides gras. ....	- 80 -
<b>Figure 12</b> : Chromatographie en phase gazeuse - méthodes de passage. ....	- 81 -
<b>Figure 13</b> : Détail des calculs des valeurs des OBCFA, des CLA, des C18:1t, des T11 et des T10. ....	- 82 -
<b>Figure 14</b> : Modèle statistique utilisé .....	- 83 -
<b>Figure 15</b> : Evolution du pH et des concentrations en AGV totaux et en NH <sub>3</sub> pendant les cultures. ....	- 94 -
<b>Figure 16</b> : Evolution du pH et des concentrations en C2, C3 et C4 pendant les cultures. ....	- 94 -

Table des tableaux
--------------------

<b>Tableau 1</b> : Substrats et produits des principales espèces bactériennes du rumen .....	- 31 -
<b>Tableau 2</b> : Influence de la nature de la ration sur les proportions molaires en AGV dans le rumen (valeurs moyennes durant les 5 heures après le repas). .....	- 44 -
<b>Tableau 3</b> : Teneurs en MG et AG majoritaires des principaux aliments utilisés chez les ruminants.....	- 46 -
<b>Tableau 4</b> : Composition chimique des substrats utilisés. ....	- 72 -
<b>Tableau 5</b> : Profils en acides gras des substrats utilisés.....	- 72 -
<b>Tableau 6</b> : Composition de la solution tampon .....	- 73 -
<b>Tableau 7</b> : Composition du PASSIO® VL 3L. ....	- 73 -
<b>Tableau 8</b> : Quantités initiales en glucides, protéines, matières grasses et acides gras apportées par le mélange de son et de graines de Soja.....	- 75 -
<b>Tableau 9</b> : Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon, entre les études in sacco et in vitro, de 8h à J1.....	- 84 -
<b>Tableau 10</b> : Comparaison des quantités finales en AG et du pourcentage de disparition du c9c12-C18:2, entre les études in sacco et in vitro, de 8h à J1.....	- 87 -
<b>Tableau 11</b> : Comparaison des profils d'AG entre les études in sacco et in vitro, de 8h à J1. ....	- 88 -
<b>Tableau 12</b> : Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon, entre les in vitro d'une durée de 3 h à J1, sans ou après traitement de 5h au chloramphénicol... -	90 -
<b>Tableau 13</b> : Comparaison des profils d'AG entre les études in vitro d'une durée de 3 h à J1, sans ou après traitement de 5h au chloramphénicol.....	- 92 -
<b>Tableau 14</b> : Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon des in vitro de 8h, entre J1 et J5. ....	- 96 -
<b>Tableau 15</b> : Comparaison des pH, des pourcentages de disparition du c9c12-C18:2 et des quantités initiales et finales de c9c12-C18:2, d'OBCFA, de T10 et de T11, des in vitro de 8h, entre J1 et J5.....	- 98 -
<b>Tableau 16</b> : Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon, des in vitro de 3h, après traitement au chloramphénicol, entre J1 et J5. ....	- 100 -

**Tableau 17 :** Comparaison du pH et des quantités initiales et finales de c9c12-C18:2, d'OBCFA, de T10 et de T11, des in vitro de 8h, après traitement au chloramphénicol, entre J1 et J5. .... - 101 -

## Introduction

Les ruminants sont des herbivores dont une des principales particularités anatomiques est la présence de pré-estomacs non sécrétants. Le plus vaste et le plus important de ces pré-estomacs est le réticulo-rumen. En effet, il réunit des conditions physico-chimiques particulières permettant l'existence et le fonctionnement d'un microbiote spécifique. Cette symbiose offre aux ruminants la possibilité de tirer parti des constituants lignocellulosiques des parois végétales.

Le rumen joue donc un rôle clé dans la physiologie digestive des ruminants. L'étude de son fonctionnement est essentielle à la maîtrise de la nutrition de ces animaux d'élevage afin d'optimiser les bilans économiques des élevages ainsi que la qualité des produits d'origine animale pour le consommateur humain.

De nombreuses méthodes d'étude *in vivo* ont été mises au point et ont recours à l'expérimentation animale d'où la nécessité de développer des méthodes alternatives *in vitro*.

L'objectif de notre étude est de mettre au point une culture de contenu ruminal de 96h avec renouvellement de substrat toutes les 12h : cette méthode permettra d'étudier les effets à longs termes de traitements sur les digestions microbiennes ruminales, les études actuelles étant limitées à 24h en culture « batch ».

Dans un premier temps nous présenterons une brève synthèse bibliographique afin de décrire précisément les caractéristiques anatomiques et physicochimiques du rumen, son microbiote, ainsi que les différentes méthodes disponibles pour son étude. Puis nous décrirons le protocole expérimental retenu dans cette étude et les résultats obtenus seront discutés.

PREMIERE PARTIE :  
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

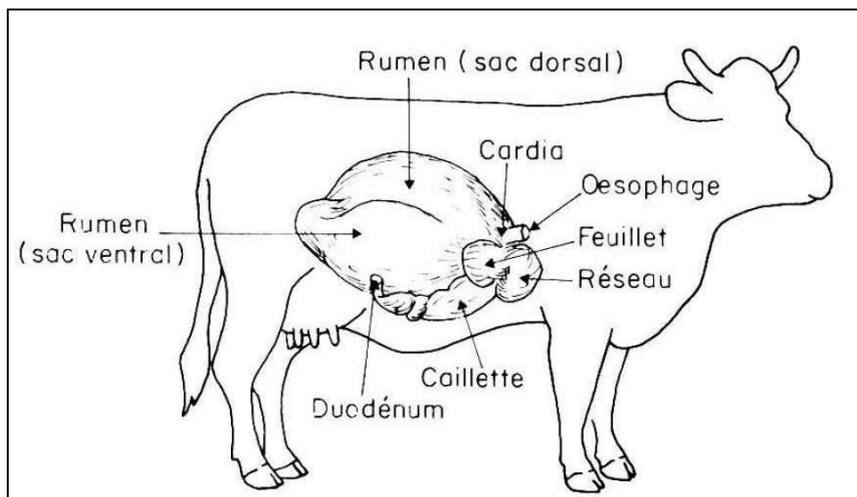


## I. LE RUMEN ET SON ECOSYSTEME MICROBIEN

### A. Particularité anatomo-physiologique du tube digestif des ruminants

#### 1. Anatomie de l'estomac des ruminants (56)

Les ruminants possèdent trois pré-estomacs : le réseau et le rumen, formant le réticulo-rumen, et le feuillet. Ces trois derniers précèdent un estomac sécrétant comparable à l'estomac des monogastriques : la caillette. Cet ensemble est très volumineux : il représente environ les deux tiers de la cavité abdominale et est représenté dans la figure 1.



**Figure 1** : Anatomie des réservoirs gastriques des ruminants (d'après 61).

#### a. Le réticulo-rumen

##### i. Conformation externe (figure 2)

Le réseau est le plus petit et le plus crânial des pré-estomacs. Il a la forme d'un sac aplati dont la face diaphragmatique est moulée sur le diaphragme. L'œsophage est abouché dorsalement au réseau. Ce dernier est prolongé dorsalement par le rumen (ou panse).

Le rumen est un vaste sac bilobé, allongé d'avant en arrière et légèrement aplati d'un côté à l'autre. Il est situé dans les parties gauche et ventrale de l'abdomen. Il existe des sillons sur la surface du rumen contenant du tissu adipeux, des nœuds lymphatiques et des vaisseaux sanguins. Ils subdivisent le rumen en deux sacs superposés (ventral et dorsal). Ces derniers sont prolongés par deux culs-de-sac caudaux. Un atrium est situé entre le sac ventral et le réseau.

#### ii. Conformation interne (figure 3)

La conformation interne est le reflet de la conformation externe. Aux sillons correspondent les plis qui portent le même nom. Le pli rumino-réticulaire délimite l'ostium rumino-réticulaire. Le pilier crânial résulte de l'adossement de l'atrium sur le sac ventral. Le pilier caudal délimite les deux culs-de-sac. La muqueuse du rumen est couverte de papilles aplaties (de 2 mm à 2 cm) dont la distribution est le reflet de la stratification des ingesta (par exemple elles sont plus hautes dans les zones en contact avec des liquides : l'atrium, le sac ventral et les deux culs-de-sac). Le cul-de-sac dorsal en est dépourvu. Les papilles sont kératinisées mais l'épithélium est fin et très vascularisé. Les papilles ont pour principal rôle d'absorber les acides gras volatils (AGV), produits des fermentations microbiennes.

La muqueuse du réseau est soulevée en crêtes réticulaires qui délimitent des alvéoles (ou cellules) de forme polygonale. Ces dernières sont elles-mêmes divisées par des crêtes secondaires ou tertiaires, moins hautes. Le sillon réticulaire (ou gouttière œsophagienne) est une dépression bordée de deux lèvres musculeuses d'environ 15 à 20 cm. Le fond du sillon réticulaire relie le cardia, placé sur le plafond de l'atrium, à l'orifice réticulo-omasique. Ce sillon permet de court-circuiter le rumen. Chez le veau, le lait ingéré passe donc directement de l'œsophage au feuillet.

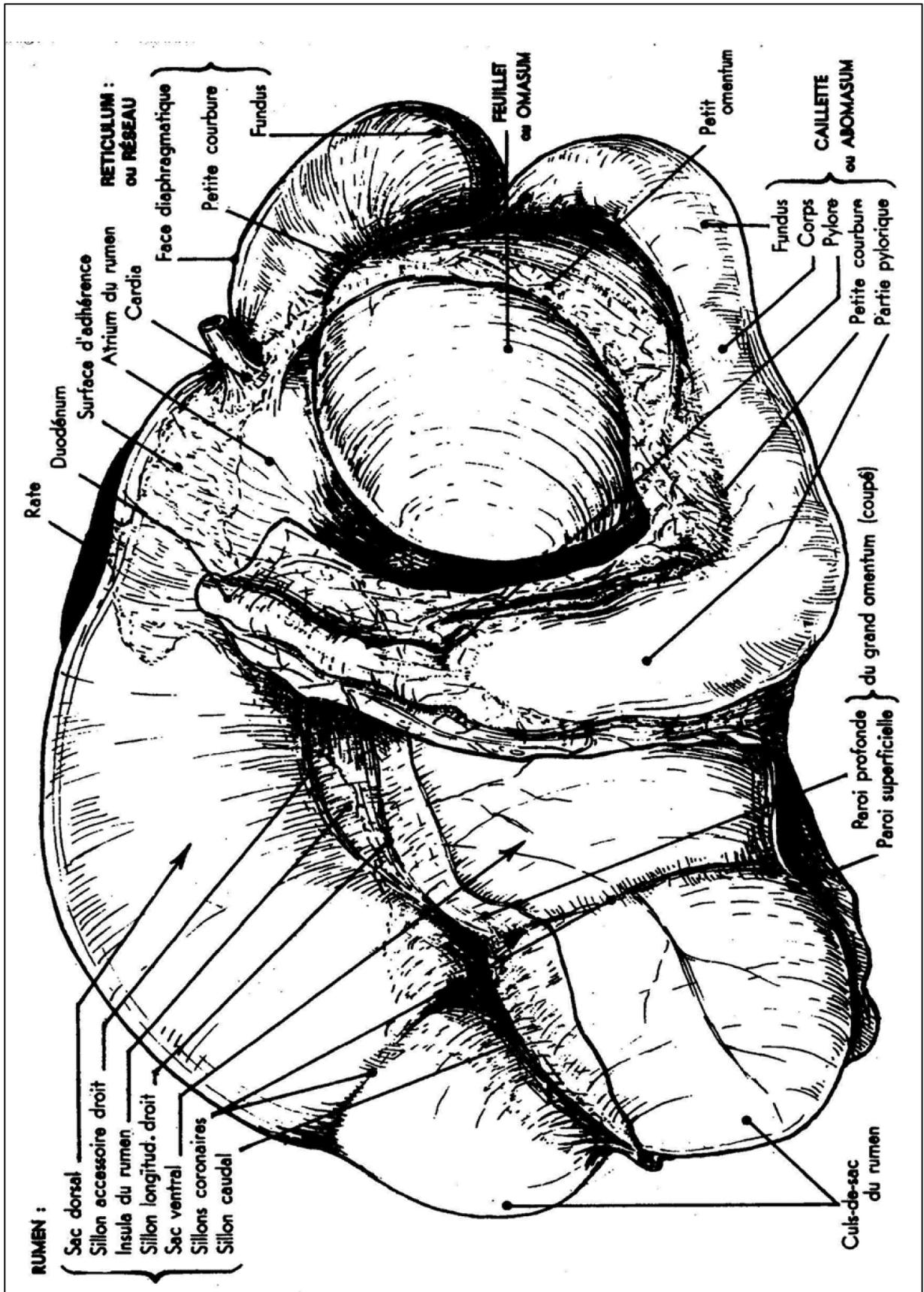
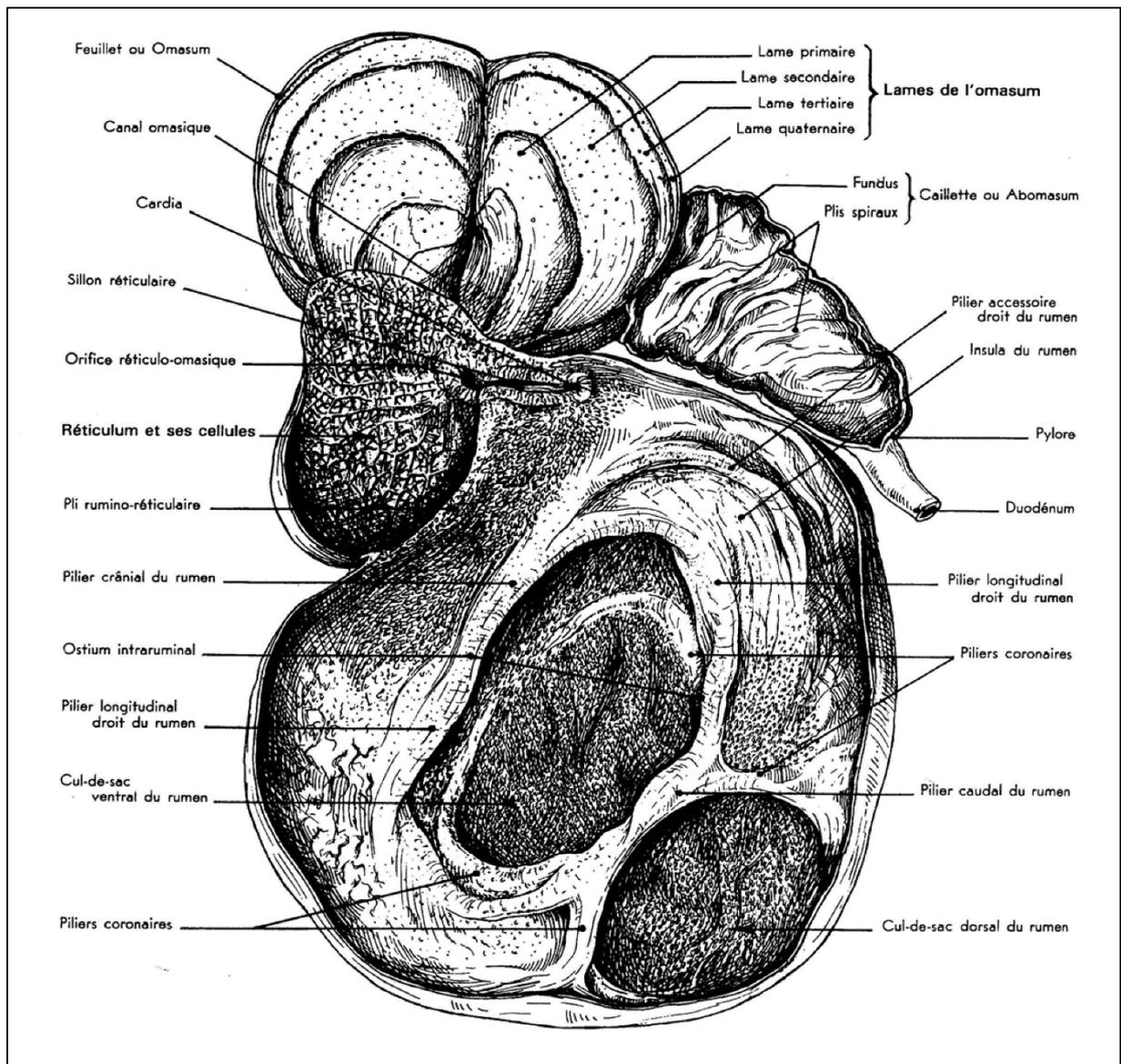


Figure 2: Conformation externe des compartiments gastriques, face droite (d'après 3).



**Figure 3 :** Conformation interne des compartiments gastriques (d'après 3).

## b. L'omasum

### i. Conformation externe (figure 2)

L'omasum (ou feuillet) est le dernier pré-estomac. Il est placé entre le rumen et la caillette. Il a la forme d'un ballon rond légèrement aplati. Sa face viscérale est accolée au rumen. Sa face pariétale est tournée à droite et en avant.

## ii. Conformation interne (figure 3)

Le feuillet est presque entièrement occupé par des lames parallèles, de hauteurs inégales, disposées dans le sens du transit alimentaire. Il existe une quinzaine de lames primaires, entre lesquelles s'intercalent des lames secondaires, tertiaires et quaternaires. Entre ces lames on retrouve des aliments très fins et secs. Le canal du feuillet a un contenu liquidien. L'orifice omaso-abomasal est plus large que l'orifice réticulo-omasal. L'épithélium de la muqueuse du feuillet est de même nature que celui du rumen. Cette muqueuse correspond à une surface d'absorption supplémentaire.

## c. L'abomasum

### i. Conformation externe (figure 2)

L'abomasum (ou caillette) est sécrétant. Il est comparable à l'estomac des monogastriques. Il est en forme de poire et est disposé longitudinalement, à droite du rumen. Sa face viscérale est en contact avec le sac ventral et l'atrium, sa face pariétale est en contact avec le plancher de la paroi abdominale.

### ii. Conformation interne (figure3)

L'abomasum est tapissé par une muqueuse peptique. Celle-ci est plus épaisse dans la partie pylorique que dans la partie fundique. L'orifice pylorique est légèrement plus étroit que l'orifice omaso-abomasique.

Le reste du tube digestif est comparable à celui des monogastriques. On retrouve l'intestin grêle et le gros intestin. Cet ensemble mesure environ 50 m chez le bovin adulte. Les trois portions de l'intestin grêle sont le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le gros intestin est composé du cæcum, du côlon et du rectum.

## 2. Motricité du complexe gastrique (40)

Le réticulorumen est un fermenteur anaérobie où la digestion microbienne se déroule en continu. Les mouvements de ces deux réservoirs brassent la masse alimentaire et facilitent son ensemencement bactérien. Ces mouvements participent également à la régurgitation physiologique du bol alimentaire qui va pouvoir être à nouveau mastiqué et insalivé : c'est la rumination. Ensuite, ils permettent la vidange vers l'omasum. Puis ils contribuent à l'élimination des gaz de fermentation : c'est l'éructation.

Ces contractions sont contrôlées par le système nerveux central et notamment via le nerf vague. En effet, une suppression des efférences vagales va engendrer des contractions moins amples et plus fréquentes, dites intrinsèques. Ces dernières sont liées au fonctionnement du système nerveux myentérique. Chez l'espèce bovine la paroi du réticulorumen se contracte pendant 15 à 20 secondes, toutes les minutes environ.

Dans le réticulo-rumen, il existe deux types de cycles de contractions, primaire et secondaire. Le cycle primaire correspond tout d'abord à une contraction biphasique du réseau puis du sac dorsal dans le sens cranio-caudal et ensuite du cul de sac ventral dans le sens cranio-caudal. Ce cycle primaire permet le brassage et la vidange du rumen. Le cycle secondaire suit le cycle primaire toutes les 1 à 3 fois (suivant l'importance des fermentations). Ce cycle commence par une contraction du sac ventral postérieur puis une contraction simultanée du sac dorsal antérieur et du sac ventral antérieur. Ce cycle permet l'éructation.

La rumination est permise par une contraction isolée du réseau avant la contraction biphasique du cycle primaire. La rumination s'effectue par périodes, dont la durée peut être très variable (quelques minutes à quelques heures).

Ainsi, le réticulorumen est un vaste fermenteur animé de mouvements qui vont faciliter les fermentations microbiennes.

## B. Conditions physico-chimiques dans le réticulo-rumen

Nous allons maintenant nous intéresser au contenu du réticulorumen. Nous étudierons d'abord les différentes phases de son contenu, puis nous décrirons certains paramètres chimiques qui permettent la survie et la multiplication d'un microbiote.

### 1. Les différentes phases du contenu ruminal

Le rumen a un volume moyen d'environ 150 L, dont 90 L de digesta (29). Ce contenu n'est pas réparti de façon homogène dans le rumen : en partie ventrale on retrouve la phase liquide, en partie intermédiaire la phase solide et en partie dorsale la phase gazeuse.

#### a. La phase liquide

Cette phase a pour origine l'abreuvement (50 à 100L par jour), la salivation (80 à 200L par jour) et l'eau contenue dans les aliments (19, 26). L'eau est le constituant principal du contenu ruminal (85%), et se trouve principalement dans la phase liquide dans laquelle flottent de fines particules en suspension (particules alimentaires ou bactéries) et des molécules en solution (sels minéraux, petites molécules organiques). Cette phase liquide permet l'imbibition des aliments. L'eau est également essentielle aux réactions d'hydrolyse des polymères organiques.

#### b. La phase solide

La matière sèche (MS) de l'ensemble du contenu du rumen est de l'ordre de 15%. Celle-ci se concentre dans un amas fibreux en partie dorsale du rumen et a pour origine l'ingestion d'aliments. Une vache laitière en début de lactation peut ingérer entre 15 et 25 kg de MS (26).

### c. La phase gazeuse

Cette phase est située entre l'amas fibreux de la phase solide et le plafond du rumen. Sa composition résulte des entrées d'air au moment de la déglutition, de la diffusion de gaz depuis les capillaires sanguins (en très grand nombre dans la muqueuse ruminale) et des activités microbiennes.

Elle est composée de dioxyde de carbone (65%), de méthane (25 à 30%), de diazote (5%), de dihydrogène (1 à 2%) et de traces de dioxygène (28).

La majeure partie de ces gaz est éliminée par l'éruktion.

## 2. Le pH

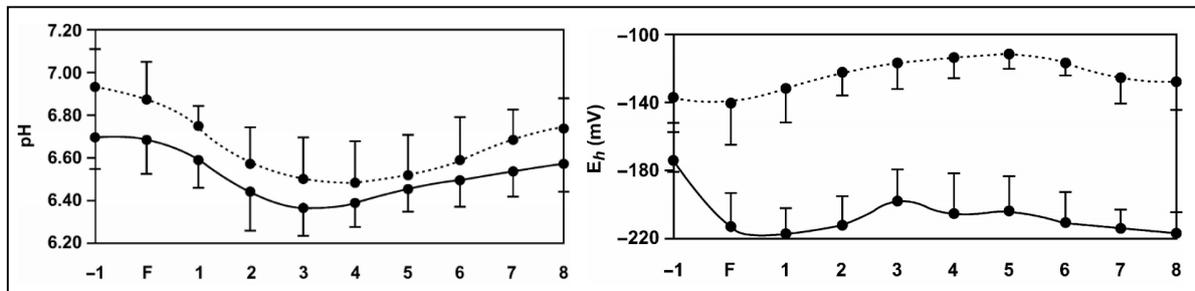
Le pH ruminal est normalement compris entre 5,5 et 7. Ce pH est la résultante d'un équilibre entre des acides faibles et des bases faibles. Les principaux acides sont les AGV et l'acide lactique, produits des fermentations microbiennes. Les principales bases sont l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), le bicarbonate et le phosphate. Le  $\text{NH}_3$  est le produit de la protéolyse, il peut également diffuser au travers de la paroi du rumen. Le bicarbonate et le phosphate sont principalement sécrétés par les glandes salivaires et jouent un rôle de tampon (53).

La figure 4 montre les variations du pH avant, pendant et après le repas. Dans les premières heures après le repas, les AGV produits par le microbiote vont abaisser le pH. Puis ce dernier remonte car les AGV sont absorbés par la muqueuse ruminale et car la rumination induit l'arrivée de salive.

## 3. Le potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel d'oxydo-réduction ruminal est toujours très nettement négatif (-150 à -250 mV) car le rumen est un milieu anaérobie réducteur. Les variations du potentiel d'oxydo-réduction après le repas sont illustrées dans la figure 4 : celui-ci augmente dans les heures suivant le repas (avec l'entrée d'oxygène pendant le repas et la rumination) et diminue ensuite. En effet, en conditions physiologiques, le potentiel d'oxydo-réduction est rapidement corrigé

par une partie du microbiote ruminal qui utilise le peu d'oxygène disponible. Il existe ainsi un gradient de potentiel d'oxydoréduction entre la surface et la profondeur. La consommation de dioxygène est si rapide que sa pénétration dans la masse digestive ne dépasse pas 0,5 cm (53).



**Figure 4 :** Evolution du pH et du potentiel d'oxydoréduction ruminiaux (d'après 42).

En abscisse : temps après le repas (h) ; en trait discontinu : échantillonnage à la main ; en trait continu : échantillonnage automatisé

#### 4. La température

La température du réticulorumen est comprise entre 39 et 41°C, soit environ 1°C au-dessus de la température corporelle. Elle augmente en fonction de l'intensité des fermentations ruminales et est donc maximale dans les heures suivant le repas. L'abreuvement peut faire chuter la température ruminale de 5 à 10°C, un délai de deux heures est nécessaire afin de retrouver la température initiale (53).

Ainsi le pH, le potentiel d'oxydoréduction, et la température ruminiaux permettent d'estimer l'intensité des fermentations ruminales.

Le rumen abrite donc des conditions physico-chimiques très particulières. Ces dernières permettent le développement d'un microbiote anaérobie très actif.

## C. Le microbiote

Le rumen accueille un microbiote diversifié : environ 200 espèces de bactéries ( $10^{10}$  à  $10^{11}$  bactéries par mL), des protozoaires (de  $10^4$  à  $10^6$  par mL) et des champignons (entre  $10^3$  et  $10^5$  zoospores par mL). On trouve également entre  $10^7$  et  $10^9$  particules de virus bactériophages par mL (39).

### 1. Les bactéries

Les bactéries présentes dans le rumen d'une vache laitière de 600 kg représentent environ 2 kg de MS, cela correspond à un peu plus de la moitié de la biomasse microbienne (25). Les trois quarts de ces bactéries sont fixées sur des particules alimentaires. Elles sont constamment éliminées par prédation des protozoaires ruminiaux ou évacuées vers le feuillet et le reste du tube digestif. Néanmoins, ces pertes sont compensées par une croissance régulière de la population bactérienne.

Cette population est de loin la plus active. Les bactéries du rumen sont généralement classées selon leur capacité à dégrader certains substrats et à les utiliser pour leur survie. Néanmoins, les bactéries pouvant dégrader plusieurs types de substrats, certaines espèces peuvent se retrouver dans plusieurs catégories. Nous verrons dans un premier temps les bactéries dégradant les glucides, puis celles dégradant les protéines et enfin celles intervenant dans le métabolisme des lipides. Le tableau 1 résume les substrats et les produits des activités des principales espèces bactériennes ruminales.

Espèce	Hydrolyse						Substrat de fermentation						Produit de fermentation										
	Cellulose	Hémicellulose	Pectine	Amidon	Protéine	Lipide	Cellobiose	Maltose	Saccharose	Glucose	Galactose	Fructose	Pentose	Acides aminés	Lactate	Formate	Acétate	Propionate	Butyrate	Ethanol	Lactate	Dihydrogène	Dioxyde de carbone
<i>F. succinogenens</i>	+		+				+		+						+	+							
<i>R. albus</i>	+	+	+				+						+							+	+	+	+
<i>R. flavefaciens</i>	+	+	+				+						+							+	+	+	+
<i>B. fibrisolvans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					+	+	+	+	+
<i>P. ruminicola</i>		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+					
<i>S. bovis</i>			+	+	+		+	+	+	+	+	+					+					+	
<i>R. amylophilus</i>				+	+			+							+	+				+			
<i>S. amylolytica</i>					+			+		+						+	+						
<i>S. ruminantium</i>				+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+					+	

**Tableau 1** : Substrats et produits des principales espèces bactériennes du rumen (d'après 11).

a. Les bactéries dégradant les glucides (11)

Deux types de substrats glucidiques sont dégradés par les bactéries : les glucides pariétaux (la cellulose, les hémicelluloses et la pectine, toutes trois issues des parois végétales) et les glucides cytoplasmiques : l'amidon et les sucres solubles. Une autre molécule est à la fois un produit des fermentations des glucides et un substrat pour ces bactéries : le lactate.

i. Les bactéries dégradant les glucides pariétaux

Les principales espèces fibrolytiques sont *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Butyvirbio fibrisolvans*. Ces bactéries adhèrent aux particules fibreuses et synthétisent des enzymes actives sur les glucides pariétaux. Cette

population se développe mieux avec un pH supérieur ou égal à 6,5 et elle produit principalement de l'acide acétique (C2) et de l'acide butyrique (C4).

*F. succinogenes* dégrade principalement la cellulose et elle produit majoritairement du C2, mais aussi de l'acide succinique et de l'acide formique.

*R. albus* et *R. flavefaciens* utilisent surtout la cellulose, les hémicelluloses et la pectine. Elles produisent essentiellement du C2 mais également de manière variable du dihydrogène, de l'éthanol, de l'acide formique, de l'acide lactique et de l'acide succinique.

Ces trois bactéries représentent de 0,3 à 4 % de la population microbienne totale (71).

*B. fibrisolvans* digère moins bien la cellulose que les bactéries précédentes (environ 5 fois moins). Selon la souche, elle dégrade une très large gamme d'autres glucides. Elle produit du C4, du dihydrogène, du dioxyde de carbone, de l'acide formique, du lactate, de l'éthanol et de faibles quantités de C2.

*Prevotella ruminicola* peut dégrader les hémicelluloses. Cependant ses principaux substrats sont l'amidon et les sucres. Elle produit de l'acide succinique, de l'acide formique, du C2 et de l'acide propionique (C3).

## ii. Les bactéries dégradant les glucides cytoplasmiques et le lactate

Certaines bactéries fibrolytiques sont également amylolytiques : c'est le cas de quelques souches de *B. fibrisolvans*. D'autres bactéries sont plus spécialisées : *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinomonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantium* et *P. ruminicola*. Elles produisent des quantités de C3 plus élevées et prolifèrent à des pH inférieurs à 6.

*S. bovis* dégrade principalement l'amidon ainsi que de nombreux sucres solubles. Elle se développe quand le potentiel d'oxydoréduction augmente. Son pH de croissance est de 4,5 à 6,7. Elle peut produire dans certains cas de grandes quantités de lactate ainsi que du C2.

*R. amylophilus* dégrade l'amidon ainsi que le maltose. Elle produit de l'acide formique, du C2, de l'acide succinique et de faibles quantités d'éthanol.

*S. amylolytica* transforme l'amidon, le maltose et le galactose en acide succinique et en de faibles quantités de C2 et de C3.

*S. ruminantium* a un pH de croissance de 4,3 à 4,4 et utilise l'amidon ainsi que les sucres pour les transformer en acide lactique, en C2 et en C3. Certaines souches peuvent également utiliser le lactate.

Concernant les sucres solubles, de nombreuses bactéries fibrolytiques et amylolytiques peuvent les fermenter.

Les bactéries amylolytiques peuvent vite proliférer avec des rations riches en glucides rapidement fermentescibles (sucres et amidon) et produire des AGV en grande quantité et notamment du C3. On assiste alors à une baisse du pH. Cela provoque une sélection de certaines bactéries dont les lactobacilles et donc une augmentation de la production en lactate (entraînant une plus forte diminution du pH). Les bactéries utilisant le lactate ont alors un rôle clé afin de rééquilibrer le pH ruminal : c'est le cas de *Veillonella alcalescens*, *Megasphaera elsdenii* et de certaines souches de *S. ruminantium*.

#### b. Les bactéries protéolytiques

Il n'existe pas de bactérie protéolytique stricte : ce sont en grande partie les bactéries amylolytiques (et certaines bactéries fibrolytiques) qui exercent cette fonction. Près de la moitié des souches bactériennes du rumen possèdent ainsi une activité protéolytique (16). Cette activité concerne la majeure partie des protéines solubles ainsi qu'une part non négligeable des protéines insolubles (70).

Les espèces ayant une activité protéolytique intense sont *R. amylophilus*, *P. ruminicola*, *B. fibrisolvans* et *S. ruminantium* (11). Les peptides produits par la protéolyse sont rapidement dégradés dans le rumen. Les acides aminés sont ensuite en grande partie désaminés pour donner du NH<sub>3</sub> par *P. ruminicola*, *S. ruminantium* et *M. elsdenii*. La grande variété d'enzymes impliquées dans la dégradation des protéines est une illustration de l'activité synergique entre les différentes espèces du microbiote (70).

#### c. Les bactéries agissant dans le métabolisme des lipides

Les lipides sont soumis à deux types de réaction qui s'enchaînent : la lipolyse des esters d'acides gras (AG) suivie par la biohydrogénation des acides gras insaturés (AGI) en acides gras saturés (AGS).

La lipolyse des triglycérides est principalement réalisée par *Anaerovibrio lipolytica*. En effet cette dernière possède une lipase (23) capable d'hydrolyser les triglycérides en AG libres et en glycérol. Cependant, cette enzyme n'est pas efficace sur les galactolipides et les phospholipides. Leurs hydrolyses peuvent néanmoins être réalisées par une estérase, synthétisée par certaines bactéries appartenant au genre *Butyvirbio* (22).

La biohydrogénation des AG (notamment à 18 carbones) est complexe : elle se divise en plusieurs étapes successives d'isomérisations et de réductions et elle nécessite l'intervention de plusieurs enzymes synthétisées par des bactéries différentes. Selon Kemp et Lander (33), on peut regrouper les bactéries participant à l'hydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique (c9c12c15-C18:3) et de l'acide linoléique (c9c12-C18:2) en 2 groupes. Le groupe A, contenant notamment *B. fibrisolvens*, peut réaliser les deux premières étapes de la biohydrogénation. Le groupe B, contenant *Butyvirbio hungatei* et *Butyvirbio proteoclasticus* peut intervenir dans toutes les étapes jusqu'à l'obtention de l'acide stéarique (C18:0). Ainsi il y a moins de bactéries capables de réaliser l'hydrogénation finale, cela expliquerait sa lenteur et l'accumulation de produits intermédiaires.

## 2. Les protozoaires

Les protozoaires ruminiaux sont des organismes eucaryotes unicellulaires microscopiques. Ils sont de taille variable : 20 à 150 $\mu$ m (16). Ils sont ainsi 20 à 100 fois plus grands que les bactéries mais 10<sup>4</sup> fois moins nombreux (29). Ils peuvent représenter jusqu'à 40% de la biomasse microbienne (16). Les protozoaires ne peuvent pas être cultivés sur des milieux entièrement synthétiques pendant de longues durées car ils sont plus exigeants que les bactéries en termes de conditions physico-chimiques du milieu et en besoins nutritionnels (29). La plupart des protozoaires sécrètent des enzymes (protéolytiques, cellulolytiques, amylolytiques) participant à la digestion des particules ingérées (29).

Les protozoaires sont mobiles grâce à des organites spécialisés : des flagelles ou des cils, permettant de distinguer les flagellés et les ciliés.

Les connaissances des flagellés sont encore limitées. Leur concentration peut être importante (jusqu'à  $10^4$ /mL) mais leur contribution aux activités microbiennes est considérée comme négligeable (16).

Les ciliés sont en plus grand nombre que les flagellés dans le rumen. Leur concentration peut atteindre  $10^5$  à  $10^6$  par mL. Cela représente jusqu'à 1 kg de MS dans le rumen d'un bovin adulte. Les ciliés sont soit fixés sur des particules alimentaires, soit dans la phase liquide (29). Ils sont composés de deux groupes, appartenant tous les deux à la classe des *Vestibulifera* :

- les entodiniomorphes : ordre des *Entodiniomorphida*, famille des *Ophryoscolecidae* (31)
- les holotriches : ordre des *Trichostomatida*, sous-ordre des *Trichostomatina*, famille des *Isotrichidae* (31)

Les entodiniomorphes ont de fortes capacités à ingérer des particules solides en suspension (grains d'amidon, chloroplastes, fibres celluloses) à l'aide de leurs cils. Ces particules sont alors transportées à travers le vestibule jusqu'au cytostome. Les holotriches sont plutôt spécialisés dans l'absorption de composés solubles tels que les sucres solubles (31).

Ainsi, certains protozoaires (notamment les holotriches) dégradent rapidement l'amidon et les sucres solubles. Une partie des produits de cette dégradation est stockée sous forme de glucides de structure intermédiaire entre le glycogène et l'amylopectine. Certains entodiniomorphes sont particulièrement efficaces pour digérer la cellulose : les fibres sont acheminées dans des vacuoles dans lesquelles sont sécrétées des enzymes cellulolytiques (29).

Les ciliés du rumen ont une activité protéolytique moins efficace que les bactéries, mais contrairement à ces dernières, ils dégradent en majorité des protéines insolubles. Ils ont également une activité de désamination importante (29).

Les protozoaires peuvent éliminer les bactéries et récupérer les acides aminés, les peptides et les acides nucléiques bactériens pour les incorporer dans leur propre organisme (29).

### 3. Les champignons

Les champignons correspondent à environ 8% de la biomasse microbienne. Trois genres ont été identifiés : *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Caecomyces*. Les zoospores se fixent sur des tissus végétaux. Ils sont alors au stade végétatif. Un système rhizoïdal se développe dans les tissus végétaux tandis que le sporange se développe à l'extérieur et peut ainsi libérer de nouvelles zoospores qui iront coloniser d'autres tissus.

Ces champignons sécrètent de nombreuses enzymes intervenant dans la digestion des glucides pariétaux. Ils ont une activité protéolytique faible. Leur contribution à la dégradation des glucides cytoplasmiques est peu connue. Cependant, ils peuvent fermenter la plupart des mono- et disaccharides. Les produits terminaux sont le lactate, le formate, le C<sub>2</sub>, le dihydrogène, le dioxyde de carbone et l'éthanol (29).

Le rumen est donc un fermenteur présentant des conditions physico-chimiques particulières qui permettent la multiplication d'un microbiote anaérobie. Il permet ainsi aux ruminants de tirer parti des fibres végétales. Nous allons maintenant nous intéresser aux processus de dégradation des principaux aliments.

## II. DIGESTION DES ALIMENTS D'ORIGINE VÉGÉTALE PAR LES MICROORGANISMES RUMINAUX

### A. Digestion des glucides alimentaires

#### 1. Les glucides des végétaux

Les glucides peuvent se classer en deux catégories selon leur répartition dans la cellule végétale. La première catégorie correspond aux glucides cytoplasmiques : ils sont contenus à l'intérieur de la cellule végétale et ils sont les substrats ou les intermédiaires du métabolisme cellulaire des glucides et des glucides de réserve. La seconde correspond aux glucides pariétaux : on ne les retrouve que dans les aliments d'origine végétale ; ils sont les constituants de la paroi végétale.

Les glucides peuvent être séparés en deux autres catégories selon leur taille et leur solubilité : les oligosaccharides et les polyholosides. Les oligosaccharides sont composés d'un nombre déterminé d'oses, ils sont hydrosolubles (notamment les oses et les diholosides). Les polyholosides, association d'un très grand nombre d'oses par liaisons O-glucosidiques, sont insolubles.

#### a. Les glucides cytoplasmiques

Les glucides cytoplasmiques comprennent les glucides hydrosolubles et les polyholosides de réserve (amidon). Ces glucides peuvent être hydrolysés par les enzymes sécrétées par le tube digestif. Ils peuvent être dosés de façon spécifique avec des méthodes de colorimétrie après extraction.

#### i. Les glucides hydrosolubles

Les glucides hydrosolubles comprennent les oses et les diholosides : ils contribuent directement au métabolisme de la cellule végétale.

Pour les oses, on peut retrouver des pentoses (dont le fructose) ou des hexoses (dont le glucose) dans les vacuoles de la cellule végétale. Ces glucides sont des intermédiaires du métabolisme de la cellule végétale (27).

Concernant les diholosides, le saccharose est un constituant important de la sève élaborée : il est une forme de transport du carbone et de l'énergie (27).

## ii. Les glucides de réserve

Le principal glucide de réserve dans les végétaux est l'amidon : il est stocké dans des organes de réserve tels que les grains, les tubercules caulinaires, les racines. L'amidon est un polyholoside constitué de fractions variables d'amylose et d'amylopectine. L'amylose résulte de la polymérisation de molécules de glucose (entre 500 et 20 000) liées par des liaisons de type  $\alpha$  1-4. L'amylopectine est un polymère ramifié en grappe dont la structure est proche de celle du glycogène, c'est-à-dire un polymère de glucose formé par des liaisons de type  $\alpha$  1-4 et  $\alpha$  1-6.

L'amidon est stocké dans les cellules sous forme d'amyloplastes : ceux-ci sont constitués de différentes couches concentriques d'amidon autour d'un hile. L'accumulation des couches successives d'amidon va donner un grain intracellulaire, d'aspect souvent zoné et de forme caractéristique de chaque espèce végétale. Les plastes sont des organites des cellules végétales et à ce titre possèdent une enveloppe externe composée de lipides et de protéines. Ces protéines sont plus ou moins dégradables. Il est ainsi possible de parler d'amidon lent (sorgho, maïs) ou rapide (orge, blé, triticale) en fonction de sa vitesse de dégradation. Les amyloplastes se retrouvent dans les cellules des organes de réserve de la plante.

## b. Les glucides pariétaux

### i. La cellulose

La cellulose est le constituant principal de la paroi végétale, il s'agit d'un polymère de glucose avec des liaisons  $\beta$  1-4. Ces différentes chaînes linéaires sont associées entre elles par des liaisons de type hydrogène pour former des microfibrilles de cellulose (27).

## ii. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses et la cellulose sont systématiquement liées et enchevêtrées pour constituer la base de la paroi végétale. Les hémicelluloses sont moins résistantes à l'hydrolyse que la cellulose et elles ont une composition beaucoup plus variée. Leur hydrolyse peut libérer un pentose (on parle alors par exemple de xylane) ou un hexose (mannanes, galactanes). Les hémicelluloses se différencient de la cellulose par la présence simultanée de liaisons  $\beta$  1-4,  $\beta$  1-3 et  $\alpha$  1-6 (6, 18).

## iii. La lignine

La lignine est une structure polyphénolique. Ce n'est donc pas un glucide. Cependant, de par son importance dans la paroi végétale, elle est souvent classée dans les fibres végétales. La lignine peut incruster l'ensemble cellulose – hémicellulose de façon variable dans la paroi végétale. Elle offre une plus grande résistance aux parois végétales. La teneur en lignine est un facteur limitant à la dégradation des parois végétales car celle-ci n'est pas digestible. Sa teneur augmente avec l'âge de la plante et son développement. L'ensemble cellulose – hémicellulose – lignine constitue les fibres dites insolubles (27).

## iv. Les pectines

Les pectines forment l'ensemble des fibres dites solubles. Ce sont des polymères d'acides uroniques et d'oses. Ce sont principalement des polymères d'acide  $\alpha$ -galacturoniques et de rhamnose liés par des liaisons  $\alpha$ -1-4. Leur hydrolyse est donc rapide (18).

Les glucides pariétaux ne peuvent pas être hydrolysés par les enzymes glycolytiques sécrétées par le tube digestif. En effet ces dernières ont une action  $\alpha$ -glycosidase mais non  $\beta$ -glycosidase. Cependant, ils peuvent être dégradés par les enzymes sécrétées par le microbiote ruminal, capable de produire des  $\beta$ -glycosidases.

## 2. Les méthodes d'évaluation des teneurs en glucides dans les aliments

Il existe plusieurs méthodes pour doser les différentes fractions glucidiques des aliments. Nous détaillerons les méthodes de Weende et de Van Soest.

### a. La méthode de Weende (6)

Cette méthode débute par deux hydrolyses successives suivies de rinçages : une première dans l'acide sulfurique, pendant 30 minutes, à ébullition et une seconde dans la soude, pendant 30 minutes, à ébullition. Puis un lavage à l'acétone est effectué afin d'éliminer la matière grasse (MG). Un séchage à l'étuve à 103°C est réalisé pour obtenir un résidu sec (P1) qui contient la cellulose brute ou cellulose de Weende (CB) et les cendres brutes (Mm). Une incinération à 550°C élimine la CB : on obtient alors P2. Par soustraction (P1 – P2) on obtient une valeur de CB.

Cette méthode permet également d'estimer la teneur en glucides cytoplasmiques en calculant l'extractible non azoté (ENA) :

$$\text{ENA} = \text{MS} - (\text{Mm} + \text{MAT} + \text{MG} + \text{CB})$$

Les mesures de la MG et de la matière azotée totale (MAT) seront développées dans la partie C.

Avec cette méthode, la CB correspond à la totalité de la cellulose vraie ainsi qu'à des fractions variables d'hémicellulose et de lignine. L'ENA représente les glucides cytoplasmiques ainsi qu'une partie des fibres. Cette méthode est donc peu appropriée pour estimer précisément la part de glucides cytoplasmiques (dont l'amidon) dans les aliments riches en fibres.

### b. La méthode de Van Soest (66)

Cette méthode permet de quantifier les quantités respectives d'hémicellulose, de cellulose et de lignine dans un aliment.

L'échantillon est tout d'abord soumis à l'action d'une solution détergente neutre à ébullition. Le résidu correspond au « neutral detergent fibre » (NDF), il représente l'ensemble hémicellulose – cellulose – lignine. L'échantillon est ensuite placé dans une solution détergente acide à ébullition pour obtenir l' « acid detergent fibre » (ADF) qui comprend la cellulose et la lignine. Enfin, l'action de l'acide sulfurique sur l'échantillon permet d'isoler l' « acid detergent lignin » (ADL). Par soustraction on peut estimer les différentes parts d'hémicellulose, de cellulose et de lignine :

$$\text{Hémicellulose} = \text{NDF} - \text{ADF}$$

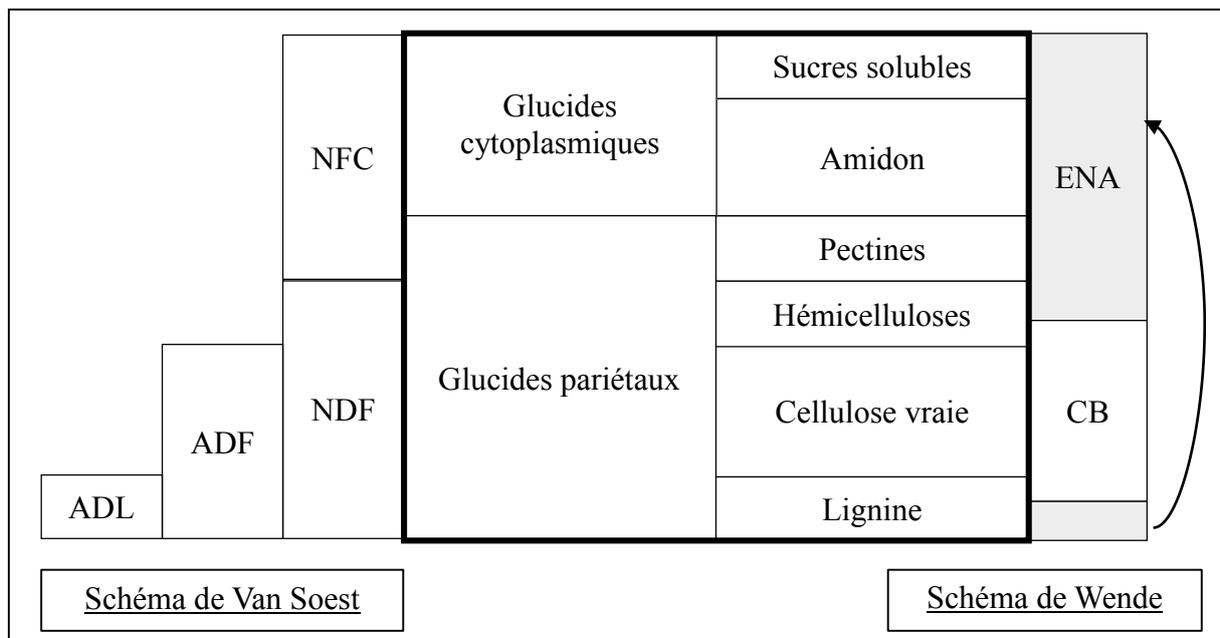
$$\text{Cellulose} = \text{ADF} - \text{ADL}$$

$$\text{Lignine} \approx \text{ADL}$$

La proportion de glucides cytoplasmiques, appelés alors « non fibrous carbohydrates » (NFC), peut être calculée à partir de cette méthode :

$$\text{NFC} = \text{MS} - (\text{Mm} + \text{MAT} + \text{MG} + \text{NDF})$$

Cette méthode est plus longue et plus onéreuse mais elle a l'avantage d'être plus précise et de distinguer les différents constituants des parois végétales. La figure 5 compare ces deux méthodes de dosage des glucides.



**Figure 5 :** Comparaison des méthodes de Weende et de Van Soest pour le dosage des glucides végétaux.

NDF : neutral detergent fibre ; ADF : acid detergent fibre ; ADL : acid detergent lignin ; NFC : non fibrous carbohydrates ; CB : cellulose de Weende ; ENA : extractible non azoté

## a. Adhésion et digestion extracellulaire des glucides alimentaires

### i. Dégradation des fibres

Les bactéries fibrolytiques, les champignons et certains protozoaires sont impliqués et leur action est facilitée par un pH supérieur à 6,5.

Les bactéries vont tout d'abord se fixer aux fibres alimentaires. Les tissus facilement dégradables (ex : parenchyme) sont rapidement colonisés par les bactéries tandis que les tissus peu dégradables (ex : sclérenchyme) le sont moins. Certains protozoaires font de même, cependant, en général, ils ingèrent des petites particules alimentaires en suspension. Les champignons utilisent leur rhizoïde pour pénétrer en profondeur les fragments végétaux (29) ; ils coloniseraient préférentiellement les tissus lignifiés (18).

Les micro-organismes sécrètent de nombreuses hydrolases dans le milieu ruminal. Trois types de cellulases agissent en synergie : une endo  $\beta$  1-4 glucanase, une cellobiosidase et une  $\beta$  -glucosidase. La première attaque la cellulose au hasard pour former des cello-oligosaccharides ; la deuxième attaque l'extrémité non réductrice de la cellulose pour donner des unités de cellobiose et la troisième hydrolyse la cellobiose et les cello-oligosaccharides de faible degré de polymérisation pour donner du glucose (29).

Concernant les hémicelluloses, des xylanases sont retrouvées chez un grand nombre d'espèces bactériennes (18). Les protozoaires et les champignons sécrètent également des hemicellulases et des cellulases (18).

Pour ce qui est de l'hydrolyse des pectines, des enzymes pectinolytiques ont été identifiées chez des bactéries et des protozoaires mais pas chez les champignons (18).

### ii. Digestion de l'amidon

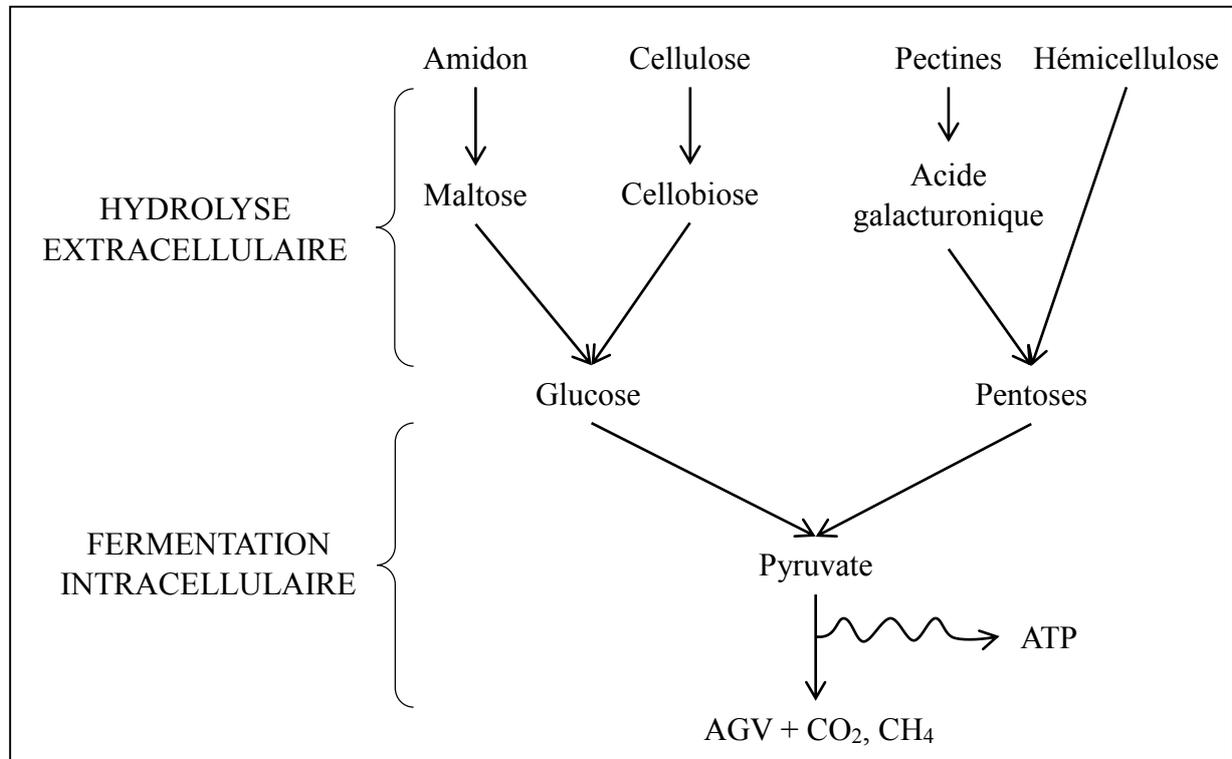
Les bactéries amylolytiques et les protozoaires sont impliqués dans l'hydrolyse de l'amidon. Les bactéries amylolytiques sont favorisées par un pH ruminal inférieur à 6. Les protozoaires vont ingérer des grains d'amidons.

Les microorganismes sécrètent des amylases extracellulaires, qui vont s'attaquer aux liaisons  $\alpha$ -glucosidiques de façon aléatoire. Le produit final de cette hydrolyse est le glucose (50).

Pour conclure, l'hydrolyse extracellulaire de ces polyholosides va donner des oligosaccharides qui vont pouvoir être absorbés et fermentés par les microorganismes.

b. Voies métaboliques de la fermentation des glucides par les bactéries ruminales

Les sucres libérés par hydrolyse vont être absorbés et ensuite fermentés en pyruvate par les voies d'Emden-Meyerhof et des pentoses phosphates. Le pyruvate est un intermédiaire qui est rapidement utilisé. Il est catabolisé en AGV (C2, C3, C4 et une faible proportion d'AGV mineurs), dans certains cas en acide lactique, et en gaz (dioxyde de carbone, dihydrogène et méthane). L'énergie, libérée sous forme d'adénosine tri-phosphate (ATP), permettra la croissance microbienne (18). Les deux étapes de la dégradation des glucides sont illustrées dans la figure 6.



**Figure 6 :** La dégradation et l'utilisation des glucides par les bactéries ruminales.

c. Produits terminaux et principaux facteurs de variation

Avec des rations équilibrées, le C2 représente entre 60 et 65 % des AGV ruminiaux, le C3 de 18 à 20 %, le C4 de 10 à 15 % et les AGV mineurs de 2 à 5%.

Les proportions respectives en AGV dépendent de la nature de la ration. Une augmentation des teneurs en fibres provoque une augmentation de la proportion de C2 ruminal car les bactéries fibrolytiques utilisent plutôt la voie du C2. Une forte teneur en amidon (par exemple avec une forte proportion de céréales dans la ration) va favoriser la production de C3, au détriment de celle du C2. La présence de glucides solubles (saccharose, lactose, inuline), contenus dans des aliments tels que les betteraves ou le lactosérum, va augmenter la proportion de C4. Ce phénomène est illustré dans le tableau 2 qui compare les proportions d'AGV résultant de 4 rations différentes (18).

Régime	AGV totaux (mmol/L)	Proportions molaires (%)			
		C2	C3	C4	AGV mineurs
Foin de graminées	90,0	72	17	7	4
Foin (44%) + orge (56%)	115,6	61	30	8	1
Foin (18%) + betteraves (82%)	127,5	56	26	17	1
Foin (52%) + lactosérum (48%)	99,9	59	16	21	4

**Tableau 2 :** Influence de la nature de la ration sur les proportions molaires en AGV dans le rumen (valeurs moyennes durant les 5 heures après le repas) (d'après 30).

Le pH ruminal a également un effet sur les proportions d'AGV : sachant que les bactéries fibrolytiques se développent mieux à un pH supérieur à 6,5 et que les bactéries amylolytiques préfèrent un pH inférieur à 6, un pH bas engendrera des proportions de C3 plus élevées tandis qu'un pH haut provoquera de plus grandes proportions de C2 (6).

La quantité d'AGV dans le rumen dépend de la vitesse de dégradation du substrat : plus ce substrat est dégradé rapidement, plus la quantité d'AGV produite est importante. Les fibres sont moins rapidement digérées que l'amidon (lent ou rapide). Ainsi de fortes proportions

d'amidon rapide dans la ration entraînent une forte production d'AGV ruminiaux. Cela peut créer une baisse rapide du pH ruminal risquant de provoquer une acidose ruminale (6).

Le méthane représente environ 15% d'énergie perdue lors des fermentations ruminales. Il s'agit d'un gaz à effet de serre et il est produit en plus grande quantité par la voie du C2. En système intensif, la ration est composée de plus fortes proportions d'amidon qui favorisent la voie du C3, produisant de plus faibles quantités de méthane. Une vache au pré est sur ce point plus polluante que dans un système intensif (29).

Les fermentations du microbiote produisent également de l'énergie thermique, c'est pourquoi la température ruminale est en moyenne plus élevée que la température corporelle. Néanmoins beaucoup de cette énergie thermique est perdue.

#### d. Absorption des acides gras volatils

Les AGV sont principalement absorbés par l'épithélium des papilles ruminales mais également à travers les parois du feuillet et du réseau. Ils représentent la source majeure d'énergie pour l'animal (29).

Les activités du microbiote ruminal permettent donc la dégradation des fibres alimentaires et des glucides en général. L'énergie libérée permettra le fonctionnement du métabolisme microbien et notamment les synthèses protéiques. Les AGV produits seront utilisés par le ruminant comme source d'énergie.

## B. Digestion des lipides alimentaires

### 1. Les différents lipides alimentaires

Les rations des ruminants sont généralement pauvres en lipides (entre 2 et 5 % de la MS). Les lipides des grains de céréales, des graines protéagineuses et oléagineuses sont principalement composés de triglycérides riches en AGI : acide  $\alpha$ -linoléique (c9c12c15-C18:3), acide linoléique (c9c12-C18:2) et acide oléique (c9-C18:1). Les AG majoritaires composant ces aliments sont développés dans le tableau 3.

Aliment	MG/MB (%)	AG majoritaire(s)	
Grains de céréales	Avoine	5	c9-C18:1 ; c9c12-C18:2
	Blé tendre	2	c9c12-C18:2
	Maïs	4	c9c12-C18:2
	Orge	2	c9c12-C18:2
	Sorgho	3	c9-C18:1 ; c9c12-C18:2
Graines protéagineuses	Féverole	1	c9c12-C18:2
	Lupin blanc	5-8	c9-C18:1
	Lupin bleu	5-8	c9c12-C18:2
	Pois	1	c9c12-C18:2
Graines oléagineuses	Colza	42	c9-C18:1
	Lin	34	c9c12c15-C18:3
	Soja	18	c9c12-C18:2
	Tournesol	45	c9c12-C18:2

**Tableau 3** : Teneurs en MG et AG majoritaires des principaux aliments utilisés chez les ruminants

MG : matières grasses ; AG : acides gras ; MB : matière brute

L'herbe contient essentiellement des galactolipides et des phospholipides qu'on retrouve principalement dans les feuilles. Les acides gras majoritaires de l'herbe sont : le c9c12c15-C18:3, le c9c12-C18:2 et l'acide palmitique (C16:0) qui représentent respectivement 41, 19 et 24 % des acides gras totaux (AGT) (9, 13).

### 2. Le dosage des lipides alimentaires

Il est possible d'estimer la teneur en MG totale d'un aliment avec la méthode de l'extrait étheré. En effet, en lessivant un échantillon avec de l'éther, les molécules apolaires sont solubilisées. Cependant, certaines molécules non lipidiques telles que les vitamines liposolubles sont extraites : cela conduit à une surestimation de la proportion en MG. A l'inverse, certains lipides tels que les phospholipides ne se solubilisent pas dans l'éther : il y a alors sous-estimation de la quantité de MG. Ce dosage reste néanmoins très utilisé et aboutit à une standardisation des valeurs permettant des comparaisons entre les différents aliments.

La chromatographie en phase gazeuse permet d'identifier les AG présents dans un aliment. Cette technique sera développée dans la partie « matériels et méthodes » de ce manuscrit. On obtient alors des profils d'AG pour chaque échantillon.

### 3. Le métabolisme ruminal des lipides

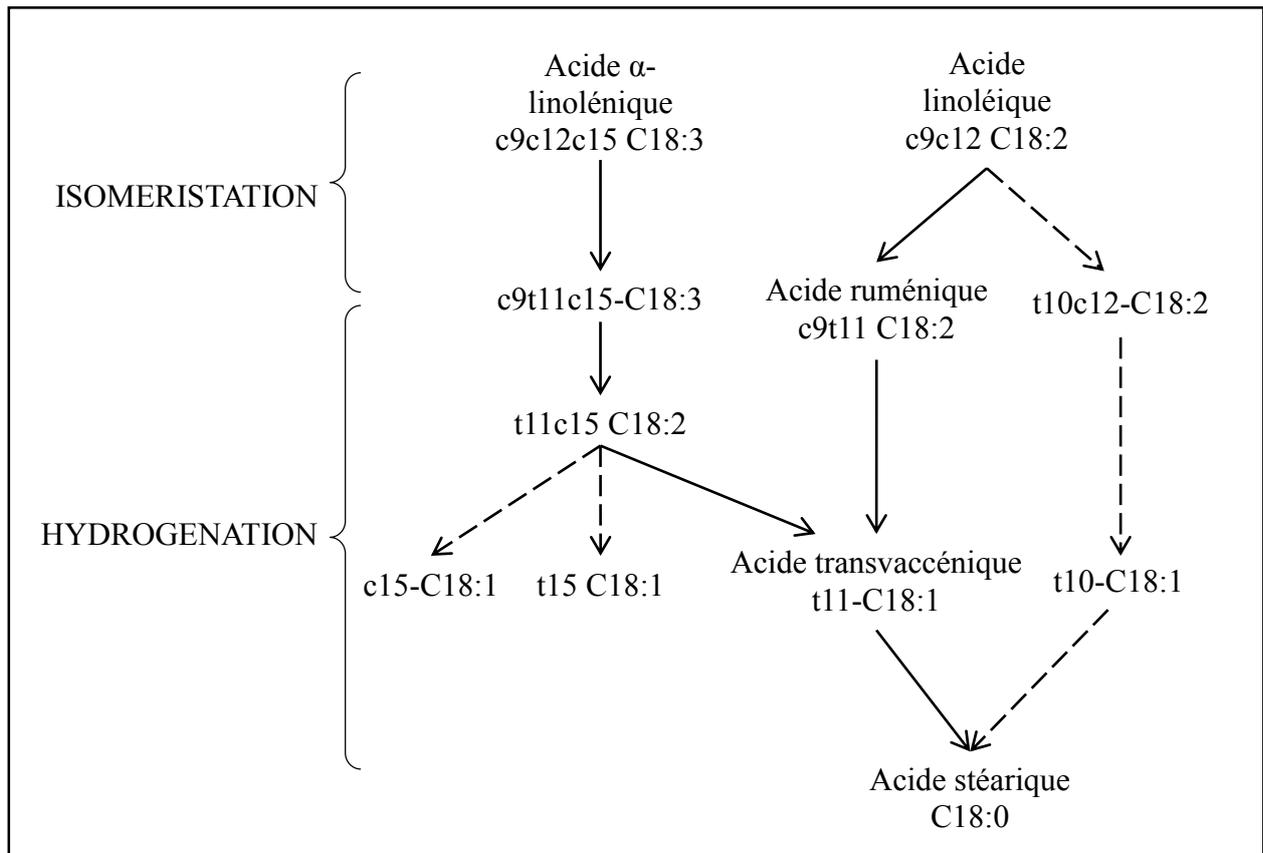
Le métabolisme ruminal des lipides est effectué en deux étapes : la lipolyse, suivie de la biohydrogénation. Cette deuxième étape entraîne le remaniement des AG alimentaires et donc la production de nombreux isomères de ces AG. De plus les bactéries ont la capacité de synthétiser de nouveaux AG. L'ensemble de ces phénomènes est à l'origine d'une composition très variée d'AG ruminiaux. La composition en AG ruminiaux impacte sur la composition en AG des denrées alimentaires d'origine animale (lait, viande).

#### a. La lipolyse

Les triglycérides, les galactolipides et les phospholipides sont rapidement hydrolysés par les bactéries lipolytiques en milieu extracellulaire : cela donne des AG libres, du glycérol, des oses et du phosphore. Cette hydrolyse est quasi-complète (entre 85 et 95 %) et rapide. Les AGI vont ensuite subir la biohydrogénation tandis que le glycérol et les oses seront fermentés en AGV.

## b. La biohydrogénation ruminale

La biohydrogénation des AGI est une réaction chimique réalisée par de multiples espèces bactériennes, se déroulant en plusieurs étapes qui saturent progressivement les AGI. Cependant cette réaction n'est pas toujours complète et des intermédiaires insaturés peuvent s'accumuler. Nous détaillerons les cas de la biohydrogénation du c9c12c15-C18:3 et du c9c12-C18:2 dont les différentes étapes sont illustrées sur la figure 7.



**Figure 7** : La biohydrogénation des acides  $\alpha$ -linoléique et linoléique.

Trait continu : voie majoritaire ; trait discontinu : voie minoritaire

La biohydrogénation commence par une isomérisation des AGI. Lors de cette phase les acides gras ayant une liaison *cis* sur le carbone 12 sont transformés en leur isomère *trans*- $\Delta 11$ . La  $\Delta 12$  isomérase responsable de cette réaction, isolée chez *B. fibrisolvans*, n'est active que sur les AG possédant au moins deux doubles liaisons de configuration *cis*- $\Delta 9$  *cis*- $\Delta 12$  dont la fonction carboxyle est libre (34, 35) ; ainsi l'isomérisation n'est possible qu'après l'hydrolyse. C'est pourquoi le c9c12c15-C18:3 est transformé en c9t11c15-C18:3 et le c9c12-C18:2 est

transformé en acide ruménique (c9t11-C18:2), c'est la voie T11. Le c9c12-C18:2 peut également subir l'action d'une  $\Delta 9$  isomérase pour être transformé en t10c12-C18:2 (67). Cette dernière enzyme est peu étudiée. Cette voie est en général minoritaire : c'est la voie T10, mais elle est favorisée par une forte proportion de concentrés dans la ration, et une baisse du pH.

L'isomérisation engendre donc des premiers intermédiaires présentant deux doubles liaisons conjuguées (séparées par une seule liaison simple). Ces intermédiaires sont appelés acides linoléiques conjugués (CLnA) et acides linoléiques conjugués (CLA). Il est intéressant de noter que ces intermédiaires auraient des propriétés biologiques intéressantes pour le consommateur humain, en particulier le c9t11-C18:2 qui serait anticarcinogène (14, 51, 52).

La deuxième phase de la biohydrogénation correspond à l'hydrogénation des doubles liaisons par des réductases microbiennes. Le c9t11c15-C18:3 est réduit en t11c15-C18:2. Une hydrogénation supplémentaire (éventuellement couplée à une isomérisation) donne majoritairement de l'acide transvaccénique (t11-C18:1) ainsi qu'une petite fraction de t15-C18:1 et de c15-C18:1. Le t11-C18:1 peut être à nouveau hydrogéné pour produire de l'acide stéarique (C18:0). Pour ce qui est des CLA, le c9t11-C18:2 est hydrogéné en acide t11-C18:1 puis en C18:0. Le t10c12-C18:2 est hydrogéné en t10-C18:1 puis en C18:0.

Cette biohydrogénation étant plus ou moins complète, il est possible de retrouver tous les intermédiaires de la biohydrogénation dans le contenu ruminal.

c. Synthèse microbienne d'acides gras à chaîne hydrocarbonée impaire et ramifiée

Les bactéries ont la possibilité de synthétiser et d'incorporer des AG. Les AG incorporés concernent plusieurs AG dont le c9c12-C18:2. Les AG synthétisés sont majoritairement des AG à chaîne impaire et/ou ramifiée, ou « Odd- and branched-chain fatty acids » (OBCFA). Il s'agit des AG suivants : C15:0, C17:0, cis9-C17:1, iso-C13:0, iso-C14:0, iso-C15:0, iso-C16:0, iso-C17:0, anteiso-C15:0 et anteiso-C17:0. Ces derniers sont synthétisés par les bactéries à partir d'AGV, d'AG et de résidus ramifiés d'acides aminés (58,69).

Quand les AG d'origine alimentaire sont présents en forte quantité dans le rumen, l'incorporation est plus importante que la synthèse. A l'inverse, quand les acides gras d'origine alimentaire sont plus rares, la part d'AG synthétisés par les bactéries augmente (4).

#### 4. Les principaux facteurs de variation des teneurs en AG dans les denrées alimentaires d'origine animale

Nous nous intéresserons ici aux facteurs de variation liés à la ration qui peuvent modifier les profils en AG.

La composition en AG du contenu ruminal dépend tout d'abord des AG présents dans la ration : en effet ces derniers conditionnent directement la nature des intermédiaires de la biohydrogénation.

Une ration classique pour des vaches laitières, contenant moins de 3% de MG par rapport à la matière sèche (MS), induit une teneur de 0,4 à 0,8 % de CLA dans la MG du lait. Cette teneur augmente lorsque la ration est enrichie en AGI. Mais cette augmentation dépend de la nature des AG de la MG ajoutée : le soja, riche en c9c12-C18:2, induit une sécrétion très forte de CLA dans le lait, tandis que le lin (moins riche en c9c12-C18:2) conduit à une sécrétion intermédiaire et le colza (pauvre en c9,c12-C18:2) conduit à une production de lait très pauvre en CLA (8). La production de CLA et de *trans*-C18:1 au niveau ruminal dépend aussi de la quantité de MG apportée. La production ruminale de CLA est conditionnée par la libération dans le milieu ruminal de c9c12-C18:2 libre par hydrolyse des lipides alimentaires. L'augmentation de la quantité de MG dans le rumen provoque une légère diminution de l'efficacité (pourcentage libéré) de la lipolyse (65), mais celle-ci reste bien moins sensible aux fortes concentrations en c9c12-C18:2 que la biohydrogénation ruminale. En effet, la concentration ruminale en c9c12-C18:2 peut modifier directement la vitesse de sa propre biohydrogénation ruminale. *In vitro*, une concentration élevée en c9,c12-C18:2 provoque une diminution de l'efficacité des trois étapes de sa biohydrogénation, entraînant alors l'accumulation des intermédiaires CLA et *trans*-C18:1 (64, 20). Cependant, si une quantité élevée de c9c12-C18:2 provoque une saturation de l'étape d'isomérisation, les deux réductions seraient plutôt inhibées et/ou saturées par les intermédiaires CLA et *trans*-C18:1 produits au cours de sa biohydrogénation.

La forme d'apport d'AG influencera également la teneur en CLA dans le lait : sous forme d'huile, les triglycérides sont rapidement hydrolysés, une grande quantité de c9c12-C18:2 est libérée, ainsi la biohydrogénation est ralentie et une accumulation de CLA sera visible. Au contraire, sous forme de graines, les triglycérides ne sont hydrolysés qu'après digestion des parois végétales : ainsi le c9c12-C18:2 n'est que lentement libéré, la biohydrogénation ne sera pas ralentie. Un traitement des graines par chauffage ou extrusion permet de ralentir ou d'accélérer la libération de c9c12-C18:2 (63).

Le rapport fourrage/concentré joue aussi un rôle dans la concentration en CLA des denrées d'origine animale. En effet, une augmentation de la teneur en fourrage provoque une augmentation des concentrations en CLA du lait. Réciproquement une diminution du rapport fourrage/concentré engendre une diminution des concentrations en CLA du lait. Cela s'explique par l'intermédiaire de trois mécanismes : tout d'abord les fourrages représentent un apport d'AG polyinsaturés, ensuite ils engendrent un pH ruminal proche de 7 qui correspond au pH optimal des enzymes de la biohydrogénation, enfin ils stimulent les bactéries fibrolytiques dont *B. fibrisolvans* (63). Par ailleurs, les rations riches en concentrés et en c9c12-C18:2 favorisent l'apparition des isomères T10 (75)

Ainsi, il est possible de moduler, en fonction de l'alimentation, la composition en AG du rumen et donc des produits d'origine animale, en particulier cela pourrait permettre de sélectionner certains AG d'intérêt nutritionnel et notamment le c9t11-C18:2 pour ses propriétés anticarcinogènes.

## C. Digestion de l'azote alimentaire

### 1. Nature de l'azote alimentaire

Les matières azotées alimentaires peuvent être séparées en deux catégories : les protéines, qui peuvent être solubles ou non, et l'azote non protéique ou plus précisément non protéinique (ANP). En effet, l'ANP regroupe des amides et des acides aminés libres (50% environ), ainsi que des bases azotées, des amines, du  $\text{NH}_3$ , de l'urée et des nitrates.

Les aliments d'origine végétale les plus riches en azote sont les graines oléagineuses et protéagineuses (jusqu'à 35% de la MS). Sous forme de tourteaux, la teneur en MAT peut atteindre 50% de la MS. Dans ces aliments, l'azote est en quasi-totalité sous forme de protéines. Les céréales sont plus pauvres en azote (10% de MAT/MS), excepté sous forme de coproduits (drèches ou sons) qui concentrent l'azote de l'assise protéique et de l'albumen du grain par élimination de l'amidon (6).

La teneur en azote des plantes fourragères dépend tout d'abord du stade de végétation : en début de croissance, les graminées fourragères feuillues contiennent environ 20 % de MAT dans la MS. Cette teneur diminue à 3 % dans les pailles de céréales et l'herbe sèche sur pied. Cette teneur dépend également de la nature botanique : le maïs fourrager est plus pauvre en azote que les légumineuses (27).

Dans les plantes fourragères, 75 à 85% de l'azote est sous forme de protéines, 15 à 25% sous forme d'ANP. Les protéines se concentrent dans les feuilles et correspondent à 65 à 80 % de l'azote des feuilles : 55 à 65 % de celles-ci se retrouvent dans les chloroplastes, 20 à 35% dans le cytosol des cellules, le reste est réparti entre les mitochondries, le noyau et les parois. L'ANP est surtout présent dans les tiges où il représente 20 à 30 % de l'azote : on le retrouve notamment dans les vacuoles (27).

Une majeure proportion de l'ANP arrivant dans le rumen est représentée par l'urée, directement incorporée dans la ration ou contenue dans les sécrétions salivaires du ruminant.

## 2. Dosage de l'azote alimentaire

### a. Méthode Kjeldahl

Le dosage de la MAT se base sur la détermination de la quantité d'azote dans l'aliment.

L'échantillon est tout d'abord mis en contact avec de l'acide sulfurique à ébullition qui entraîne la destruction des molécules organiques. Les produits de cette réaction sont le dioxyde de carbone, l'eau et le sulfate d'ammoniac. Une distillation en milieu basique est réalisée : le sulfate d'ammoniac est transformé en sulfate de sodium et en  $\text{NH}_3$  qui va pouvoir s'évaporer et être isolé. Celui-ci est alors dosé en retour à l'aide d'acide sulfurique et d'hydroxyde de sodium.

Cette technique permet alors d'estimer la teneur en azote de l'aliment. Les protéines renfermant en moyenne 16% d'azote, on utilise le coefficient 6,25 pour convertir la teneur en azote en MAT.

### b. Méthode Dumas

Dans cette technique, l'échantillon est contenu dans une petite capsule d'étain. Il est introduit dans un réacteur constitué par un tube vertical en quartz, maintenu à une température de  $1000^\circ\text{C}$  et dans lequel passe un courant d'hélium.

A l'introduction de l'échantillon, le courant d'hélium est enrichi par une quantité déterminée d'oxygène pur, provoquant alors la combustion éclair de la capsule et de l'échantillon.

Les gaz de combustion, entraînés par le courant d'hélium, passent sur un catalyseur d'oxydation qui les transforme en dioxyde de carbone, en eau, en dioxyde de soufre, en trioxyde de soufre et en oxydes d'azote.

Ces gaz passent alors sur un deuxième catalyseur (cuivre réduit) qui va entraîner la réduction des oxydes d'azote en azote élémentaire, du trioxyde de soufre en dioxyde de soufre, et piéger l'excès d'oxygène. A la sortie du tube on trouve, en plus du gaz vecteur hélium, du diazote, de dioxyde de soufre, du dioxyde de carbone et de l'eau. Les produits non dosés sont

piégés. Les gaz obtenus sont alors séparés dans une colonne de chromatographie et quantifiés par un détecteur à conductibilité thermique. Le signal obtenu est ensuite traité informatiquement.

Comme avec la méthode Kjeldahl, le même coefficient de 6,25 doit être appliqué à la quantité d'azote mesurée pour obtenir une valeur de MAT.

### 3. Dégradation de l'azote

La protéolyse est principalement réalisée par les bactéries et les protozoaires. Les champignons interviennent dans une moindre mesure. Ces microorganismes ruminiaux dégradent une fraction des protéines alimentaires. Cette dégradation engendre tout d'abord des peptides puis des acides aminés et enfin de l'ammoniac. L'ANP est quant à lui rapidement dégradé en  $\text{NH}_3$ .

#### a. Protéolyse

La première étape de la dégradation des protéines résulte de l'activité des protéases bactériennes. Celles-ci étant localisées sur la face externe des membranes bactériennes (30), l'attachement précède la protéolyse.

C'est principalement les bactéries amylolytiques qui interviennent dans la protéolyse : elles dégradent principalement les protéines solubles. Les protozoaires participent plutôt à la dégradation des protéines insolubles incluses dans des particules de taille appropriée telles que des chloroplastes ou des bactéries qu'ils ingèrent (30).

La vitesse de dégradation des protéines dépend tout d'abord de la solubilité : les prolamines et les glutélines, qui sont insolubles, sont plus lentement dégradées que les globulines, qui sont solubles (54). La vitesse de dégradation des protéines dépend également de la présence de ponts peptidiques (structures tertiaire et quaternaire). Par exemple, la présence de ponts disulfures ralentit la protéolyse (2). Ainsi, l'action synergique des différentes protéases est nécessaire pour compléter l'hydrolyse des protéines de structure complexe. Il est également

essentiel que les protéines soient accessibles : de nombreuses protéines végétales sont incluses dans une matrice de fibres. La protéolyse dépend alors de l'activité fibrolytique.

Une fraction variable de protéines échappe à la dégradation ruminale et se compose principalement de protéines insolubles.

#### b. Hydrolyse des peptides

Les peptides sont rapidement hydrolysés : ils sont donc peu accumulés. Seule la protéolyse de la caséine est assez rapide pour pouvoir observer une accumulation de peptides (30, 70). Les peptides de grande taille subissent une hydrolyse par des peptidases liées à la membrane extracellulaire des bactéries, cela produit alors des oligopeptides, des di-peptides, des tri-peptides et des acides aminés, qui seront ensuite absorbés par les bactéries. De plus, les bactéries, ayant la capacité d'assimiler des peptides de petite taille, vont les dégrader en acides aminés à l'aide d'enzymes intracellulaires (30).

#### c. Dégradation des acides aminés

Les acides aminés, d'origine alimentaire ou produits de l'hydrolyse des protéines, sont soit désaminés en  $\text{NH}_3$  et en AGV, soit incorporés dans les protéines bactériennes (2).

#### d. Devenir des autres composés azotés de la ration

Les acides nucléiques représentent 5 à 10% de l'azote présent dans les rations des ruminants. Ces molécules proviennent également des fragments desquamés de l'épithélium ruminal et des microorganismes lysés. Ils sont rapidement dégradés et peuvent être utilisés par les microorganismes comme source d'énergie et d'azote (30).

L'urée, d'origine alimentaire ou salivaire, est très rapidement hydrolysée par des uréases bactériennes : cela engendre la production de  $\text{NH}_3$ . Les nitrates sont réduits en nitrites puis en  $\text{NH}_3$  (30).

Ainsi, la dégradation des matières azotées entraîne la production de  $\text{NH}_3$ . Ce dernier sera utilisé par le microbiote pour la synthèse de nouveaux acides aminés. Quand la production d'ammoniac est supérieure à son utilisation, il peut alors être absorbé par la paroi du rumen. Il sera transformé dans le foie en urée, qui sera alors recyclée par la salive ou la paroi du rumen. Par ailleurs, une partie de l'urée est excrétée dans l'urine et le lait (30).

#### e. Synthèse microbienne des protéines

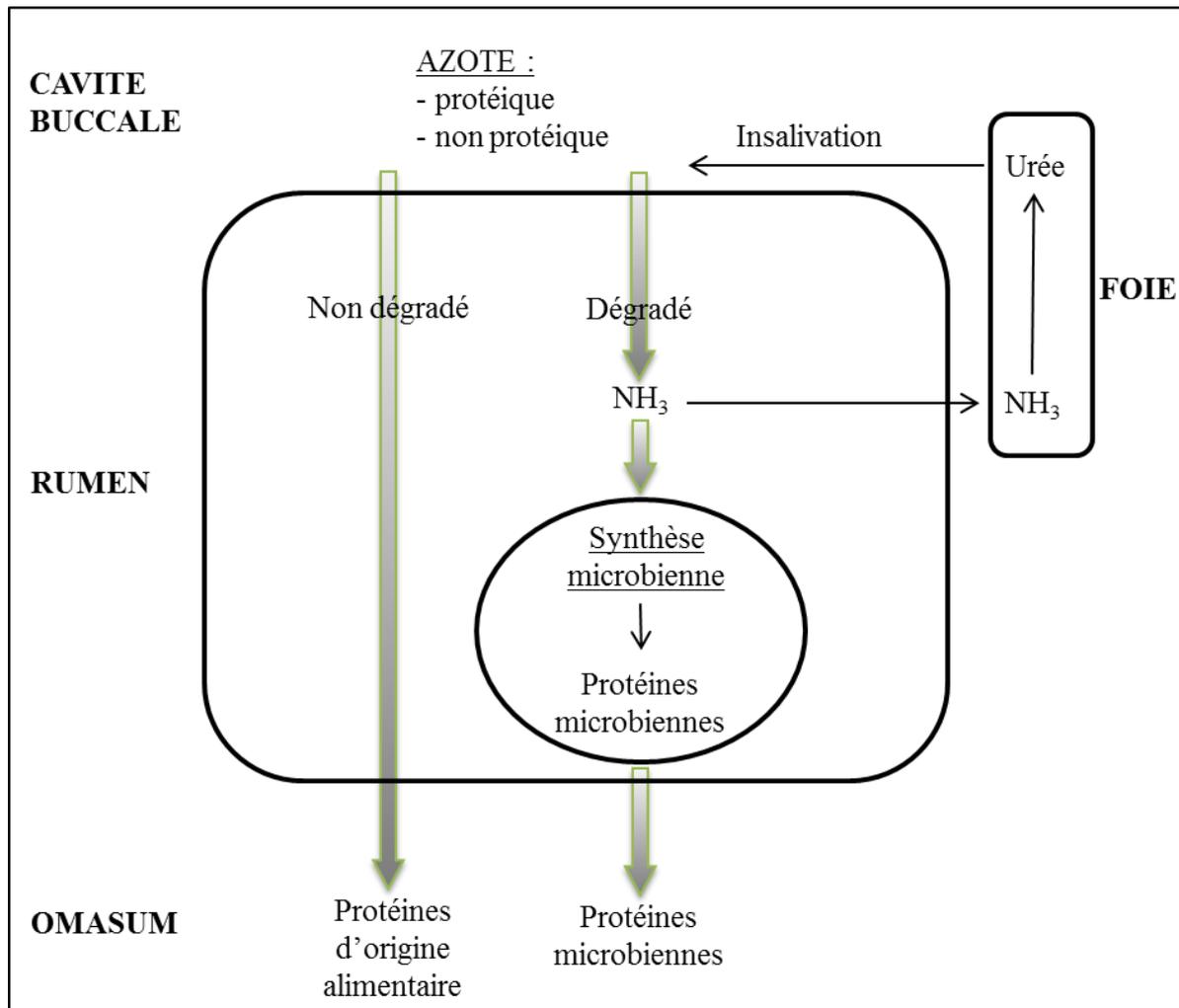
Seule une petite fraction des acides aminés est directement incorporée dans les protéines microbiennes (chez les protozoaires et quelques espèces bactériennes). La plus grande partie des acides aminés bactériens est synthétisée à partir de  $\text{NH}_3$ .

Chez les bactéries, le  $\text{NH}_3$  traverse la membrane plasmique par diffusion passive sous forme non ionisée, et par transport actif sous forme ionisée. Il est ensuite incorporé dans une chaîne hydrogénéocarbonée pour former un acide aminé. Ces derniers permettront la synthèse de protéines. Les protozoaires incorporent les acides aminés principalement par la prédation de bactéries.

La croissance des bactéries non protéolytiques dépend donc de la production de  $\text{NH}_3$  par les bactéries protéolytiques. Il s'agit là d'une illustration des interdépendances nutritionnelles qui permettent le bon fonctionnement du microbiote ruminal. Notons que les bactéries fibrolytiques sont très dépendantes car elles ont majoritairement une action protéolytique faible.

Les protéines d'origine microbienne ainsi que les protéines alimentaires non dégradées dans le rumen seront ensuite évacuées vers le reste du tube digestif. Leur digestion, dans le reste du tube digestif, est similaire à celle rencontrée chez les monogastriques.

La figure 8 reprend les principales phases du métabolisme ruminal de l'azote.



**Figure 8 :** Le métabolisme ruminal de l'azote.

Les activités ruminales permettent donc au ruminant de tirer parti de l'ANP. Elles contribuent également à un remaniement des matières azotées présentes dans la ration. Les protéines issues des synthèses microbiennes présentent des compositions en acides aminés globalement équilibrées : les activités microbiennes augmentent ainsi la valeur biologique des matières azotées alimentaires. Ainsi les ruminants sont peu dépendant des équilibres entre les différents acides aminés alimentaires.

De plus, il est important de noter que les synthèses microbiennes à partir du  $\text{NH}_3$  nécessitent de l'énergie sous forme d'ATP, énergie provenant directement de la fermentation des glucides. Ces deux métabolismes sont donc étroitement liés.

### III. LES METHODES D'ETUDE DE LA DIGESTION RUMINALE

Dans cette partie, nous étudierons les différentes techniques d'étude des biotransformations ruminales. Nous verrons dans un premier temps les méthodes *in vivo* puis les méthodes *in vitro*.

#### A. Les études *in vivo*

Tout d'abord, nous nous intéresserons aux méthodes peu invasives pour l'animal, puis nous verrons les méthodes faisant intervenir des canules qui nécessitent une chirurgie, donc plus invasives.

##### 1. Etudes avec des animaux non canulés

L'étude des activités microbiennes ruminales peut tout d'abord s'effectuer indirectement par l'étude de la composition du lait de l'animal (taux butyreux, profil d'AG longs issus de la biohydrogénation et d'OBCFA). Il existe néanmoins un biais à cause du remaniement du profil en AG par le métabolisme mammaire.

Elle peut également s'effectuer par analyse du contenu ruminal : celui-ci peut être prélevé par ruminocentèse ou sondage œsophagien. Ces méthodes permettent de mesurer le pH, les concentrations en AGV et en NH<sub>3</sub>. Cependant, les ruminocentèses répétées engendrent un risque d'abcès de paroi ou de péritonite, et le prélèvement par sondage œsophagien est souvent contaminé par de la salive, ce qui rend l'interprétation du pH difficile. Enfin, ces deux méthodes ne permettent pas d'avoir accès aux contenus solides du rumen. C'est pourquoi le recours à des animaux canulés est souvent nécessaire.

## 2. Etudes avec des animaux canulés

### a. Etudes du contenu ruminal

Une canule ruminale est un dispositif permettant un accès direct et permanent au contenu ruminal. Elle est mise en place sous anesthésie locale dans le creux du flanc gauche. L'épithélium du rumen est alors abouché bord à bord à la peau. La réaction inflammatoire entraînée permet une étanchéité du dispositif. La canulation ruminale est un geste chirurgical relativement simple à réaliser et l'animal semble bien tolérer cette opération (12).

Cette canule permet tout d'abord de prélever de façon répétée des contenus ruminiaux. Ces prélèvements sont généralement effectués plusieurs fois par jour autour des repas. On obtient alors une cinétique des paramètres physicochimiques (pH, potentiel d'oxydo-réduction) et des produits des fermentations dans le milieu ruminal (AGV, NH<sub>3</sub>), mais cette technique ne permet pas d'effectuer de bilan quantitatif des biotransformations.

### b. Bilans *in vivo* des activités microbiennes

L'activité microbienne peut être étudiée en mesurant le flux de nutriments effluent vers l'omasum, l'abomasum et le duodénum. Pour cela il est nécessaire d'avoir des animaux porteurs d'une canule du rumen, de l'abomasum ou du duodénum proximal (21). La technique de référence est celle du double marquage (15) où deux types de marqueurs sont utilisés : les marqueurs de la phase liquide tels que le chrome EDTA ou le polyéthylène glycol, et les marqueurs de la phase solide tels que le chrome mordancé ou l'ytterbium. Il faut administrer le marqueur en quantité journalière constante, soit par infusion dans le rumen, soit directement dans la ration. Le contenu digestif est alors prélevé à intervalles réguliers.

Avec cette méthode, il est possible d'étudier le flux de digesta effluent du rumen et donc d'effectuer des bilans de la digestion ruminale ainsi que d'estimer la dégradabilité des composés alimentaires (MS, NDF, ADF, amidon...). Elle permet également, à l'aide de marqueurs microbiens, d'évaluer les fractions azotées microbiennes et alimentaires (55).

Néanmoins cette technique présente quelques désavantages. Elle nécessite beaucoup de temps et de budget et elle n'est pas aisée à mettre en place. De plus, l'utilisation des marqueurs

induit des erreurs dans les bilans des digesta. Enfin de nombreuses variations individuelles (62) sont observées. Elle reste cependant une technique de référence.

### c. Méthode *in sacco*

La méthode *in sacco* (ou *in situ*, ou méthode des sachets de nylon) nécessite également l'emploi d'animaux munis d'une canule ruminale. Elle consiste à renfermer dans des sachets de nylon ou polyester, l'aliment à tester. Les sachets sont ensuite suspendus dans le rumen de l'animal pendant une période variable. Ils sont ensuite lavés et analysés.

Cette méthode a été largement utilisée pour évaluer la dégradabilité de la fraction azotée des aliments, elle a ainsi été à la base de nombreux systèmes d'évaluation de la valeur azotée des aliments tels que le système PDI (68). Elle peut également être utilisée pour l'étude des cinétiques de dégradation des glucides pariétaux et de l'amidon (46).

La plupart des systèmes d'évaluation de la valeur azotée des aliments reposent sur deux fractions d'acides aminés absorbées dans l'intestin : une fraction d'origine alimentaire et une fraction microbienne. Dans ce système, la fraction azotée présente après incubation dans le sachet correspond à la fraction alimentaire non digestible par les microorganismes, et l'autre fraction correspond à la fraction digestible. Or, il a été montré que certains peptides ou protéines solubles (qui sortent donc du sachet) ne sont pas dégradés (1) ; ils augmenteraient jusqu'à 30% le flux d'azote alimentaire duodéal (72). De plus, une part de l'azote résiduel dans le sachet est d'origine bactérienne (5). Dans le système PDI (68), une comparaison entre l'*in vivo* et l'*in sacco* a permis de prévoir, en fonction des résultats de l'*in sacco*, la part d'azote alimentaire échappant à la digestion microbienne. Celle-ci est égale à 1,11 fois la quantité non dégradée *in sacco*.

Concernant la digestion de l'amidon, il est intéressant d'évaluer la part de l'amidon échappant à la digestion ruminale (ou amidon by-pass). Or, une valeur de dégradabilité mesurée *in situ* de 60 % correspond à une dégradabilité ruminale mesurée *in vivo* de 75 % (57). Il y a donc sous-estimation de la dégradabilité de l'amidon. Cela peut s'expliquer par une activité amylolytique variable à l'intérieur du sachet (49) car les microorganismes colonisent de façon irrégulière l'intérieur du sachet.

Pour ce qui est de la digestion des parois végétales, la méthode *in situ* a tendance à sous-estimer la dégradabilité réelle. Cela peut s'expliquer par un nombre de bactéries cellulolytiques, une activité cellulolytique et un pH plus faibles dans le sachet que dans le milieu ruminal (46).

Avec cette méthode se pose également le problème du mode de conditionnement. En effet, la taille des pores du sachet peut entraîner une sélection des microorganismes (45). La taille des particules de l'aliment introduit peut modifier les vitesses de dégradation. Enfin, pour étudier la dégradation des aliments humides, un séchage prolongé (3 jours à 55°C) à l'étuve est nécessaire. Ce dernier peut altérer les composés azotés en formant des complexes de Maillard.

Ainsi cette méthode, aisée à mettre en œuvre, est intéressante car l'aliment est placé directement dans le milieu ruminal. Elle permet d'estimer la dégradabilité de l'amidon, des protéines et des fibres mais avec une répétabilité et une reproductibilité faibles (44).

Les méthodes *in vivo* et *in sacco* nécessitent l'utilisation de plusieurs animaux pourvus de canules ruminales, d'où l'intérêt de développer des méthodes alternatives afin d'améliorer le bien-être animal et de réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expérimentations.

Des méthodes alternatives *in vitro* permettent de mettre en évidence de nombreux facteurs de variations des fermentations ruminales, limitant ainsi la part des expérimentations *in vivo*.

## C. Les études *in vitro*

### 1. Méthodes générales

Ces méthodes consistent à incuber un substrat en présence d'un inoculum ruminal et d'un tampon pendant une période définie, en respectant des conditions de température (39°C) et d'anaérobiose. Une mise en mouvement du milieu fermentaire est également réalisée afin de mimer les contractions ruminales.

Le substrat est composé d'un substrat fermentaire pour nourrir les bactéries, auquel est additionné la matière première ou la substance à tester.

L'inoculum est généralement obtenu à partir d'animaux présentant une canule au niveau du rumen : la phase liquide et une partie de la phase solide : il peut contenir des fibres alimentaires de taille variable en fonction du tamis employé. Deux animaux donneurs sont suffisants.

Le tampon contient principalement des bicarbonates et des phosphates et il est parfois ajouté de l'urée. Les minéraux nécessaires à la croissance bactérienne sont en général inclus dans ce tampon.

### 2. Mise en culture de contenu ruminal en milieu fermé ou « batch »

Ces méthodes sont dérivées de la méthode de Tilley et Terry (62) qui consiste à incuber un substrat pendant 48h dans un mélange de liquide ruminal et de solution tampon à 38°C puis d'effectuer un traitement pepsique (pepsine – acide chlorhydrique) pendant 48h. La première étape reproduit les conditions ruminales et la deuxième, la digestion dans la caillette. Les méthodes actuelles ne reprennent que la première partie de cette méthode, et ainsi, elles ne simulent que la phase de digestion ruminale.

Classiquement, un substrat est mélangé à un inoculum et à une solution tampon pour une durée courte (inférieure ou égale à 24 h). L'apport de substrat et de solution tampon est unique, il n'y a aucune sortie d'effluents.

Ces méthodes permettent de nombreuses mesures : dégradation de la MS et de ses composants (NDF, ADF, amidon, protéines), production d'AGV et de NH<sub>3</sub>, mesure des gaz produits (43, 37). Il est possible d'étudier les composés solubles (contrairement à l'*in sacco*).

Ces méthodes sont relativement rapides et faciles à mettre en œuvre (73). Elles sont considérées comme moins onéreuses que la technique *in sacco* (55). De nombreux paramètres peuvent être testés en multipliant les manipulations. De plus, la répétabilité et la reproductibilité sont correctes (17).

Néanmoins, ce système est fermé : avec le temps, les produits des fermentations, notamment les AGV, s'accumulent et entraînent une diminution importante du pH. Cela inhibe le développement des populations microbiennes fibrolytiques (38).

### 3. Mise en culture de contenu ruminal en système ouvert

Afin de pouvoir évaluer l'effet d'un substrat ou d'un traitement sur les fermentations microbiennes sur une durée plus importante, il est important de renouveler le milieu fermentaire. Pour cela, il est nécessaire d'apporter régulièrement au milieu du substrat et du tampon, et d'évacuer les effluents.

Ainsi, il a été mis au point des systèmes dits continus (apport continu de solution tampon et d'aliment) et des systèmes dits semi-continus (apport continu de solution tampon et apport discontinu d'aliment). Avec ces deux types de systèmes, contrairement aux systèmes « batch », des effluents sont évacués (de façon continue) et il est donc possible d'effectuer ces cultures sur plusieurs semaines.

Nous présenterons ici un système semi-continu mis au point par Czerkowski et Breckenridge (10) : « Rumen Simulation Technique » ou Rusitec. Dans un deuxième temps, nous aborderons un système continu dit « dual flow continuous system » décrit par Hoover (24).

b. Le système Rusitec (10)

Ce système est présenté sur la figure 9. Avec cette technique le substrat est contenu dans des sachets, comparables à ceux utilisés *in sacco*, placés dans un panier. Ces derniers sont agités dans un réacteur, maintenus à 40°C grâce à un bain marie. Le tampon est infusé de manière continue dans le réacteur à l'aide d'une pompe péristaltique avec un taux de renouvellement de 1,5 à 9,5 %/h selon les études (10, 59). Les effluents liquides ou gazeux sont également évacués de façon continue, par une sortie unique. Deux types d'inoculum sont utilisés : un inoculum liquide (phase liquide ruminale filtrée), et un inoculum solide (contenu solide du rumen).

Le premier jour, le panier contient un sachet rempli d'inoculum solide et un sachet contenant l'aliment à tester. Le lendemain, le sachet contenant l'inoculum est remplacé par un sachet d'aliment. A partir de ce jour chaque sachet est remplacé au bout de 2 jours d'application. Le sachet retiré est rincé avec le tampon, cette phase intermédiaire est alors remise dans le réacteur. Cette étape permet de maintenir l'inoculum actif (7).

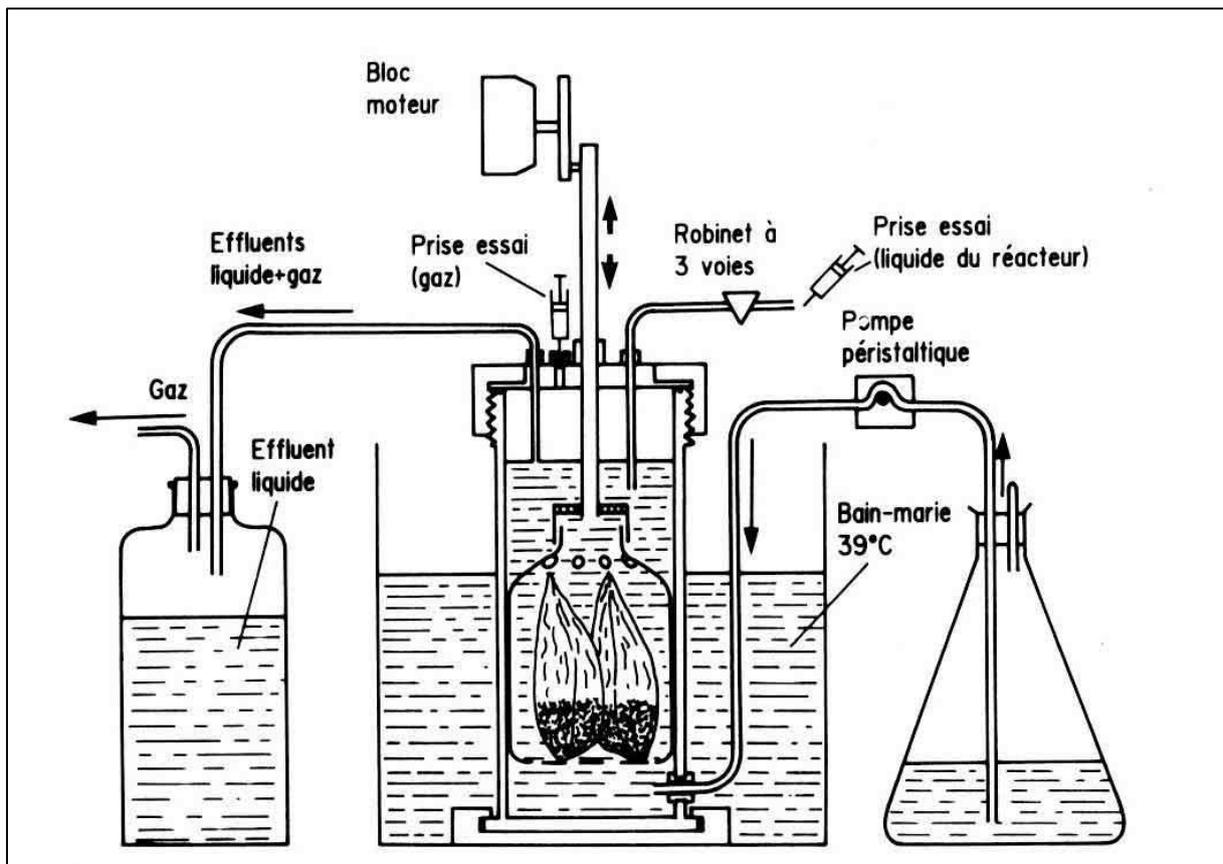


Figure 9 : Schéma général du Rusitec (d'après 7).

En comparant la composition des sachets avant et après application, il est possible d'obtenir des valeurs de dégradation. On obtient alors des résultats similaires à l'*in sacco* concernant la disparition de la MS, des constituants pariétaux, de l'amidon et des protéines. (7)

Les teneurs en AGV peuvent être mesurées dans le réacteur : une approche cinétique des fermentations est alors réalisable. Pour quantifier les AGV produits, il est nécessaire de les doser dans les effluents. La variabilité de la concentration en AGV dans le milieu fermentaire et de la quantité produite sur 24 h est assez élevée : jusqu'à 25%. Cependant les proportions des différents AGV varient peu (7).

Concernant le NH<sub>3</sub>, les valeurs obtenues dans le réacteur sont très faibles par rapport à l'*in vivo* (7).

Enfin il est possible d'évaluer la quantité et la composition des gaz produits.

Ce système permet donc d'évaluer simultanément la dégradation des substrats et la production d'AGV, de NH<sub>3</sub> et de gaz. Il offre ainsi la possibilité d'effectuer des bilans de fermentation et d'étudier l'aspect cinétique des fermentations. Concernant les protéines, l'utilisation de sachets permet de distinguer les protéines non digérées des protéines issues de la synthèse microbienne.

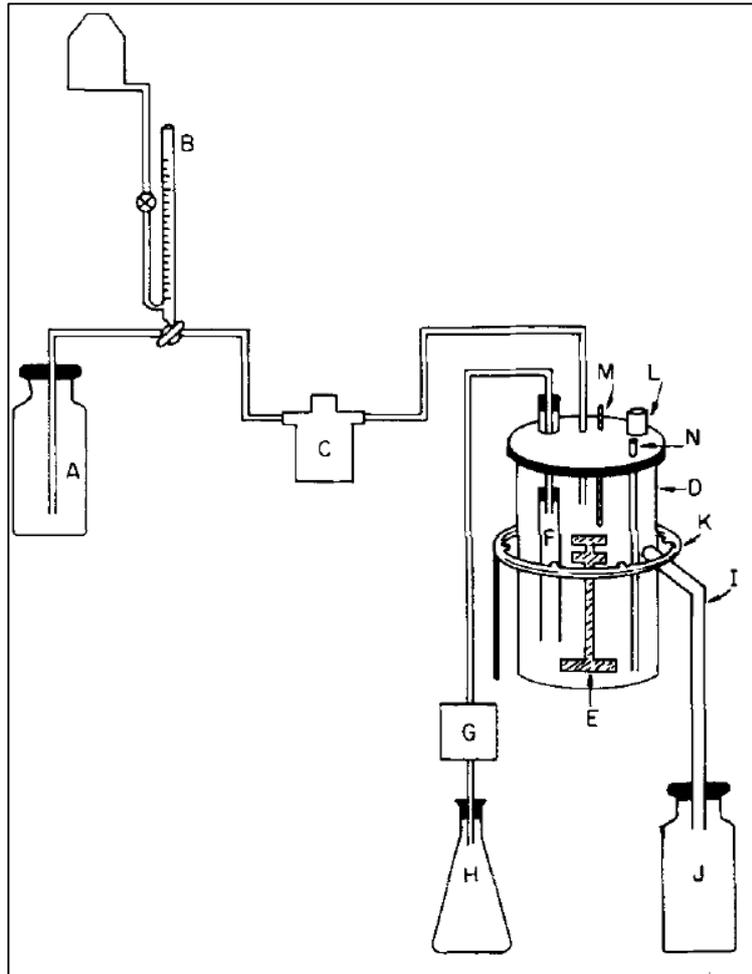
Le Rusitec présente néanmoins quelques inconvénients : l'utilisation de sachets limite la circulation des fluides et des déviations fermentaires sont possibles lors d'expériences de longue durée, ou en cas de fréquences de prélèvements trop élevées. Enfin, le fait de remplacer le substrat une seule fois par jour risque de sous alimenter le microbiote pendant une longue durée, à ce titre il est recommandé d'utiliser des substrats lentement dégradables ce qui peut induire un biais.

#### c. Le système « Dual flow continuous culture » (24)

Ce système, présenté en figure 10, comporte un réacteur de 4L maintenu à une température de 39°C à l'aide d'un système de pulvérisation d'eau chaude. Le réacteur est alimenté en continu en tampon (avec un taux de renouvellement de 5 à 10 % (41, 24) et en aliment. Il existe 2 sorties d'effluents : la première est une aspiration continue à travers un filtre, qui permet une évacuation des liquides (entre 50 et 60% du volume de tampon infusé

quotidiennement) ; la deuxième est effectuée par un système de trop-plein : les liquides en excès sont évacués entraînant avec eux des particules solides. L'inoculum est obtenu après filtration du contenu ruminal d'une vache canulée, il est directement placé dans le réacteur.

Les expérimentations sont effectuées sur 2 périodes d'une semaine. La première étape permet au microbiote de s'adapter au milieu. Les échantillonnages n'ont lieu que durant la deuxième étape : tous les effluents sont alors collectés.



**Figure 10 :** Dual Flow Continuous Culture System (24).

A : Tampon ; B : Burette graduée ; C : pompe péristaltique ; D : Fermenteur ; E : Agitateur magnétique ; F : Filtre ; H : Effluents filtrés ; I : Tubulure ; J : Réservoir des effluents de débordement ; K : système de pulvérisation d'eau chaude ; L : Entrée des aliments ; M : thermomètre ; N : entrée des gaz

Cette méthode permet d'obtenir, en comparant l'entrant et le sortant, des valeurs de dégradabilité, et d'effectuer des bilans de fermentation. Les valeurs de dégradabilité obtenues pour l'amidon, le NDF et les protéines sont comparables à celles obtenues *in vivo* (41).

Cependant cette technique reste lourde et onéreuse, il est difficilement envisageable de la mettre en pratique de façon systématique (60).

Par rapport aux systèmes fermés, ces deux systèmes permettent l'adaptation des microorganismes aux facteurs étudiés. En effet, ils évitent l'accumulation des produits de fermentation qui risque d'entraîner rapidement des déviations fermentaires. Ainsi, le risque de déviation fermentaire minimisé, il est donc possible de tester un substrat ou un traitement sur une durée plus longue.

Cependant l'administration continue de solution tampon s'éloigne de la physiologie : en effet la salivation a principalement lieu lors du repas et de la rumination.

Ces différentes méthodes (batch et cultures en système ouvert) mesurent les activités bactériennes de l'inoculum. D'autres méthodes existent et permettent d'évaluer uniquement l'action des enzymes présentes dans l'inoculum au moment du prélèvement.

#### 4. Les méthodes de dosage de l'activité enzymatique (47,48)

Pour doser l'activité enzymatique, il est nécessaire de stopper les activités de synthèse enzymatique des bactéries et de conserver les enzymes de l'inoculum actives. Pour ce faire, plusieurs méthodes de traitement de l'inoculum sont envisageables.

Les techniques classiques utilisées sont la congélation, la sonification et la centrifugation. Ces traitements vont rompre les membranes et parois bactériennes et libérer leur contenu dans le milieu. Cela permet de doser l'activité enzymatique des enzymes intra- et extra-cellulaires mais les enzymes membranaires sont détruites. Il est également possible de mettre l'inoculum à incuber dans du chloramphénicol : celui-ci est un inhibiteur de la synthèse protéique chez les procaryotes : il va stopper les activités bactériennes sans altérer les enzymes membranaires. On mesurera alors l'action des protéines extra-cellulaires et membranaires. L'activité des enzymes intracellulaires n'est pas dosée. Cette préparation est ensuite placée avec

un substrat puis mise à incuber. Comme pour la technique dite « batch », la différence entre les états initiaux et finaux permet de mettre en évidence une disparition du substrat (cellulose, amidon, protéine) et/ou une apparition de produits (glucose, acides aminés). Il est alors possible d'estimer l'activité enzymatique d'un inoculum.

Les techniques *in vitro* reposent donc actuellement sur les incubations de type « batch » et sur les cultures continues de contenu ruminal. Les premières sont de courtes durées, il est donc difficile de mettre en évidence des facteurs de variations à long terme. Les cultures continues sont lourdes et coûteuses.

L'objectif de cette étude est de mettre au point une culture de contenu ruminal de type « batch », de longue durée (96h), avec renouvellement de substrat et de tampon. Cela permettrait de tester les effets à long terme de certains traitements sur les digestions ruminales.

SECONDE PARTIE :  
ETUDE EXPERIMENTALE



## I. MATERIEL ET METHODE

### A. Expérimentations

Pour notre étude, nous avons réalisé des cultures de type « batch » sur 5 jours. Mais contrairement à des cultures batch classiques, nous avons mis en place un renouvellement du milieu, toutes les 12 h, afin de mimer la vidange gastrique ainsi que l'apport d'aliment et de salive dans le rumen. Durant cette phase de culture, nous évaluerons l'intensité des activités microbiennes par la mesure du pH et des concentrations en AGV et en NH<sub>3</sub>.

Les activités microbiennes de l'inoculum à J1 et du contenu des cultures à J5 seront comparées à l'aide d'incubations sur 8h, ceci afin de vérifier le maintien de l'efficacité fermentaire du microbiote.

Nous comparerons également les activités enzymatiques en début et fin de culture. Ce type de mesure nécessite un traitement préalable au chloramphénicol (inhibiteur de synthèse protéique) de 5h.

Le protocole présenté a été réalisé sur 2 semaines consécutives.

#### 1. Substrats, solution tampon et inoculum

Les substrats utilisés sont le son de blé, le foin, et les graines de soja. Ils ont été broyés à 0,5 mm avec un broyeur Restch<sup>®</sup>. Chaque aliment a été échantillonné pour mesurer ses teneurs en MS, MAT, CB, MG, Mm, NDF et amidon (tableau 4). Les profils d'AG de chaque aliment ont également été réalisés : ils expriment le pourcentage d'un AG particulier par rapport aux AGT (tableau 5).

		Son de blé	Graines de soja	Foin
MS	(g/kg)	898,9	932,2	919,7
MAT	(g/kg MS)	169	479	72,8
CB	(g/kg MS)	133,1	63,5	358,1
MG	(g/kg MS)	49,5	209,4	22,1
Mm	(g/kg MS)	64	56,3	62,5
NDF	(g/kg MS)	482,8	138,7	635,5
Amidon	(g/kg MS)	124,3	-	-

**Tableau 4 :** Composition chimique des substrats utilisés.

		Son de blé	Graines de soja	Foin
C14:0	(% )	0,124027	0,106588	1,167084
C16:0	(%)	17,295198	10,898635	19,06122
C18:0	(%)	0,942335	4,186567	1,885462
c9-C18:1	(%)	14,031831	19,61911	3,586205
c9c12-C18:2	(%)	54,318508	50,865391	10,885424
c9c12c15-C18:3	(%)	4,275181	6,610539	14,889798

**Tableau 5 :** Profils en acides gras des substrats utilisés.

La solution tampon est préparée au maximum 24h avant utilisation et conservée au réfrigérateur. Il s'agit d'un tampon bicarbonate à pH = 7. Les minéraux nécessaires à la croissance microbienne ont été ajoutés dans ce tampon. Avant utilisation, elle est réchauffée à une température de 39°C et saturée en CO<sub>2</sub> afin de garantir les conditions d'anaérobiose. La composition de la solution tampon est détaillée dans le tableau 6.

Composants	Concentration (g/L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	19,5
NaHCO <sub>3</sub>	9,24
NaCl	0,705
KCl	0,675
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,108
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,180

**Tableau 6 :** Composition de la solution tampon

L'inoculum est prélevé avant le repas du matin sur deux vaches de race Prim'Holstein présentant une canule ruminale. Le contenu ruminal est filtré à l'aide d'un tamis de 1,6 mm. Les inoculums de chaque vache sont conditionnés dans deux bouteilles séparées puis rapidement acheminés à l'ENVT avec un maintien constant des conditions de température et d'anaérobiose. Ces vaches sont alimentées avec du foin à volonté et 2 kg d'un concentré du commerce, PASSIO<sup>®</sup> VL 3L dont la composition est détaillée dans le tableau 7.

MS (g/kg)	(g/kg)	890
MAT	(g/kg MS)	220
CB	(g/kg MS)	78
MG	(g/kg MS)	39
Mm	(g/kg MS)	90
NDF	(g/kg MS)	258
Amidon	(g/kg MS)	180

**Tableau 7 :** Composition du PASSIO<sup>®</sup> VL 3L.

## 2. Cultures

Chaque semaine, 8 cultures (4 par vache) ont été réalisées, soit un total de 16 cultures.

Le premier jour, 1,25 g de son de blé, 1 g de foin et 0,25 g de graines de soja sont mélangés à 100 mL d'inoculum et 100 mL de solution tampon dans des erlenmeyers. Ces derniers sont ensuite disposés dans un bain-marie rotatif (AQUATRON<sup>®</sup>, Infors AG, Allemagne) à 130 tr/min et dans l'obscurité. Afin de garantir les conditions d'anaérobie, les erlenmeyers sont saturés en CO<sub>2</sub> puis refermés. Néanmoins, une tubulure relie directement l'erlenmeyer à l'eau du bain-marie, ainsi les gaz produits sont évacués alors qu'aucun gaz extérieur ne peut rentrer. Une deuxième tubulure permet de renouveler le contenu, celle-ci est fermée durant l'incubation.

Toutes les 12h, après agitation des erlenmeyers, 100 mL de contenu sont prélevés via la tubulure prévue à cet effet puis transférés dans un pot qui est plongé immédiatement dans la glace afin de stopper les activités bactériennes. Ensuite, 100 mL de solution tampon et les mêmes substrats (1,25 g de son de blé, 1 g de foin et 0,25 g de graines de soja) sont ajoutés dans chaque erlenmeyer. Le taux de renouvellement du contenu des erlenmeyers est ainsi de 6% par heure. Dans chaque pot placé dans la glace, le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre (pH<sub>330</sub><sup>®</sup>, Cofralab, France) à une température comprise entre 5 et 10°C, et deux échantillons de 5mL sont prélevés. Ces derniers serviront à mesurer les concentrations en AGV et en NH<sub>3</sub>. Cette opération est réalisée 7 fois à 12 h d'intervalle, de J1 au soir à J4 au soir.

## 3. Mesure des activités microbiennes

### Mesure des activités microbiennes à J1

Le premier jour, 4 incubations de 8h (2 par vaches) sont réalisées : 100 mL d'inoculum et 100 mL de solution tampon sont ajoutés à 2,5 g de son de blé et 0,5 g de graines de soja dans un erlenmeyer. Comme pour les cultures, les conditions de température, d'anaérobie, d'obscurité et d'agitation mécanique (130 tr/min) sont respectées. Après avoir incubé 8 heures, l'erlenmeyer est placé dans la glace, le pH est mesuré, et l'ensemble du contenu est placé dans un pot taré.

De plus, 4 échantillons (2 par vache) contenant 100 mL d'inoculum, 100 mL de solution tampon et du substrat (0,5 g de graines de soja et 2,5 g de son de blé) sont réalisés. Ils ne sont pas mis à incuber. Ce sont les blancs non incubés (BNI). Ils correspondent à l'état initial avant incubation. Le pH de ces derniers est mesuré. Deux tubes de 5 mL par BNI sont prélevés pour mesure des concentrations en AGV et en NH<sub>3</sub>.

Le tableau 8 présente la composition du mélange de substrats (2,5 g de son de blé et 0,5 g de graines de soja) utilisé pour les mesures d'activités microbiennes, enzymatiques et les études *in sacco*. Les quantités d'AGT ont été calculées en considérant que les rapports entre les quantités d'AGT et celles de MG, pour les graines de soja et pour le son de blé sont respectivement égaux à 0,95 et 0,8. Les quantités d'AG ont été calculées à l'aide des profils d'AG des aliments.

		Son de blé	Graines de soja	<b>Substrat (Son et Graines)</b>
Quantité	(g)	2,5	0,5	<b>3</b>
MAT	(mg)	380	223	<b>603</b>
Azote	(mg)	61	36	<b>97</b>
NDF	(mg)	1085	65	<b>1150</b>
Amidon	(mg)	279	-	<b>279</b>
MG	(mg)	111	97,6	<b>209</b>
AGT	(mg)	89	93	<b>182</b>
C14:0	(mg)	0,11	0,099	<b>0,21</b>
C16:0	(mg)	15,4	10,1	<b>25,5</b>
C18:0	(mg)	0,84	3,9	<b>4,7</b>
c9-C18:1	(mg)	12,5	18,2	<b>30,7</b>
c9c12-C18:2	(mg)	48,3	47,2	<b>95,5</b>
c9c12-c15-C18 :3	(mg)	3,8	6,1	<b>9,9</b>

**Tableau 8 :** Quantités initiales en glucides, protéines, matières grasses et acides gras apportées par le mélange de son et de graines de Soja.

### Mesure des activités microbiennes à J5

Le cinquième jour, les contenus des 4 cultures dont l'inoculum provient de la même vache laitière sont réunis, et 4 incubations de 8h (2 par vaches) sont réalisées suivant le même protocole qu'à J1, si ce n'est que l'on remplace l'inoculum par le mélange des cultures de 5 jours. Comme à J1, 4 BNI (2 par vache laitière) sont réalisés.

### Etude *in sacco* à J1

Afin de s'assurer des capacités de dégradation de notre inoculum de départ, une étude *in sacco* a été réalisée à J1 et servira de référence. A cet effet, 6 sachets de nylon préalablement pesés et identifiés (3 par vache laitière) sont remplis des mêmes substrats (2,5 g de son de blé et 0,5 g de graines de soja). Les pores de ces sachets mesurent 50 µm. Les sachets sont fermés à l'aide d'un élastique, puis ont été suspendus dans le rumen des vaches donneuses durant 8 heures.

## 4. Mesure des activités enzymatiques

L'objectif de cette méthode est de mesurer uniquement l'activité des enzymes présentes dans l'inoculum ou le milieu de culture.

### Mesure des activités enzymatiques à J1

Pour inactiver les bactéries, 2 erlenmeyers (un par vache) contenant 320 mL d'inoculum et 320 mg de chloramphénicol sont mis à incuber pendant 5 heures, en anaérobiose, à 39°C.

Puis, 4 incubations de 3h (2 par vache) et 2 BNI (1 par vache) ont alors été réalisés à partir de 100 mL d'inoculum traité au chloramphénicol, de 100 mL de solution tampon et de substrat (2,5 g de son de blé et 0,5 de graines de soja).

### Mesure des activités enzymatiques à J5

Pour inactiver les bactéries des cultures de J5, 2 erlenmeyers (un par vache) contenant 320 mL de contenu des cultures et 320 mg de chloramphénicol sont mis à incuber pendant 5 heures, en anaérobiose, à 39°C.

De même qu'à J1, 4 incubations de 3h (2 par vache) et 2 BNI (1 par vache) ont alors été réalisés à partir de 100 mL de contenu des cultures traités au chloramphénicol, de 100 mL de solution tampon et de substrat (2,5 g de son de blé et 0,5 de graines de soja).

Il s'agit d'un premier essai de mesure des activités enzymatiques fibrolytique, amylolytique et protéolytique sur un substrat alimentaire et avec utilisation de chloramphénicol. C'est pourquoi, à J1, une mesure d'activité microbienne de 3h a été réalisée pour comparaison et référence, selon les mêmes modalités que les cultures de 8h.

## B. Préparation des échantillons collectés

### 1. Matières premières

Les matières premières sont broyées en particules de 0,5 mm avant analyse. Les teneurs en MS, en CB, en NDF, en amidon, en MAT et en différents AG ont été évaluées.

### 2. Echantillons prélevés lors des cultures pour le dosage de NH<sub>3</sub> et d'AGV

Les 5 mL de contenu sont mélangés à 0,16 mL d'acide sulfurique à 50% dans un tube de prélèvement, celui-ci est alors placé au congélateur. Ces échantillons serviront à évaluer les teneurs en AGV et en NH<sub>3</sub> des cultures.

### 3. Echantillons prélevés pour la mesure des activités microbiennes

Les pots tarés sont placés au congélateur puis le contenu est lyophilisé (Virtis Freezemobile<sup>®</sup> 25, Virtis, USA) durant environ 8 jours. Ils sont ensuite mis à l'étuve durant 3 jours et au dessiccateur durant 30 minutes afin d'éliminer l'eau résiduelle et le NH<sub>3</sub>. Les pots sont enfin pesés pour évaluer la teneur en MS de l'échantillon.

Afin de garantir une représentativité de la prise d'essai de l'analyse, leur contenu est homogénéisé à l'aide d'un broyeur à bille (Dangoumau<sup>®</sup>, Prolabo, France). Ces échantillons nous permettront d'évaluer les quantités de NDF, d'amidon, de MAT et d'AG.

#### 4. Traitement des sachets de nylon

Les sachets de nylon sont lavés à la machine à deux reprises puis séchés à l'étuve (3 jours à 55°C) et pesés : on obtient donc la teneur en MS. Enfin, ils sont homogénéisés à l'aide d'un broyeur à bille. Ces échantillons nous permettront d'évaluer les quantités de NDF, d'amidon, de MAT et d'AG.

#### C. Analyses chimiques

##### 1. Dosage des acides gras volatils

Ils sont dosés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). L'étalon interne utilisé est de l'acide 4 méthylvalérique à 2% (v/v). Cette méthode permet de déterminer rapidement la concentration en AGV dans l'échantillon, et d'en déduire les proportions des différents AGV pour évaluer de façon quantitative et qualitative les fermentations du milieu de culture.

##### 2. Dosage de l'ammoniac

Ce dosage repose sur la réaction de Berthelot. Il a été effectué sur une chaîne à flux continu (SAN++, Skalar®, Breda, Pays-Bas) dans les laboratoires de l'UMR 1248 AGIR du centre INRA de Auzeville-Tolosane.

### 3. Dosage de la MAT

La méthode officielle NF V18-100 (AFNOR, 1997) a été réalisée. Celle-ci correspond à la méthode Dumas et a été effectuée sur le site de l'INRA d'Auzeville-Tolosane. L'analyseur Leco FP 428<sup>®</sup> a été utilisé. Un échantillon de 130 mg est placé dans une feuille d'étain, celui-ci est alors brûlé dans l'analyseur. L'azote gazeux formé est mesuré par conductimétrie thermique. On obtient alors une teneur en azote. Pour avoir une valeur de MAT, il faut multiplier cette valeur par le coefficient de 6,25.

### 4. Dosage de l'amidon

La méthode officielle NF V18-121 (AFNOR, 1997) a été réalisée. L'analyse repose sur 4 étapes : le lavage, la dispersion, l'hydrolyse et le dosage. Les lavages à l'éthanol permettent l'élimination des sucres simples. La dispersion à la soude permet l'extraction de l'amidon des tissus. L'hydrolyse de l'amidon en glucose est réalisée à l'aide d'amyloglucosidases. Par le dosage du glucose à l'aide d'une méthode colorimétrique, on obtient une teneur en amidon de l'échantillon.

### 5. Dosage des glucides pariétaux

La méthode officielle NF V18-122 (AFNOR, 1997) repose sur la technique de Van Soest (66) qui mesure la valeur de NDF grâce à une solution détergente neutre.

### 6. Dosage des AG

Ce dosage est composé de deux étapes : l'extraction-méthylation des acides gras, suivie de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

La méthode utilisée est celle de Park et Goins (53), sauf que la solution de trifluorure de brome à 14% dans du méthanol est remplacée par une solution de méthanolacétylchlorure, et après addition d'un étalon interne (C19:0). Cette méthode repose sur une double méthylation :

une en milieu basique pour les acylglycérols, et une en milieu acide pour les AG libres, les phospholipides et les esters de cholestérol. Elle permet de minimiser l'isomérisation des CLA, inévitable lors d'extraction-méthylation. Ce procédé est présenté en figure 11.

- Peser dans un tube en verre pyrex de 20 mL, 100 mg d'échantillon.
- Ajouter 200  $\mu$ L de dichlorométhane, 200  $\mu$ L d'étalon interne (C19:0 à 4mg/mL dans du dichlorométhane) et 2 mL de soude méthanolique à 2 % préparée extemporanément.
- Mélanger au vortex (MS2 minishaker IKA®, Allemagne), 1 min à 1400 tr/min.
- Chauffer le tube pendant 10 min à 90°C dans un bain thermostaté puis rapidement refroidir 6 min, sous l'eau froide.
- Ajouter 3 mL de solution d'acétylchlorure méthanolique à 5% préparée extemporanément, et agiter au vortex 1 min à 1400 tr/min.
- Chauffer le tube pendant 10 min à 80°C dans un bain thermostaté puis rapidement refroidir 6 min, sous l'eau froide.
- Ajouter 5 mL d'eau ultra-pure et 1,6 mL d'hexane, puis mélanger pendant 5 min au culbuteur (Rotator drive STR 4®, Stuart scientifique, OSI, France) et centrifuger 10 min à 4000g (3K15 Sigma Laboratory centrifuges, Osterode am Harz, Allemagne).
- Récupérer la phase hexanoïque (2mL) renfermant les méthyl esters et la répartir dans deux flacons de 2 mL à sertir. Cet extrait est ensuite analysé en chromatographie en phase gazeuse.

**Figure 11 :** Extraction méthylation des acides gras.

L'identification et la quantification des AG sont réalisées à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse (Agilent 6890N®, Network GC System, USA) équipé d'un autoinjecteur (7693, Network GC System, USA), d'une colonne capillaire en silice (0.25 mm ID, 0.20 mm d'épaisseur de film, CPSil88, Chrompack-Varain, Pays-Bas) et d'un FID. Deux passages sont réalisés pour isoler un maximum d'isomères. Les chromatogrammes obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel Peak Simple®. Les données obtenues sont exprimées en mg d'AG/mL de solution hexanoïque injectée et corrigée par l'étalon interne. Elles sont ensuite rapportées à la masse de la prise d'essai, soit une expression finale en mg d'AG par échantillon. La figure 12 présente les deux méthodes de passage.

**Méthode 1**Conditions de passage

Température de l'injecteur : 255°C  
Température du FID : 260°C  
Split ratio : 1/50  
Volume injecté : 1 µL  
Gaz porteur : H<sub>2</sub>, débit constant  
(1 mL/mm)

Programme de températures

Température initiale (°C)	Durée (min)	Rampe (°C/min)	Température finale (°C)
60	2	8	150
150	12	2	175
175	20	5	225
225	10	5	240
240	10	0	240

**Méthode 2**Conditions de passage

Température de l'injecteur : 255°C  
Température du FID : 260°C  
Split ration : 1/75  
Volume injecté : 0,5 µL  
Gaz porteur : H<sub>2</sub>, débit constant  
(1 mL/mm)

Programme de températures

Température initiale (°C)	Durée (min)	Rampe (°C/min)	Température finale (°C)
60	3	8	190
190	13	5	225
225	10	10	230
230	1	0	230
60	3	8	190

**Figure 12** : Chromatographie en phase gazeuse - méthodes de passage.

#### D. Calculs réalisés

Les quantités finales d'azote, de NDF, d'amidon et des différents AG sont exprimées en mg par sachet de nylon (pour les études *in sacco*) ou en mg par pot (pour les études *in vitro*) ; les profils des AG dans les *in sacco* et les cultures *in vitro* sont exprimés en pourcentages par rapport aux AGT.

Concernant l'azote, il est important de noter que dans notre étude, l'azote dosé correspond à l'azote total sans le NH<sub>3</sub>.

Les quantités initiales pour les études *in sacco* correspondent aux matières premières utilisées pour le substrat (2,5g de son de blé et 0,5g de graines de soja).

Les quantités initiales des études *in vitro* correspondent aux moyennes des quantités mesurées dans les BNI.

Les pourcentages de disparition ont été calculés de la manière suivante :

$$\text{Pourcentage de disparition} = \frac{\text{quantité initiale} - \text{quantité finale}}{\text{quantité initiale}}$$

Certains AG ont été regroupés dans différents ensembles, présentés dans la figure 13.

OBCFA	= C13:0 + iso-C13:0 + anteiso-C13:0 + iso-C14:0 + C15:0 + iso-C15:0 + anteiso-C15:0 + C17:0 + iso-C17:0 + anteiso-C17:0
CLA	= c9t11-C18:2 + t9t11-C18:2 + t10c12-C18:2
C18:1t	= t4-C18:1 + t5-C18:1 + t6-C18:1 + t7-C18:1 + t8-C18:1 + t9-C18:1 + t10-C18:1 + t11-C18:1 + t12-C18:1 + t13-C18:1 + t14-C18:1 + t15-C18:1 + t16-C18:1
T11	= c9t11-C18:2 + t9t11-C18:2 + t11-C18:1
T10	= t10c12-C18:2 + t10-C18:1

**Figure 13** : Détail des calculs des valeurs des OBCFA, des CLA, des C18:1t, des T11 et des T10.

## E. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le modèle linéaire général de SYSTAT® (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago, IL) selon le modèle présenté en figure 14.

Variable = moyenne + effet « semaine » + effet « vache » + effet « *in vitro* J1 8h vs. *in sacco* »  
ou effet « *in vitro* J1 3h vs. enzymo J1 3h »  
ou effet « *in vitro* J1 8h vs. *in vitro* J5 8h »  
ou effet « enzymo J1 3h vs. enzymo J5 3h »

**Figure 14 :** Modèle statistique utilisé.

Les différences ont été considérées comme significatives pour  $P < 0,05$ .

## II. RESULTATS ET DISCUSSION

### A. Comparaison des études *in sacco* et des mesures des activités bactériennes *in vitro* sur 8 heures à J1

Dans cette partie nous comparons les mesures d'activités microbiennes *in vitro* de J1 avec les résultats obtenus *in sacco* afin de vérifier les capacités fermentaires de notre inoculum et d'évaluer si les fermentations *in vitro* reproduisent les conditions ruminales. Nous nous intéresserons tout d'abord aux glucides et à l'azote, puis aux lipides.

#### 1. Dégradation de l'azote et des glucides

##### a. Résultats

Le tableau 9 présente les quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon dans ces 2 études.

Quantité (mg)		<i>In sacco</i>	<i>In vitro</i>	ECTM	P
Azote	Initiale	97	174	-	-
	Finale	13	152	6	<0,001
NDF	Initiale	1150	1674	-	-
	Finale	649	1203	32	<0,001
Amidon	Initiale	279	381	-	-
	Finale	3	219	11	<0,001

**Tableau 9** : Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon, entre les études *in sacco* et *in vitro*, de 8h à J1.

ECTM : écart type à la moyenne.

On peut tout d'abord observer que les quantités initiales d'azote, de NDF et d'amidon sont plus importantes dans les *in vitro* que dans les *in sacco*.

Concernant les glucides, la dégradation est plus importante avec la technique *in sacco* qu'avec la technique *in vitro*. En effet, *in sacco*, les taux de disparition de l'amidon et du NDF sont respectivement de 99% et 44%, tandis qu'*in vitro*, ils sont respectivement de 43% et 28%. La dégradation des glucides est donc environ 2 fois moins importante *in vitro* qu'*in sacco*.

Concernant l'azote, le pourcentage de disparition est plus de 6 fois supérieur dans les *in sacco* que dans les *in vitro* (87% contre 13 %).

#### b. Discussion

Tout d'abord, la différence des quantités initiales d'azote, de NDF et d'amidon entre les deux études s'explique par le fait qu'*in vitro*, une partie des nutriments est apportée par l'inoculum : environ 75 mg d'azote, 500 mg de NDF et 100 mg d'amidon.

Pour les glucides, il est possible d'expliquer les plus faibles pourcentages de disparition des *in vitro* par un retard lié à un temps d'adaptation du microbiote avant la reprise de ses activités. En effet, les conditions d'anaérobiose en début d'expérimentation ne sont pas tout à fait respectées : lors du prélèvement et des manipulations, le potentiel d'oxydoréduction du fluide ruminal augmente, ce qui freine les digestions. Une étude (32) a montré que lors d'études *in vitro*, le potentiel d'oxydoréduction est supérieur à celui mesuré lors d'études *in vivo* pendant environ deux heures, puis les potentiels d'oxydoréduction respectifs retrouvent le même ordre de grandeur. Ainsi, *in vitro*, les fermentations commenceraient deux heures plus tard environ, ce qui entraînerait un retard de dégradation par rapport à l'*in sacco*. Les fermentations *in vitro* sont néanmoins suffisantes pour étudier les effets de facteurs de variation sur la dégradation des glucides, en réfléchissant bien aux durées d'incubation.

Concernant les protéines, un temps de latence adaptatif ne peut pas expliquer à lui seul une telle différence de pourcentages de disparition de l'azote. Cependant, il est important de noter que nous dosons ici l'azote total sauf l'ammoniac : *in vitro*, cette valeur correspond aux acides aminés, aux oligopeptides, aux protéines du substrat et également aux protéines synthétisées par le microbiote ; *in sacco*, les acides aminés et les oligopeptides ont diffusé à l'extérieur du sachet, de plus, les synthèses microbiennes n'ont eu lieu qu'en partie à l'intérieur du sachet. Cela pourrait expliquer une telle différence de pourcentages de disparition. Cette

méthode *in vitro* ne permet donc pas d'estimer la dégradation des protéines : c'est pourquoi l'*in sacco* reste la technique de choix pour l'étude de la dégradation des protéines. Une alternative de ce modèle *in vitro* serait de placer les substrats dans un sachet, plongé dans le milieu de culture. Les protéines non dégradées resteraient dans le sachet, tandis que les acides aminés et oligopeptides diffuseraient à l'extérieur du sachet et les synthèses protéiques bactériennes auraient lieu principalement en dehors du sachet. Il est également important de noter que l'inoculum apporte une fraction protéique peu dégradable. Celle-ci se retrouve en grande partie en fin d'incubation : elle va donc contribuer à une valeur de pourcentage de dégradation inférieur pour l'*in vitro* par rapport à l'*in sacco*.

## 2. Biohydrogénation

### a. Résultats

Le tableau 10 présente les quantités finales d'AGT et des principaux AG, ainsi que les pourcentages de disparition du c9c12-C18:2.

Le pourcentage de disparition du c9c12-C18:2 est plus important *in sacco* qu'*in vitro*. De plus, tous les AG sont en quantité plus faible *in sacco* qu'*in vitro* : cela s'explique par deux phénomènes. Tout d'abord, les quantités initiales en AG sont supérieures *in vitro* qu'*in sacco* (respectivement 250 mg et 182 mg) car il faut tenir compte des AG apportés par l'inoculum. Ensuite, *in sacco*, il y a diffusion à l'extérieur du sachet des AG libres après lipolyse. C'est pourquoi, pour comparer ces deux méthodes, il faut s'intéresser aux profils d'AG dans les milieux étudiés.

		<i>In sacco</i>	<i>In vitro</i>	ECTM	P
Quantités finales (mg)	AGT	38,4	265	7,69	<0,001
	OBCFA	0,29	10,5	0,31	<0,001
	C12:0	0,014	0,42	0,011	<0,001
	C14:0	0,10	2,7	0,082	<0,001
	C16:0	6,9	38,8	1,24	<0,001
	C16:1	0,047	0,23	0,010	<0,001
	C18:0	1,6	72,6	2,22	<0,001
	c9-C18:1	6,5	19,6	0,96	<0,001
	c9c12-C18:2	13,2	38,2	2,33	<0,001
	c9c12c15- C18:3	1,2	6,1	0,34	<0,001
	CLA	0,41	0,92	0,053	<0,001
	C18 :1t	2,5	29,1	0,645	<0,001
	T10	0,16	1,8	0,077	<0,001
T11	2,5	21,7	0,47	<0,001	
Disparition (%)	c9c12-C18:2	86	55	2,5	<0,001

**Tableau 10 :** Comparaison des quantités finales en AG et du pourcentage de disparition du c9c12-C18:2, entre les études *in sacco* et *in vitro*, de 8h à J1.

*ECTM : écart type à la moyenne*

Le tableau 11 présente les proportions finales d'AG *in sacco* et *in vitro*.

Les proportions de C16:0, C16:1, c9-C18:1, c11-C18:1, c9c12-C18:2, c9c12c15-C18:3 et CLA sont supérieures *in sacco* par rapport à l'*in vitro*, tandis que les proportions de C12:0, C14:0, OBCFA, C18:0 et C18:1t sont supérieures *in vitro*. Il n'y a pas de différence significative des proportions de T10 et T11 entre l'*in sacco* et l'*in vitro*.

		In sacco	In vitro	ECTM	P
Pourcentages finaux d'AG	OBCFA	0,84	3,93	0,059	<0.001
	C12:0	0,042	0,16	0,004	<0.001
	C14:0	0,29	1,0	0,019	<0.001
	C16:0	18,3	14,6	0,31	<0.001
	C16:1	0,12	0,085	0,004	<0.001
	C18:0	4,55	27,2	0,45	<0.001
	c9-C18:1	16,5	7,5	0,40	<0.001
	c11-C18:1	1,37	0,79	0,017	0.642
	c12-C18:1	0,16	0,17	0,021	<0.001
	c15-C18:1	0,016	0,050	0,003	<0.001
	c9c12-C18:2	32,4	14,5	1,4	<0.001
	c9c12c15-	2,9	2,28	0,112	<0.001
	CLA	1,16	0,35	0,085	<0.001
	C18:1t	7,74	11,0	0,94	0.016
	T10	0,51	0,66	0,08	0.167
T11	7,5	8,18	0,784	0.531	

**Tableau 11** : Comparaison des profils d'AG entre les études *in sacco* et *in vitro*, de 8h à J1.

ECTM : écart type à la moyenne

## b. Discussion

Les C16:0, C16:1, c9-C18:1, c11-C18:1, c9c12-C18:2 et c9c12c15-C18:3 sont les AG apportés par le substrat et notamment les graines de soja : ces AG sont probablement présents dans le sachet après application car il reste dans le sachet essentiellement les structures végétales qui n'ont pas été totalement dégradées.

Le C18:0 correspond au produit final de la biohydrogénation. *In vitro*, il s'accumule, alors qu'*in sacco*, il diffuse à travers les pores du sachet. Les faibles quantités retrouvées *in sacco* peuvent correspondre au C18:0 présent initialement dans le substrat.

Le C12:0, C14:0 et les OBCFA correspondent aux AG résultant de la synthèse microbienne. Il est donc normal de les retrouver en plus fortes proportions dans les incubations *in vitro*. En effet, *in sacco*, les sachets sont congelés (ce qui entraîne une desadhésion partielle des bactéries liées aux particules alimentaires) et lavés, ainsi la majeure partie des bactéries sont évacuées.

Les différences de proportions de CLA et de C18:1t sont difficilement interprétables. En effet, il pourrait s'agir d'une simple dilution liée à l'accumulation de C18:0 *in vitro*.

Le ratio T10/T11 n'étant pas affecté, on peut dire qu'il n'y a pas eu, *in vitro*, de déviation vers l'une ou l'autre de ces voies de la biohydrogénation.

On peut donc conclure que la méthode *in vitro* est plus adaptée aux études de la biohydrogénation car tous les AG sont conservés et donc mesurés. Pour ce qui est de l'amidon et du NDF, ces deux méthodes sont équivalentes, mis à part qu'il faut tenir compte du temps de latence avec la technique *in vitro*. Pour la dégradation des protéines, la méthode *in sacco* reste la méthode de référence.

## B. Comparaison des activités bactériennes et enzymatiques *in vitro* sur 3 heures

Les mesures des activités enzymatiques ont pour objectif d'évaluer les dégradations effectuées par les enzymes présentes uniquement au moment de la mise en incubation (et non des enzymes synthétisées, après la mise en incubation, par les microorganismes présents).

### 1. Dégradation de l'azote et des glucides

#### a. Résultats

Le pH final est le même dans les deux types de culture : 6,73.

Les quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon dans ces deux études ne présentent aucune différence significative (tableau 12). Cependant une grande variabilité a été observée entre les différents BNI.

Quantité (mg)		<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> (après traitement chloramphénicol)	ECTM	P
Azote	Initiale	174	184	-	-
	Finale	158	165	3	0,07
NDF	Initiale	1674	1686	-	-
	Finale	1535	1473	33	0,21
Amidon	Initiale	381	372	-	-
	Finale	364	394	19	0,29

**Tableau 12 :** Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon, entre les *in vitro* d'une durée de 3 h à J1, sans ou après traitement de 5h au chloramphénicol.

ECTM : écart type à la moyenne

#### b. Discussion

Les quantités initiales étant du même ordre, on peut conclure que le traitement de l'inoculum à l'étuve, en présence de chloramphénicol, stoppe rapidement la dégradation des aliments apportés par l'inoculum. D'autre part, le chloramphénicol inhibe donc bien l'activité microbienne car il n'y a probablement pas d'enzymes supplémentaires produites pendant les 5h d'incubation à l'étuve.

Les quantités finales permettent d'étudier la fraction d'aliment rapidement dégradable (en moins de 3 heures). Il n'y a pas de différence significative entre l'activité enzymatique et l'activité microbienne. Cela peut également s'expliquer par un temps de latence nécessaire aux bactéries pour pouvoir reprendre leurs activités de synthèse après la mise en culture. Dans les deux cas, la seule activité mesurée est donc celle due aux enzymes présentes au moment du prélèvement.

Une étude similaire, de Moharrery et Das (50), a évalué les activités enzymatiques d'inoculum ruminal sur les protéines, l'amidon et le NDF. Cependant, dans cette étude, le prélèvement d'inoculum est effectué 3 à 4 heures après le repas, sur des ovins, et un seul substrat par étude est utilisé. Pour l'activité protéolytique, le substrat est la caséine et 12 µg/h/mL de tyrosine sont libérés. La caséine contenant 6,5% de tyrosine, cela correspond à 185 µg/h/mL de caséine dégradée, soit 30 µg/h/mL d'azote dégradé (en appliquant le coefficient de 6,25). Pour

l'activité amylolytique, le substrat est l'amidon et 10 mg/h/mL de glucose sont libérés. Cela correspond à une dégradation de 10 mg/h/mL d'amidon. Pour l'activité cellulolytique, le substrat utilisé est un papier filtre cellulosique et 739 µg/h/mL de glucose est libéré, ce qui correspond à une dégradation de 0,7 mg/h/mL de cellulose.

Dans le cas de notre étude, avec et sans traitement au chloramphénicol, respectivement 16 mg et 19 mg d'azote ont été dégradés en 3h, dans 200 mL. Cela correspond à 27 µg/h/mL et 32 µg/h/mL d'azote dégradé, respectivement. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles décrites par Moharrery et Das. Il est cependant difficile d'effectuer une comparaison en raison des différences entre les deux protocoles.

De la même manière, dans notre étude, avec et sans traitement au chloramphénicol, on retrouve des vitesses de dégradation respectives de 0,23 mg/h/mL et 0,36 mg/h/mL pour le NDF et de 0,03 mg/h/mL et 0 mg/h/mL pour l'amidon. Si pour l'activité fibrolytique, les valeurs sont inférieures de moitié environ à celles de Moharrery et Das, l'activité amylolytique est quasiment absente dans nos milieux incubés 3h. Cela signifie que des enzymes fibrolytiques étaient présentes au moment du prélèvement mais en moindre quantité, et qu'il n'y avait que très peu d'enzymes amylolytiques. Contrairement à l'étude de Moharrery et Das, notre prélèvement a été effectué avant le repas et sur des vaches donneuses dont la ration est à base de foin (pauvre en amidon) : cela peut expliquer la faible quantité d'enzymes amylolytiques dans notre inoculum. Par ailleurs il est possible que l'activité amylolytique nécessite une stimulation par l'arrivée d'amidon dans le rumen, alors que les activités fibrolytiques et protéolytiques, en raison de substrats plus lentement dégradables donc à présence ruminale plus durable, maintiendraient un niveau de base constant plus élevé.

Les mesures d'activités enzymatiques présentent un intérêt dans le cas de notre étude, pour les protéines et le NDF. Il serait néanmoins intéressant de les effectuer avec des inoculums prélevés quelques heures après le repas des vaches donneuses (3 à 4h), afin de stimuler la synthèse d'enzymes avant le prélèvement.

*In vitro*, sans traitement au chloramphénicol, les pourcentages de disparition du NDF pour les durées d'incubation de 3h et de 8h, sont respectivement de 8% et 28% ; pour l'amidon, respectivement de 4% et 43%. Les fermentations sont donc peu efficaces 3h après la mise en

incubation. Cela soutient fortement l'hypothèse de la présence d'une phase de latence après mise en culture.

## 2. Biohydrogénation

### a. Résultats

Le tableau 13 présente les quantités finales des différents AG par pot. Les valeurs sont du même ordre de grandeur, cependant quelques différences sont observables : après traitement au chloramphénicol, le c9c12-C18:2, les C18:1t et les T10 sont plus nombreux et le rapport T10/T11 est deux fois plus élevé, tandis que le C18:0, les CLA et les T11 sont en quantités plus faibles.

		<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i> enzymo	ECTM	P
Pourcentages finaux d'AG	C12:0	0,40	0,38	0,010	0,1
	C14:0	2,4	2,2	0,058	0,061
	C16:0	39,9	40,1	0,12	0,001
	C16:1	0,28	0,27	0,003	0,21
	C18:0	45,9	36,1	0,70	<0,001
	c9-C18:1	27,8	28,3	0,17	0,062
	c11-C18 :1	2,3	2,3	0,024	0,90
	c12-C18 :1	0,37	0,37	0,019	0,929
	c15-C18 :1	0,11	0,116	0,005	<0,001
	c9c12-C18:2	70,1	77,1	0,34	<0,001
	c9c12c15-	9,5	9,9	0,14	0,035
	CLA	1,4	0,81	0,039	<0,001
	C18:1t	15,8	17,1	0,26	0,004
	T10	1,14	1,9	0,10	<0,001
	T11	11,7	9,1	0,33	<0,001
	T10/T11	0,10	0,21	-	-
OBCFA	8,9	8,6	0,18	0,29	

**Tableau 13** : Comparaison des profils d'AG entre les études *in vitro* d'une durée de 3 h à J1, sans ou après traitement de 5h au chloramphénicol.

ECTM : écart type à la moyenne ; enzymo : après traitement de l'inoculum au chloramphénicol

### b. Discussion

Tout d'abord, avec traitement au chloramphénicol, le C18:0 est en quantité plus faible après incubation, tandis que le c9c12-C18:2 est en quantité plus forte. On peut en déduire que

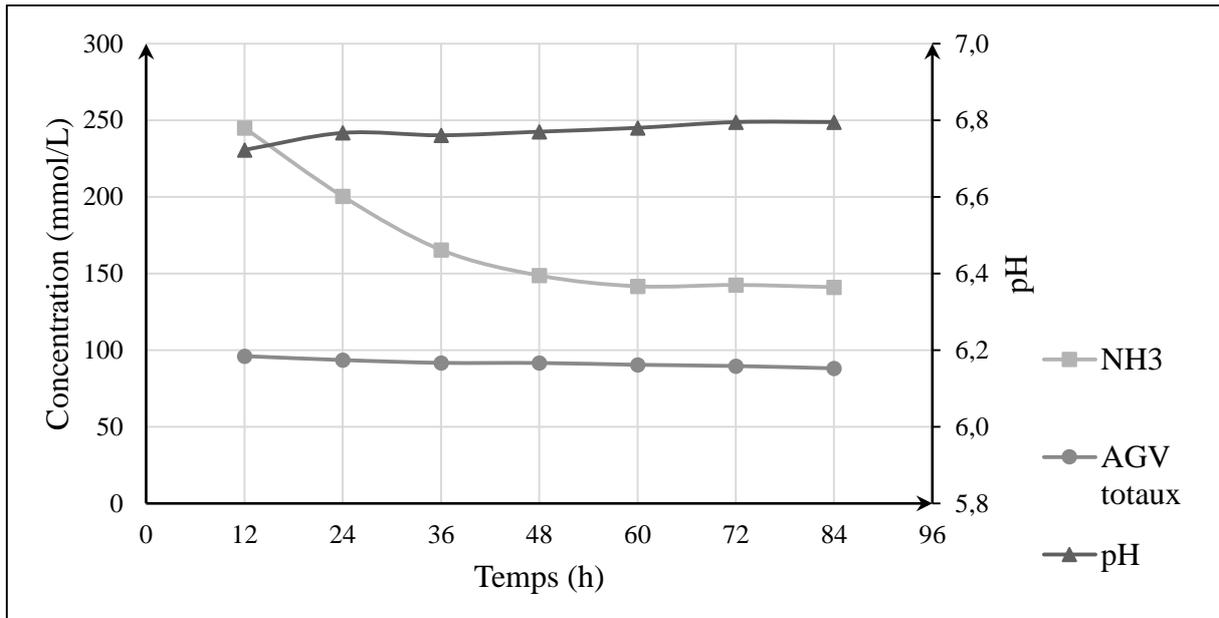
la biohydrogénation est moins avancée. De plus, le ratio T11/T10 indique qu'avec traitement au chloramphénicol, la voie T11, en général préférentielle, est atténuée. Cela peut s'expliquer de la façon suivante : la  $\Delta$ 12-isomérase étant non recyclable (36), et le chloramphénicol inhibant sa synthèse, cette enzyme serait rapidement épuisée. Ainsi, les autres voies seraient favorisées, et par l'intermédiaire de la  $\Delta$ 9-isomérase, de plus grandes quantités de T10 (dont le t10c12-C18:2) sont produites. La voie T11 étant inhibée, on obtient moins de c9t11-C18:2 et de t9t11-C18:2 (CLA majoritaires) et donc moins de CLA en général, car la voie T10 est moins efficace surtout dans ces conditions de pH proche de 7, cela explique également la disparition moindre de c9c12-C18:2.

Enfin, avec le chloramphénicol, une accumulation de C18:1t est observée. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la deuxième réduction serait moins efficace sur les autres C18:1t que sur le t11-C18:1. La moindre isomérisation de c9c12-C18:2 et la moindre réduction des C18:1t expliquent la moindre production de C18:0 dans les mesures d'activités enzymatiques.

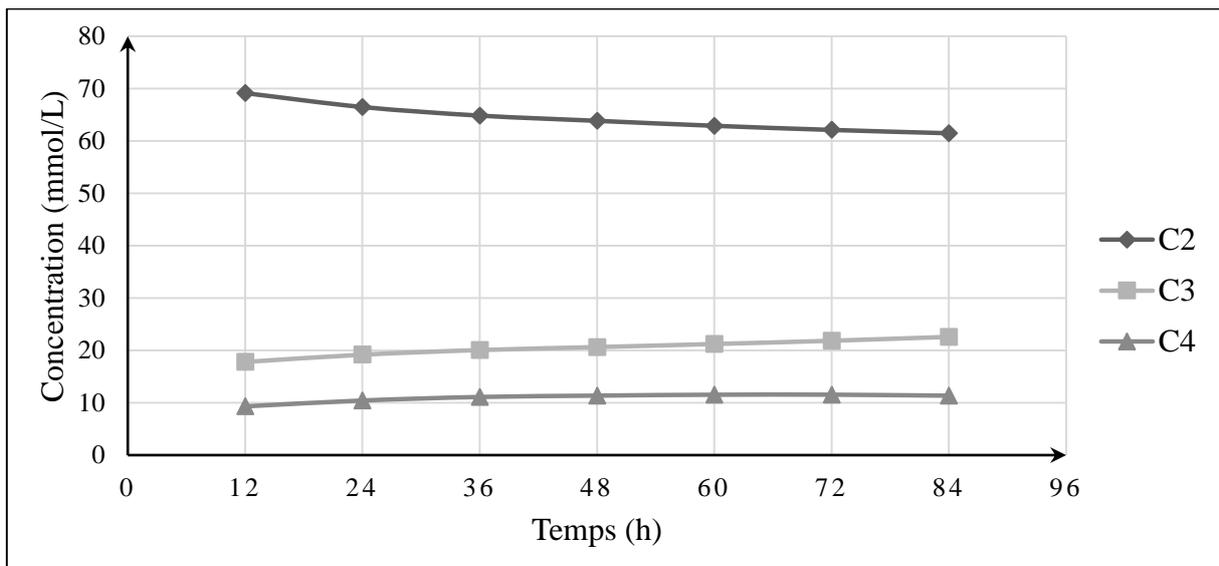
### C. Evolution des cultures sur cinq jours : monitoring des fermentations

#### 1. Résultats

La figure 15 présente l'évolution du pH, de la concentration en AGV totaux et en NH<sub>3</sub> au cours des cultures sur 5 jours. Il n'y a pas d'évolution du pH. La concentration en NH<sub>3</sub> chute les deux premiers jours puis se stabilise. La concentration en AGV diminue de 8% (de 96 à 88 mmol/L). Concernant les proportions d'AGV (figure 16), une diminution de la concentration en C2 (-11%) et une augmentation du C3 (+27%) et du C4 (+22%) sont visibles.



**Figure 15 :** Evolution du pH et des concentrations en AGV totaux et en NH<sub>3</sub> pendant les cultures.



**Figure 16 :** Evolution du pH et des concentrations en C2, C3 et C4 pendant les cultures.

## 2. Discussion

Concernant le pH, on peut conclure à l'établissement d'un équilibre entre la production d'AGV et la dilution par le tampon.

La faible diminution de la teneur en AGV peut s'expliquer par une diminution de l'intensité des fermentations. Cependant une diminution de 8% n'a pas forcément de signification biologique.

La modification des proportions en AGV peut s'expliquer par une modification de la population microbienne. Le rapport C2/C3 passe de 3,9 à 2,7 : la population fibrolytique (productrice de C2 principalement) diminue, tandis que la population amylolytique (productrice de C3 principalement) augmente. Visiblement cette dérive fermentaire n'est pas dépendante du pH. L'augmentation de C4 peut s'expliquer par une sélection de bactéries productrices de cet AGV.

La chute de  $\text{NH}_3$  peut s'expliquer de différentes manières. Il peut y avoir moins de  $\text{NH}_3$  produit, ou plus de  $\text{NH}_3$  consommé pour les synthèses bactériennes. Une autre explication pourrait être sa volatilisation : sa température d'ébullition étant de  $38^\circ\text{C}$ , une évaporation au cours des cultures est envisageable. Néanmoins, au bout de 48h, un équilibre se crée entre ces différents facteurs.

Afin de voir si ces modifications ont un impact sur les activités fermentaires, il est important de comparer les incubations *in vitro* entre J1 et J5.

#### D. Comparaison des activités bactériennes *in vitro* entre J1 et J5

##### 1. Dégradation de l'azote et des glucides

###### a. Résultats

Le tableau 14 présente les quantités initiales et finales des incubations *in vitro* sur 8 heures à J1 et à J5.

Quantité (mg)		<i>In vitro</i> J1	<i>In vitro</i> J5	ECTM	P
Azote	Initiale	174	111	-	-
	Finale	152	96	6	<0,001
NDF	Initiale	1674	1667	-	-
	Finale	1203	1394	41	<0,001
Amidon	Initiale	381	274	-	-
	Finale	219	24	10	<0,001

**Tableau 14 :** Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon des in vitro de 8h, entre J1 et J5.

ECTM : écart type à la moyenne

Les quantités initiales d'azote et d'amidon sont plus faibles le cinquième jour. Les quantités initiales en NDF sont similaires. Les quantités finales d'amidon sont beaucoup plus faibles à J5 qu'à J1. A l'inverse, les quantités finales de NDF sont plus fortes à J5. Concernant l'azote, les quantités finales sont plus faibles à J5, mais, au vu des différences entre les quantités initiales, il faut s'intéresser aux pourcentages de disparition.

La disparition de l'azote est similaire entre J1 et J5 (respectivement 13 et 14%). Le taux de disparition de l'amidon est beaucoup plus faible à J1 qu'à J5 (43% contre 91%). Le NDF est mieux dégradé à J1 qu'à J5 (28% contre 16%).

## b. Discussion

De plus faibles quantités d'azote à J5 indiquent qu'il n'y a pas d'accumulation, au cours des cultures, de protéines issues du substrat ou de la protéosynthèse microbienne. Cela est favorable à l'hypothèse d'une évaporation d'une partie du NH<sub>3</sub> dans notre système.

Les taux de disparition d'azote similaires à J1 et J5 pourraient indiquer que l'activité protéolytique est du même ordre en début et en fin de culture, cependant ce pourcentage est la résultante d'un bilan entre la dégradation et la synthèse : ces données sont donc peu interprétables. Globalement, le métabolisme de l'azote ne serait pas altéré sur 5 jours de cultures.

Les quantités initiales de NDF similaires montrent qu'il n'y a pas d'accumulation au cours des cultures et que notre taux de renouvellement des cultures est correct, puisque la concentration en fibres non dégradées avant repas est similaire entre l'inoculum de J1 et les cultures de J5 (NB : son + graines de soja apportent 1150 mg de NDF). La diminution du taux de dégradation du NDF, quasiment divisé par deux, met en évidence une nette diminution de l'activité fibrolytique. Cela est en accord avec la diminution du taux de C2 au cours des cultures.

Concernant l'amidon, les teneurs initiales plus élevées à J1 s'expliquent par le fait qu'il reste de l'amidon peu dégradé dans l'inoculum prélevé (environ 100 mg), tandis que durant les cultures, l'intégralité de l'amidon du précédent repas a été digérée. En effet, le substrat des incubations contient 279 mg d'amidon rapide (dans le son de blé). Le pourcentage de disparition de l'amidon est multiplié par deux, avec, à J1, 162 mg d'amidon dégradé, contre 250 mg à J5. Cela met en évidence une forte activité amylolytique d'où l'augmentation de la proportion en C3 au cours des cultures.

Pour conclure, on peut remarquer qu'au cours des cultures, l'activité fibrolytique diminue tandis que l'activité amylolytique augmente. Cela est en accord avec les modifications des proportions d'AGV.

Voyons maintenant si cette déviation fermentaire a eu une influence sur la biohydrogénation.

## 2. Biohydrogénation

### a. Résultats

Les résultats concernant la biohydrogénation sont présentés dans le tableau 15. Les pH finaux sont du même ordre de grandeur (6.59 à J1 et 6.68 à J5). Pour ce qui est des quantités initiales, les OBCFA sont en plus grand nombre à J1, tandis que les T10 et T11 sont plus nombreux à J5. Les quantités de c9c12-C18:2 sont similaires.

Les quantités produites d'OBCFA sont similaires. Le pourcentage de disparition du c9c12-C18:2 est plus élevé à J5. De plus grandes quantités de T10 et de T11 sont produites lors des incubations à J5.

		<b>J1</b>	<b>J5</b>	ECTM	P
c9c12-C18:2	Quantité initiale (mg)	86,2	84,3	-	-
	Quantité finale (mg)	38,2	26,0	1,8	<0,001
	Disparition (%)	55,7	69,2	1,7	<0,001
OBCFA	Quantité initiale (mg)	7,72	3,5	-	-
	Quantité finale (mg)	10,5	6,26	0,24	<0,001
	Quantité produite (mg)	2,7	2,8	-	-
T10	Quantité initiale (mg)	0,42	0,78	-	-
	Quantité finale (mg)	1,76	2,8	0,321	0,04
	Quantité produite (mg)	1,3	2,0	-	-
T11	Quantité initiale (mg)	5,56	17,8	-	-
	Quantité finale (mg)	21,6	43,7	0,935	<0,001
	Quantité produite (mg)	16,1	25,9	-	-
pH final		6,59	6,68	-	-

**Tableau 15** : Comparaison des pH, des pourcentages de disparition du c9c12-C18:2 et des quantités initiales et finales de c9c12-C18:2, d'OBCFA, de T10 et de T11, des *in vitro* de 8h, entre J1 et J5.

ECTM : écart type à la moyenne

## b. Discussion

La similarité des quantités initiales de c9c12-C18:2 (à J1 et J5) montre qu'il ne s'accumule pas au cours des cultures. Ces valeurs correspondent à la quantité de c9c12-C18:2 présente dans le substrat pour les incubations.

La disparition plus importante à J5 du c9c12-C18:2 traduit une biohydrogénation plus intense qui peut être mise en relation avec l'augmentation du C4 au cours des cultures. Ces deux phénomènes peuvent s'expliquer par un développement de *B. fibrisolvans*, qui est responsable de la biohydrogénation en  $\Delta 12$ , et produit principalement du C4.

Entre J1 et J5, la quantité de T10 n'a que très peu augmentée, ce qui indique que les bactéries productrices de T10 n'ont pas été sélectionnées, malgré l'augmentation de la population amylolytique, liée habituellement à cette voie. Cependant, la sélection des T10 nécessite des pH bas et de fortes proportions d'amidon. Ici, le pH reste élevé et l'amidon est en faible quantité (9%). De plus, les inoculums proviennent de vaches recevant une ration riche en foin. Une étude (75) montre que pour sélectionner la voie T10 *in vitro*, il est nécessaire de prélever l'inoculum d'une vache recevant une ration riche en amidon (35%). Enfin, il est montré que la déviation vers la voie T10 est associée à une prolifération de bactéries productrices ou consommatrices de lactate, sélectionnées par des pH bas (induits par le lactate) (74).

Ainsi, la sélection de la flore amylolytique n'a donc pas été traduite par une augmentation des teneurs en T10. Cependant, une augmentation de la biohydrogénation et de la production de T11 est explicable par la multiplication d'une bactérie, sécrétrice de C4, effectuant une isomérisation en  $\Delta 12$  : *B. fibrisolvens*.

#### E. Comparaison des activités enzymatiques *in vitro* entre J1 et J5

##### 1. Dégradation de l'azote et des glucides

###### a. Résultats

Le tableau 16 compare les quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon des incubations *in vitro*, après traitement au chloramphénicol, entre J1 et J5.

Comme observé précédemment, les quantités initiales d'azote et d'amidon sont plus faibles à J5 qu'à J1, et les quantités initiales de NDF sont similaires.

A J5, l'azote n'est pas dégradé. Le NDF a un taux de disparition légèrement plus faible à J5 qu'à J1 (respectivement 7% contre 13%). A J1 comme à J5, l'amidon n'est pas dégradé.

Quantité (mg)		<i>In vitro</i> J1	<i>In vitro</i> J5	ECTM	P
Azote	Initiale	184	120	-	-
	Finale	165	118	6	<0.001
NDF	Initiale	1686	1709	-	-
	Finale	1473	1588	50	0.13
Amidon	Initiale	372	291	-	-
	Finale	394	324	10	<0.001

**Tableau 16** : Comparaison des quantités initiales et finales d'azote, de NDF et d'amidon, des *in vitro* de 3h, après traitement au chloramphénicol, entre J1 et J5.

ECTM : écart type à la moyenne

#### b. Discussion

Comme précisé lors de la comparaison entre les activités microbiennes à J1 et J5, les plus faibles quantités initiales d'amidon et d'azote à J5 s'expliquent par la non accumulation de ces substrats. Les quantités initiales de NDF similaires s'expliquent par le fait qu'une partie de ces fibres ne soient pas ou peu dégradables.

La faible activité protéolytique à J5 peut être mise en relation avec la baisse des concentrations en  $\text{NH}_3$  au cours des cultures : il y aurait une baisse de l'activité protéolytique dans les cultures. Ce phénomène peut également s'expliquer par l'absence d'enzymes protéolytiques dans l'inoculum utilisé à J5. Ce défaut d'enzymes peut s'expliquer par de faibles teneurs initiales en azote. En effet, au moment de la mise en incubation, il n'y a quasiment plus d'azote dégradable dans le milieu de culture (20 mg à J5 contre 90 mg à J1), c'est pourquoi la flore n'aurait pas sécrété d'enzymes protéolytiques. La sécrétion d'enzymes protéolytiques serait-elle induite par la présence d'un minimum d'azote comme supposé ci-dessus pour l'amidon? Ainsi, l'azote utilisé pour nos cultures serait trop rapidement dégradé.

Le taux de disparition de NDF à J5 tend à être inférieur à celui à J1. Cette donnée est en concordance avec la baisse de l'activité fibrolytique au cours des cultures.

Pour ce qui est de l'amidon, aucune dégradation n'est observée, ni à J1, ni à J5. L'apport d'amidon déclencherait donc la synthèse enzymatique appropriée.

Ces expériences nous montrent l'importance d'induire les synthèses enzymatiques, et donc d'attendre quelques heures après le repas avant le prélèvement. Cela est d'autant plus vrai pour l'amidon et les protéines.

## 2. Biohydrogénation

### a. Résultats

Les résultats concernant le biohydrogénation sont présentés dans le tableau 17.

		<b>J1</b>	<b>J5</b>	ECTM	P
c9c12-C18:2	Disparition (%)	17	19.2	0.912	0.036
T10	Quantité initiale (mg)	0,57	0,49	-	-
	Quantité finale (mg)	1,90	3,72	0.08	<0.001
	Quantité produite (mg)	1,33	3,23	-	-
T11	Quantité initiale (mg)	10,9	11,1	-	-
	Quantité finale (mg)	9,07	27,5	0.377	<0.001
	Quantité produite (mg)	-1,8	16,4	-	-
T10/T11	Initial	0,05	0,04	-	-
	Final	0,21	0,14	-	-
pH final		6,72	6,82	-	-

**Tableau 17** : Comparaison du pH et des quantités initiales et finales de c9c12-C18:2, d'OBCFA, de T10 et de T11, des *in vitro* de 8h, après traitement au chloramphénicol, entre J1 et J5.

ECTM : écart type à la moyenne

Les pH finaux sont du même ordre de grandeur (6,72 à J1 et 6,82 à J5).

Initialement, les T10 et les T11 sont en quantités similaires à J1 et à J5. Les quantités finales de T10 et T11 sont plus élevées à J5 qu'à J1.

Le pourcentage de disparition du c9c12-C18:2 est plus important à J5 qu'à J1 (respectivement 19,2 % contre 16,6%).

## b. Discussion

On retrouve, ici, les mêmes phénomènes qu'avec les *in vitro* de 8 heures. En effet le pourcentage de disparition du c9c12-c18:2 est plus élevé à J5 qu'à J1. De même, les quantités de T10 et T11 sont plus élevées à J5. Cela s'explique de la même manière que précédemment.

De plus on peut observer à J5, comme décrit auparavant pour les mesures d'activités enzymatiques à J1, une légère augmentation de la quantité de T10. Cela peut s'expliquer par le fait que la  $\Delta$ 12-isomérase n'est pas recyclable, et que d'autres isomérases, telles que la  $\Delta$ 9-isomérase, prennent le relai.

## Conclusion

Cette étude bibliographique et expérimentale illustre la complexité et la variabilité des digestions microbiennes ruminales. Plusieurs méthodes d'études *in vitro* ont été envisagées.

Concernant l'étude de la dégradabilité des protéines, la méthode *in sacco* reste la méthode de choix. En effet, dans les incubations, la mesure de disparition de l'azote est la résultante d'un bilan entre la dégradation des protéines du substrat, et la synthèse de protéines microbiennes. Certaines alternatives *in vitro* pourraient être utilisées : placer les substrats dans des sachets ou utiliser des marqueurs azotés. La mesure des activités enzymatiques fonctionne mais il semble nécessaire de stimuler le microbiote au préalable. On pourrait alors prélever l'inoculum quelques heures après le début du repas de l'animal donneur, ou veiller à un apport de protéines lentement dégradables pour assurer la persistance d'une activité enzymatique protéolytique, ou réaliser une culture de quelques heures avant de réaliser les incubations.

Pour l'étude de la dégradabilité du NDF et de l'amidon, les techniques *in sacco* et *in vitro* donnent des résultats exploitables. Cependant, *in vitro*, il faut tenir compte du temps de latence, de quelques heures, pendant lequel les bactéries sont inactives. Pour les activités enzymatiques, il est également nécessaire de stimuler le microbiote avant la mise en incubation, surtout pour l'amidon.

Concernant l'étude de la biohydrogénation, l'*in vitro* est une méthode de choix car elle permet d'étudier l'évolution des différents intermédiaires. Ces derniers, *in sacco*, traversent les pores du sachet et ne peuvent donc pas être étudiés. *In vivo*, il est difficile de réaliser des bilans quantitatifs.

L'étude des activités enzymatiques intervenant dans la biohydrogénation est possible, cependant il serait souhaitable de réduire les temps d'incubation. En effet, la  $\Delta 12$ -isomérase n'est pas recyclable, cela induit une augmentation des autres isomérisations et particulièrement en  $\Delta 9$ . L'isomérisation en  $\Delta 12$  semble être la plus efficace, possiblement à cause d'une affinité

plus grande pour le c9c12-C18:2 car les autres isomérases n'interviennent que lorsqu'elle vient à manquer.

Une grande variabilité de la composition des BNI a été observée lors des incubations *in vitro*. Afin d'y remédier, il est possible d'établir un état initial en additionnant la composition des substrats et celle de l'inoculum.

Pour ce qui est des cultures de longue durée (de 96h), nos taux et fréquences de renouvellement ont été corrects car il n'y a pas eu d'accumulation de nutriments. Une diminution de l'activité fibrolytique, associée à une baisse des proportions molaires de C2 a été observée. On a également constaté une augmentation des activités amylolytiques et de la biohydrogénation associées à une augmentation des proportions molaires en C3 et C4. Ces modifications sont cohérentes et pourraient être associées à une modification de la flore ruminale.

En effet, notre substrat de culture a une composition légèrement différente de la ration des vaches donneuses. La ration des vaches contient 3 % d'amidon contre 5 % dans le substrat, ce qui est peu différent mais l'amidon présent dans le concentré alimentaire provient d'orge et de maïs tandis que celui présent dans le substrat est rapide (amidon de blé). Le NDF est de même ordre de grandeur dans les deux cas (58 % dans la ration contre 51 % dans le substrat), cependant la nature des fibres est différente : les fibres de la ration des vaches proviennent du foin qui contient des fibres lentement fermentescibles tandis que celles du substrat proviennent du foin et surtout du son de blé qui contient de fortes proportions d'hémicelluloses. De plus, le substrat utilisé pour les cultures est broyé : cela est peu favorable à la flore fibrolytique.

Enfin le substrat de fermentation est légèrement plus riche en matière grasse que la ration des vaches (respectivement 5% contre 3%). Le substrat est également plus riche en c9c12-C18:2 de par ses fortes teneurs en soja. Le substrat a très probablement orienté vers une sélection des bactéries réalisant la biohydrogénation du c9c12-C18:2.

Concernant les glucides il est difficile de conclure entre un effet substrat ou une résistance moindre des bactéries fibrolytiques à la mise en culture. Pour ce faire, il serait intéressant de réaliser à nouveau ces cultures sur 5 jours en donnant un substrat identique à la

ration des vaches donneuses mais il va être difficile de s'affranchir du broyage des substrats pour *l'in vitro*, et de déterminer les modifications au niveau des populations microbiennes (par séquençage à haut débit par exemple).

Toutefois, les cultures de 96h peuvent tout à fait répondre à des objectifs expérimentaux d'études de facteurs de variation sur les digestions microbiennes à long terme.



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

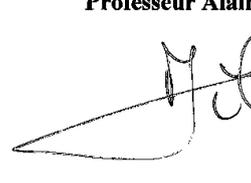
**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, **Annabelle TROEGELER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **DUSART Clément** intitulée « *La digestion ruminale : mise en place d'un modèle d'étude in vitro à longs termes en cultures batch.* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 29 novembre 2013  
Docteur Annabelle TROEGELER  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON



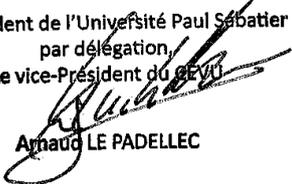
Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Hugues CHAP



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand MONTHUBERT



Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
Le vice-Président du GEVI



Arnaud LE PADELLEC

**M. DUSART Clément**  
a été admis(e) sur concours en : 2008  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 21/06/2012  
a validé son année d'approfondissement le : 27/06/2013  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.



## Références bibliographiques

- 1. AUFRERE J., GRAVIOU D., MICHALET-DOREAU B.** (1994). Degradation in the rumen of proteins of 2 legumes : soy-bean meal and field pea. *Reprod. Nutr. Dev.*, **34**, 483-490.
- 2. BACH A., CALSAMIGLIA S., STERN M.D.** (2005). Nitrogen Metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci*, **88**, Suppl 1, p E9-E21.
- 3. BARONE R.** (1997). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3 : Splanchnologie 1. Appareil digestif. Appareil respiratoire.* 3<sup>ème</sup> édition Paris : Vigot. 853 p.
- 4. BAUCHART D., LEGAY-CARMIER F., DOREAU M., GAILLARD B.** (1990). Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipid supplemented diets. *Br. J. Nutr.*, **63**, 563-578.
- 5. BERNARD L., MARVALIN O., YANG W., PONCET C.** (1988). Colonisation bactérienne de différents types d'aliments incubés *in sacco* dans le rumen : conséquences pour l'estimation de la dégradabilité de l'azote. *Reprod. Nutr. Dev.*, **28** (suppl.1), 105-106.
- 6. BLAIN J.C.** (2002). Introduction à la nutrition des animaux domestiques. Technique et documentation. 425 p.
- 7. BLANCHART G., DURAND M., BARRY J.L., BOUILLER-OUDOT M., JOUANY J.P.** (1989). Intérêts et limites des fermenteurs à flux semi-continu de type Rusitec dans l'étude des fermentations du rumen. *Ann. Zootech.*, **38**, 285-314.
- 8. CHOUINARD P.Y., CORNEAU L., BUTLER W.R., CHILLARD Y., DRACKLEY J.K., BAUMANN D.E.** (2001). Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentration in milk fat. *J. Dairy Sci.*, **84**, 680-690.
- 9. CUVELIER C., CABARAUX J.F., DUFRASNE I., ISTASSE L., HORNICK J.L.** (2005). Production, digestion et absorption des acides gras chez le ruminant. *Ann. Méd. Vét.*, **149**, 49-59.
- 10. CZERKAWSKI J.W., BRECKENRIDGE G.,** (1977). Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.*, **38**, 371-384.
- 11. DEHORITY B.A.** (2003). *Rumen microbiology.* Nottingham university press. 372 p.
- 12. DOREAU M.** (2008). Apports et limites des techniques alternatives à la chirurgie expérimentale du tractus digestif des herbivores. *Bull. Acad. Vet. France*, **161**, 425-433.
- 13. DOREAU M., FIEVEZ V., TROEGLER-MEYNADIER A., GLASSER F.** (2012). Métabolisme ruminal et digestion des acides gras longs chez le ruminant : le point des connaissances récentes. *INRA Prod. An.*, **25** (4), 361-374.

- 14. DOYLE D.** (1998). Scientific forum explores CLA knowledge. *Inform.*, **9**, 9-73.
- 15. FAICHNEY G. J.** (1995). Transit des digesta dans le tube digestif des ruminants. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 431-464.
- 16. FONTY G., JOUANY J.P., FORANO E., GOUET P.** (1995). L'écosystème microbien du réticulo rumen. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 299-347.
- 17. GOSSELINK J.M.J., DULPHY J.P., PONCET C., JAILLER M., TAMMINGA S., CONE J.W.,** (2004). Prediction of forage digestibility in ruminants using *in situ* and *in vitro* techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **115**, 227-246.
- 18. GRENET E. BESLE J.M.** (1991). Microbes and fibre degradation. In : *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. INRA Editions, p 107-129.
- 19. GUILLOTEAU P., LE HUEROU-LURON I., MALBERT C.H., TOULLEC R.** (1995). Les sécrétions digestives et leur régulation. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 489-526.
- 20. HARFOOT C.G., NOBLE R.C., MOORE J.H.** (1973). Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms *in vitro*. *J. SCI. Fd. Agric.*, **24**, 961-970.
- 21. HARMON D. L., RICHARDS C. J.** (1997). Considerations for gastrointestinal cannulations in ruminants. *J. Anim. Sci.*, **75**, 2248-2255.
- 22. HAZLEWOOD G., DAWSON R.M.C.** (1979). Characteristics of a lipolytic and fatty acid requiring *Butyrivibrio* sp. Isolated from the ovine rumen. *J. Gen. Microbiol.*, **112**, 15-27.
- 23. HENDERSON C.** (1971). A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *J. Gen. Microbiol.*, **65**, 81-89.
- 24. HOOVER W.H., CROOKER B.A., SNIFFEN C.J.** (1976). Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *J. Anim. Sci.*, **43**, 528-535.
- 25. JARRIGE R.** (1988). Ingestion et digestion des aliments. In : *Alimentation des bovins ovins et caprins*. INRA Editions, p 29-56 BU
- 26. JARRIGE R., DULPHY J.P., FAVERDIN P., BAUMONT R., DEMARQUILLY C.** (1995). Activités d'ingestion et de rumination. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 122-181.
- 27. JARRIGE R., GRENET E., DEMARQUILLY C., BESLE J.M.** (1995). Les constituants de l'appareil végétatif des plantes fourragères. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 25-81.

- 28. JOUANY J.P., SENAUD J.** (1979). Description d'une technique permettant d'effectuer des prélèvements répétés de gaz dans le rumen. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **19**, 1007-1010.
- 29. JOUANY J.P.** (1994). Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.*, **7**, 207-225.
- 30. JOUANY J.P., BROUDISCOU L., PRINS R.A., KOMISARCZUK-BONY S.** (1995). Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 350-381.
- 31. JOUANY J.P.** (1996). Effet of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *American Institute of Nutrition*, **126**, 1335S-1346S.
- 32. JULIEN C., TROEGELER-MEYNADIER A., MARDEN J.P., ENJALBERT F., BAYOURTHE C.** (2009). *In vivo* and *in vitro* measurements of ruminal redox potential : a comparative study. *ADSA/ASAS Joint Annual Meeting*, 12-16 Juillet 2009, Montréal, Canada
- 33. KEMP P., LANDER D.J.** (1984). Hydrogénation *in vitro* of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 527-533.
- 34. KEPLER C.R., TUCKER W.P., TOVE S.B.** (1970). Biohydrogénation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate  $\Delta^{12}$ -cis,  $\Delta^{11}$ -trans-isomerase from *Butyrvibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3612-3620.
- 35. KEPLER C.R., TUCKER W.P., TOVE S.B.** (1971). Biohydrogénation of unsaturated fatty acids. V. Stereospecificity of proton addition and mechanism of action of linoleic acid  $\Delta^{12}$ -cis,  $\Delta^{11}$ -trans-isomerase from *Butyrvibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2765-2771
- 36. KIM Y.J., LIU R.H., BOND D.R., RUSSEL J.B.** (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrvibrio Fibrisolvens*. *Appl. environ. microbial.* **66**, 5226-5230.
- 37. KRISHNAMOORTHY U.K., RYMER C., ROBINSON P.H.** (2005). The *in vitro* gas production techniques : limitation and opportunities. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **123-124**, 1-7.
- 38. LOPEZ S., CARRO M.D., GONZALES J.S., OVEJERO F.J.,** (1998). Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. **73**, 99-113.
- 39. MACKIE R.I., AMINOV R.I., WHITE B.A., McSWEENEY C.S.** (2000). Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. In : *Ruminant physiology, digestion metabolism, growth and reproduction*. Edited by Cronjé P.B, p 61-77.

- 40. MALBERT C.H., RUCKEBUSCH Y., BUENO L., BAUMONT R., THEODOROU V., BRIKAS P.** (1995). Motricité du complexe gastrique. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 223-252.
- 41. MANSFIELD H.R., ENDRES M.I., STERN M.D.**, (1995). Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **55**, 47-66.
- 42. MARDEN J.P., BAYOURTHE C., ENJALBERT F., MONCOULON R.** (2005). A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **88**, 277-281.
- 43. MENKE K.H., RAAB L., SALEWSKI A., STEINGASS H., FRITZ D., SCHNEIDER W.** (1979). The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agri. Sci.*, **93**, 217-222.
- 44. MICHALET-DOREAU B., AUFRERE J.** (1990). Nouvelles méthodes d'estimation de la valeur alimentaire des fourrages I- Dégradabilité in sacco. *Fourrages*, **122**, 189-201.
- 45. MICHALET-DOREAU B., OULD-BAH, M.Y.** (1992). In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen : a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **40**, 57-86.
- 46. MICHALET-DOREAU B., NOZIERE P.** (1999). Intérêts et limites de l'utilisation de la technique des sachets pour l'étude de la digestion ruminale. *INRA Prod. Anim.*, **12**(3), 195-206.
- 47. MICHALET-DOREAU B., FERNANDEZ I., PEYRON C., MILLET L., FONTY G.** (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reprod. Nutr. Dev.*, **41**, 187-194.
- 48. MOHARRERY A., DAS T.K.** (2001). Correlation between microbial enzyme activities in the rumen fluid of sheep under different treatments. *Reprod. Nutr. Dev.*, **41**, 513-529.
- 49. NOZIERE P., MICHALET-DOREAU B.** (1996). Effect of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal associated microorganisms. *J. Sci. Food Agric.*, **73**, 471-476.
- 50. ORTEGA CERILLA M.E., MENDOZA MARTINEZ G.** (2003). Starch digestion and glucose metabolism in the ruminant : a review. *INCI*, **28**, 380-386.
- 51. PARK P.W., GOINS R.E.** (1994). In situ preparation of fatty acid-methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J. Food Sci.*, **59**(6), 1262-1266.

- 52. PARODI P.W.** (1997). Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *J. Nutr.*, **127**, 1055-1060.
- 53. REMON B., BRUGERE H., PONCET C., BAUMONT R.** (1995). Le contenu du réticulo-rumen. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 253-298.
- 54. ROMAGNOLO L.C., POLAN C.E., BARBEAU W.E.** (1994). Electrophoretic analysis of ruminal degradability of corn proteins. *J. Dairy Sci.*, **77**, p 1093-1099.
- 55. RUBA M., CHAUDHRY A.S.** (2008). Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition Research Reviews*, **21**, 68-81.
- 56. SAUTET J.** (1995). L'appareil digestif et ses adaptations. In : *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p 183-222.
- 57. SAUVANT D., CHAPOUTOT P., ARCHIMEDE H.,** (1994). La digestion des amidons par les ruminants et leurs conséquences. *INRA Prod. Anim.*, **7**, 115-124.
- 58. SAUVANT D., BAS P.** (2001). La digestion des lipides dans le rumen. *INRA Prod. An.*, **14**, 303-310.
- 59. SCHAEZEL W.P., JOHNSON D.E.** (1981). Nicotinic acid and dilution rate effects on *in vitro* fermentation efficiency. *J. Anim Sci.*, **53**, 1104-1108.
- 60. STERN M.D., BACH A., CALSAMIGLIA S.** (1997). Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.*, **75**, 2256-2276.
- 61. THIVEND P., FONTY G., JOUANY J.P., DURAND M., GOUET Ph.** (1985). Le fermenteur rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **25**, 729-753
- 62. TILLEY J. M. A., TERRY R. A.** (1963). A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.*, **18**, 104-111.
- 63. TROEGELER-MEYNADIER A., ENJALBERT F.** (2005). Les acides linoléiques conjugués : 3 Facteurs de variation des teneurs dans le lait et les produits laitiers. *Revue Méd. Vét.*, **156**, 323-331
- 64. TROEGELER-MEYNADIER A., BRET-BENNIS L., ENJALBERT F.** (2006). Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reprod. Nutr. Dev.*, **46**, 713-724.
- 65. VAN NEVEL C.L., DEMEYER D.I.** : Influence of pH on lipolysis and biohydrogénation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**, 53-63.
- 66. VAN SOEST P.J., ROBERTSON J.B., LEWIS B.A.** (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, **74**, 3583-3597.

- 67. VERHULST A., SEMJEN G., MEERTS U., JANSSEN G., PARMENTIER G., ASSELBERGHS S., VAN HESPEN H., EYSSEN H.** (1985). Biohydrogenation of linoleic acid by *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii* and *Bacteroides* sp.. FEMS Microbiol. Lett., **31**, 255-259.
- 68. VERITE R., MICHALET-DOREAU B., CHAPOUTOT P., PEYRAUD J. L., PONCET C.** (1987). Révision du système des Protéines Digestibles dans l'Intestin (PDI). *Bull. Tech. Cent. Rech. Zootech. Vét. Theix*, **70**, 19-34.
- 69. VLAEMINCK B., FIEVEZ V., CABRITA A.R.J., FONSECA A.J.M., DEWHURST R.J.** (2006). Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk : a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **131**, 389-417.
- 70. WALLACE R.J.** (1991). Rumen proteolysis and its control. In : *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. INRA Editions, p 131-150.
- 71. WEIMER P.J., WAGHORN G.C., ODT C.L., MERTENS D.R.** (1999). Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, **82**, 122-134.
- 72. WILLIAMS A.P., COCKBURN J.E.,** (1991). Effect of slowly and rapidly degraded protein sources on the concentrations of amino acids and peptides in the rumen of steers. *J. Sci. Food Agri.*, **56**, 303-314.
- 73. WILLIAMS B.A., BOSCH M.W., BOER H., VERSTEGEN M.W.A., TAMMINGA S.** (2005). An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **123-124**, 445-462.
- 74. ZENED A., COMBES S., CAUQUIL L., MARIETTE J., ROUSSEAU C., KLOPP C., TROEGELER-MEYNADIER, ENJALBERT F.** (2011). The ruminal level of *trans*-10 fatty acids of dairy cows is linked to the composition of bacterial community. In: *4th Congress of European Microbiologists*, 26-30 June 2011, Geneva, Switzerland.
- 75. ZENED A., ENJALBERT F., NICOT M.C., TROEGELER-MEYNADIER A.** (2012). *In vitro* study of dietary factors affecting the biohydrogenation shift from *trans*-11 to *trans*-10 fatty acids in the rumen of dairy cows. *Animal*, **6:3**, 459-467.







Toulouse, 2014

NOM : DUSART

Prénom : Clément

TITRE : LA DIGESTION RUMINALE : MISE EN PLACE D'UN MODELE D'ETUDE *IN VITRO* A LONG TERME EN CULTURES DE TYPE « BATCH »

RESUME :

L'objectif de cette étude est de mettre au point une culture de contenu ruminal sur une durée de plus de 24h (i.e. 96h), avec renouvellement du milieu toutes les 12h. Les activités microbiennes et enzymatiques des inoculums prélevés sur 2 vaches et utilisés à J1 ont été comparées à celles obtenues avec les cultures de 96h. Les activités fermentaires se sont maintenues, cependant une diminution de l'activité fibrolytique et une augmentation de l'activité amylolytique ont été observées. La biohydrogénation a également augmentée. La concentration en acides gras volatils est restée constante avec une diminution de la proportion en acide acétique et une augmentation de celle en acide propionique. La concentration en ammoniac a été divisée par deux puis s'est stabilisée au bout de 48 h. Le pH est resté constant. Avec quelques adaptations, ce modèle pourrait ainsi être utilisé afin d'étudier les effets à long terme, en culture batch, de certains traitements sur la digestion microbienne dans le rumen.

MOTS CLES : Rumen / Protéines / Lipides / Glucides / Digestion microbienne / In Vitro

---

ENGLISH TITLE : RUMINAL DIGESTION : ESTABLISHMENT OF AN IN VITRO MODEL OF LONG TERM BATCH CULTURE

ABSTRACT :

This study aims at developing a culture of ruminal contents over a period longer than 24h (i.e. 96h) with renewal every 12 hours. Microbial and enzymatic activities of the inoculums taken from two cows and used the first day were compared to those obtained with cultures of 96h. Fermentative activities are maintained, however, fibrolytic activity decreased and amylolytic activity increased. The biohydrogenation also increased. The concentration of volatile fatty acids remained constant but a decrease of the proportion of acetic acid and an increase of the proportion of propionic acid were observed. The ammonia concentration decreased until 48 h and then was stable. The pH remained constant. With few modifications, this model could be used to study long-term effects, in batch culture, of some treatments on the rumen microbial digestion.

KEYS WORDS : Rumen / Proteins, Lipids / Carbohydrates / Microbial Digestion / In Vitro