




### 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's version published in: <http://oatao.univ-toulouse.fr/23876>

**To cite this version:**

Chaumeton, Justine . *Mise au point de milieux de culture sélectifs pour l'étude de la biohydrogénation ruminale*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, 2018, 178 p.

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

# MISE AU POINT DE MILIEUX DE CULTURE SELECTIFS POUR L'ETUDE DE LA BIOHYDROGENATION RUMINALE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

*par*

**CHAUMETON Justine**  
Née, le 12 octobre 1989 à Auch (32)

---

**Directeur de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Thierry LEVADE**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

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

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

# MISE AU POINT DE MILIEUX DE CULTURE SELECTIFS POUR L'ETUDE DE LA BIOHYDROGENATION RUMINALE

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

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

*par*

**CHAUMETON Justine**  
Née, le 12 octobre 1989 à Auch (32)

---

**Directeur de thèse : Mme Annabelle MEYNADIER**

---

## JURY

PRESIDENT :  
**M. Thierry LEVADE**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

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

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



*Répartition des Enseignants-Chercheurs par Département.*

Mise à jour : 15/01/2018

**DIRECTRICE : ISABELLE CHMITELIN**

ELEVAGE ET PRODUITS/SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉINAIRE	SCIENCES BIOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES	SCIENCES CLINIQUES DES ANIMAUX DE COMPAGNIE, DE SPORT ET DE LOISIRS
<p><b>Responsable : M. SANS</b></p> <p><u>ALIMENTATION ANIMALE :</u> M. ENJALBERT Francis, PR Mme PRIYMENKO Nathalie, MC Mme MEYNADIER Annabelle, MC</p> <p><u>ÉPIDÉMIOLOGIE :</u> Mathilde PAUL, MC</p> <p><u>PARASITOLOGIE-ZOOLOGIE :</u> M. FRANC Michel, PR M. JACQUIET Philippe, PR M. LIENARD Emmanuel, MC Mme BOUHSIRA Emilie, MC</p> <p><u>HYGIÈNE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS :</u> M. BRUGERE Hubert, PR M. BAILLY Jean-Denis, PR Mme BIBBAL Delphine, MC Mme COSTES Laura, AERC Mme DAVID Laure, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION :</u> M. BERTHELOT Xavier, PR M. BERGONIER Dominique, MC Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, PR Mme HAGEN-PICARD Nicole, PR M. NOUVEL Laurent-Xavier, MC Mme MILA Hanna, MC</p> <p><u>PATHOLOGIE DES RUMINANTS :</u> M. SCHELCHER François, PR M. FOUCRAS Gilles, PR M. CORBIÈRE Fabien, MC M. MAILLARD Renaud, PR M. MEYER Gilles, PR M. HERRY Vincent, MCC</p> <p><u>PRODUCTION ET PATHOLOGIE AVIAIRE ET PORCINE :</u> Mme WARET-SZKUTA Agnès, MC M. JOUGLAR Jean-Yves, MC M. GUERIN Jean-Luc, PR M. LE LOC'H Guillaume, MC</p> <p><u>PRODUCTIONS ANIMALES AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE ÉCONOMIE :</u> M. DUCOS Alain, PR M. SANS Pierre, PR M. RABOISSON Didier, MC</p>	<p><b>Responsable : Mme GAYRARD</b></p> <p><u>ANATOMIE :</u> M. MOGICATO Giovanni, MC M. LIGNEREUX Yves, PR Mme DEVIERS Alexandra, MC M. CARTIAUX Benjamin, AERC</p> <p><u>ANATOMIE PATHOLOGIQUE - HISTOLOGIE :</u> M. DELVERDIER Maxence, PR Mme LETRON-RAYMOND Isabelle, PR Mme BOURGES-ABELLA Nathalie, PR Mme LACROUX Caroline, PR M. GAIDE Nicolas, AERC</p> <p><u>BIOLOGIE MOLECULAIRE :</u> Mme BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle, MC</p> <p><u>MICROBIOLOGIE – IMMUNOLOGIE - MALADIES INFECTIEUSES :</u> M. BERTAGNOLI Stéphane, PR M. VOLMER Romain, MC Mme BOULLIER Séverine, PR Mme DANIELS Hélène, MC</p> <p><u>SANTÉ PUBLIQUE VÉTÉINAIRE – MALADIES ANIMALES RÉGLEMENTÉES :</u> M. VERGNE Timothée, MC</p> <p><u>BIOSTATISTIQUES :</u> M. CONCORDET Didier, PR M. LYAZRHI Faouzi, MC</p> <p><u>PHARMACIE-TOXICOLOGIE :</u> M. PETIT Claude, PR Mme CLAUW Martine, PR M. GUERRE Philippe, PR M. JAEG Philippe, MC</p> <p><u>PHYSIOLOGIE –PHARMACOLOGIE THÉRAPEUTIQUE :</u> M. BOUSQUET-MELOU Alain, PR Mme GAYRARD-TROY Véronique, PR Mme FERRAN Aude, MC M. LEFEBVRE Hervé, PR</p> <p><u>BIOCHIMIE :</u> Mme BENNIS-BRET Lydie, MC</p> <p><u>ANGLAIS :</u> M. SEVERAC Benoît, PLPA Mme MICHAUD Françoise, PCEA</p>	<p><b>Responsable : Mme CADIERGUES</b></p> <p><u>ANESTHÉSIOLOGIE</u> M. VERWAERDE Patrick, MC</p> <p><u>CHIRURGIE :</u> M. AUTEFAGE André, PR M. ASIMUS Erik, MC M. MATHON Didier, MC Mme MEYNAUD-COLLARD Patricia, MC Mme PALIERNE Sophie, MC</p> <p><u>MÉDECINE INTERNE :</u> Mme DIQUELOU Armelle, MC M. DOSSIN Olivier, MC Mme LAVOUE Rachel, MC Mme GAILLARD-THOMAS Elodie, MCC M. JOUSSERAND Nicolas, AERC</p> <p><u>OPHTALMOLOGIE :</u> M. DOUET Jean-Yves, MC</p> <p><u>DERMATOLOGIE :</u> Mme CADIERGUES Marie-Christine, PR</p> <p><u>IMAGERIE MÉDICALE</u> M. CONCHOU Fabrice, MC</p> <p><u>BIOLOGIE MÉDICALE :</u> Mme TRUMEL Catherine, PR</p> <p><u>PATHOLOGIE DES ÉQUIDES :</u> M. CUEVAS RAMOS Gabriel, MC Mme LALLEMAND Elodie, MC Mme BORDE-DORE Laura, MCC</p>



# **REMERCIEMENTS**

## **A MON PRESIDENT DE JURY DE THESE**

**Monsieur le Professeur LEVADE**

Professeur à la Faculté de Médecine de Ranguel

*Biochimie*

Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de ma thèse.

Avec toute ma gratitude et mes hommages respectueux.

## **A MON JURY DE THESE**

**Madame le Maitre de Conférences TROEGELER-MEYNADIER**

Maitre de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Alimentation*

Qui m'a confié ce travail et m'a guidé dans son élaboration.

Pour son aide, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse,

Qu'elle trouve ici le témoignage de mes sincères remerciements.

**Monsieur le Professeur ENJALBERT**

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Alimentation*

Qui m'a fait l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.





# **TABLE DES MATIERES**

<b>Table des abréviations</b>	11
<b>Table des figures</b>	13
<b>Table des tableaux</b>	17
<b><u>INTRODUCTION</u></b>	19
<b><u>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</u></b>	21
<b>1. <u>Le Rumen</u></b>	23
<b>1.1. Anatomie du rumen</b>	23
1.1.1. Conformation externe	23
1.1.2. Conformation interne	26
1.1.3. Topographie	28
<b>1.2. Paramètres physico-chimiques du réticulo-rumen</b>	29
1.2.1. L'anaérobiose	29
1.2.2. Le pH	29
1.2.3. La température	32
1.2.4. Le potentiel d'oxydo-réduction	33
1.2.5. La pression osmotique	33
<b>1.3. Stratification du contenu ruminal</b>	34
<b>1.4. Motricité du réticulo-rumen</b>	35
<b>2. <u>Environnement microbien du rumen</u></b>	38
<b>2.1. Les bactéries</b>	38
2.1.1. Les bactéries fibrolytiques	42
2.1.2. Les bactéries amylolytiques et utilisatrices des glucides simples	43
2.1.3. Les bactéries utilisatrices de lactate	45
2.1.4. Les bactéries protéolytiques	45
2.1.5. Les bactéries transformant les lipides	46
<b>2.2. Les protozoaires</b>	48
<b>2.3. Les champignons</b>	50
<b>2.4. Variations du microbiote ruminal</b>	50
2.4.1. Variations physiologiques	51
2.4.2. Variations pathologiques (dysbioses)	52

<b>3. <u>Digestion des aliments d'origine végétale par les micro-organismes ruminiaux</u></b>	<b>55</b>
<b>3.1. Digestion des glucides</b>	<b>55</b>
3.1.1. Dégradation des glucides pariétaux	57
3.1.2. Dégradation de l'amidon	59
3.1.3. Métabolisme bactérien des oses simples	59
3.1.4. Devenir des produits terminaux de la digestion des glucides	59
3.1.5. Facteurs de variation de la fermentation des glucides	61
<b>3.2. Digestion des lipides</b>	<b>62</b>
3.2.1. Lipolyse des lipides alimentaires	63
3.2.2. Biohydrogénation des acides gras insaturés	63
3.2.2.1. Biohydrogénation de l'acide linoléique	63
3.2.2.2. Biohydrogénation de l'acide $\alpha$ -linoléique	65
3.2.3. Facteurs de variation du métabolisme lipidique	66
3.2.4. Facteurs de variation de la proportion en isomères trans 11 et trans 10	67
<b><u>DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION</u></b>	<b>71</b>
<b>1. <u>Matériels &amp; Méthodes</u></b>	<b>73</b>
<b>1.1. Conditions de cultures</b>	<b>74</b>
1.1.1. Inoculum	74
1.1.2. Solutions tampons	74
1.1.3. Substrats	75
1.1.4. Déroulement des cultures	76
<b>1.2. Mesure des activités microbiennes</b>	<b>77</b>
<b>1.3. Mesure des activités enzymatiques</b>	<b>78</b>
<b>1.4. Analyses</b>	<b>79</b>
1.4.1. Dosage des acides gras	79
1.4.2. Dosages des acides gras volatils	83
1.4.3. Analyse du microbiote	85
<b>1.5. Calculs réalisés</b>	<b>86</b>
<b>1.6. Analyse statistique</b>	<b>88</b>
<b>2. <u>Résultats et discussion</u></b>	<b>89</b>
<b>2.1. Evolution et comparaison du pH sur 5 jours de culture</b>	<b>89</b>
<b>2.2. Evolution et comparaison de la production d'acides gras volatils sur 5 jours de culture</b>	<b>90</b>
2.2.1. Quantités d'AGV totaux	91
2.2.2. Rapport C2/C3	94
<b>2.3. Comparaison des activités microbiennes sur 3 heures entre J1 et J5</b>	<b>96</b>
2.3.1. Caractérisation de l'inoculum de départ	96

2.3.2. Comparaison des deux types de milieux	97
2.3.3. Comparaison de l'ajout ou non d'acide linoléique dans les milieux	100
<b>2.4. Evolution et comparaison du microbiote sur 5 jours de culture</b>	<b>103</b>
2.4.1. A l'échelle des phyla	103
2.4.2. A l'échelle des genres	106
<b>2.5. Corrélations</b>	<b>128</b>
2.5.1. Entre microbiote et pH	128
2.5.2. Entre microbiote et production d'acides gras volatils	129
2.5.3. Entre microbiote et biohydrogénation	131
2.5.4. Entre les différents genres bactériens	136
<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>141</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>143</b>
<b>Annexes</b>	<b>163</b>



# TABLE DES ABREVIATION

ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AG	Acide gras
AGI	Acide gras insaturé
AGL	Acide gras libre
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AGS	Acide gras saturé
AGV	Acide gras volatil
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
BH	Biohydrogénation
C18:0	Acide stéarique
C2	Acide acétique / Acétate
C3	Acide propionique / Propionate
C4	Acide butyrique / Butyrate
c9-C18:1	Acide oléique
c9,c12-C18:2	Acide linoléique
c9,c12,c15-C18:3	Acide $\alpha$ -linoléique
c9,t11-C18:2	Acide ruménique
CB	Cellulose brute
CLA	Acide linoléique conjugué
CLnA	Acide linoléique conjugué
CH <sub>4</sub>	Méthane
CO	Monoxyde de carbone
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CUD	Coefficient d'utilisation digestive
df	Degré de liberté
E <sub>h</sub>	Potentiel d'oxydo-réduction / Potentiel rédox
ECTM	Ecart type à la moyenne
F	Test statistique de Fischer
FID	Détecteur à ionisation de flamme
GRHF	Glucide rapidement et hautement fermentescible
H <sub>2</sub>	Dihydrogène
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonate
MAT	Matière azotée totale
MG	Matière grasse
Mm	Cendre brute
MS	Matière sèche
MS'	Carré moyen (MS' = SS / dt)

N <sub>2</sub>	Diazote
NDF	Neutral detergent fiber
O <sub>2</sub>	Dioxygène
PCR	Polymerase chain reaction
r	Coefficient de corrélation
SS	Somme des carrés des écarts (variation)
t10	Trans 10
t11	Trans 11
t11-C18:1	Acide vaccénique
TB	Taux butyreux

# TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Conformation extérieure du réticulo-rumen, face gauche	24
<b>Figure 2</b> : Conformation extérieure du réticulo-rumen, face droite	25
<b>Figure 3</b> : Conformation intérieure du réticulo-rumen	27
<b>Figure 4</b> : Topographie du rumen, vue latérale gauche	28
<b>Figure 5</b> : Etendue des variations de pH du rumen et systèmes tampons	30
<b>Figure 6</b> : Evolution du pH ruminal en lien avec la prise alimentaire	30
<b>Figure 7</b> : Relation pH ruminal – production salivaire – temps de rumination en fonction du régime alimentaire	32
<b>Figure 8</b> : Evolution du potentiel redox en lien avec la prise alimentaire	33
<b>Figure 9</b> : Stratification du contenu ruminal	35
<b>Figure 10</b> : Mouvement des digesta dans le réticulo-rumen	36
<b>Figure 11</b> : Cycle moteur du réticulo-rumen mettant en jeu successivement le réseau et le rumen	37
<b>Figure 12</b> : Arbre phylogénétique des principaux taxons bactériens présents dans le rumen	41
<b>Figure 13</b> : Arbre phylogénétique des principaux protozoaires ciliés présents dans le rumen	49
<b>Figure 14</b> : Pathogénie de l'acidose lactique ruminale	54
<b>Figure 15</b> : Fermentescibilité des différentes sources glucidiques (par ordre de vitesse décroissante de fermentation)	57
<b>Figure 16</b> : Dégradation enzymatique de la cellulose	58
<b>Figure 17</b> : Dégradation et utilisation des glucides par les bactéries ruminales	60
<b>Figure 18</b> : Effets du pH ruminal sur l'orientation des fermentations dans le rumen	61
<b>Figure 19</b> : Biohydrogénation de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2) et de l'acide oléique (c9-C18:1)	65
<b>Figure 20</b> : Biohydrogénation de l'acide $\alpha$ -linoléique (c9,c12,c15-C18:3)	66
<b>Figure 21</b> : Principaux facteurs alimentaires et leurs effets sur la biohydrogénation de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2)	68
<b>Figure 22</b> : Protocole détaillé de l'extraction-méthylation des acides gras	80
<b>Figure 23</b> : Méthodes chromatographiques pour le dosage des acides gras	82
<b>Figure 24</b> : Préparation des échantillons en vue du passage en CPG pour le dosage des acides gras volatils	84
<b>Figure 25</b> : Méthode chromatographique pour le dosage des acides gras volatils	85

<b>Figure 26</b> : Détail des calculs pour les valeurs des isomères trans 10 et trans 11	87
<b>Figure 27</b> : Modèle statistique	88
<b>Figure 28</b> : Evolution du pH au cours des 5 jours de culture dans les milieux FF et AA	89
<b>Figure 29</b> : Evolution de la quantité d'AGV totaux au cours des 5 jours de culture dans les deux types de milieux (FF et AA)	91
<b>Figure 30</b> : Evolution des quantités des 3 principaux AGV dans les milieux FF au cours des 5 jours de culture	93
<b>Figure 31</b> : Evolution des quantités des 3 principaux AGV dans les milieux AA au cours des 5 jours de culture	94
<b>Figure 32</b> : Evolution du rapport C2/C3 au cours des 5 jours de culture dans les deux types de milieux (FF et AA)	95
<b>Figure 33</b> : Proportions des 4 principaux phyla bactériens dans l'inoculum	103
<b>Figure 34</b> : Proportions des 4 principaux phyla bactériens dans les milieux FF à J5	104
<b>Figure 35</b> : Proportions des 4 principaux phyla bactériens dans les milieux AA à J5	105
<b>Figure 36</b> : Pourcentages des différents genres bactériens dans l'inoculum à J1 et dans les milieux FF et AA à J5	106
<b>Figure 37</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Acetitomaculum</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	108
<b>Figure 38</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Bifidobacterium</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	109
<b>Figure 39</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Butyrivibrio</i> au cours des 5 jours de culture dans les quatre milieux (F, FLA, A et ALA)	110
<b>Figure 40</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Christensenellaceae R7 group</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	111
<b>Figure 41</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Eubacterium</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	113
<b>Figure 42</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Lachnospira</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	114
<b>Figure 43</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Lactobacillus</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	116
<b>Figure 44</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Prevotella</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	117
<b>Figure 45</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Prevotellaceae UCG</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	118
<b>Figure 46</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Pseudobutyrvibrio</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	119



<b>Figure 47</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Rikenellaceae RC9 gut group</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	120
<b>Figure 48</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Ruminoclostridium</i> au cours des 5 jours de culture dans les quatre milieux (F, FLA, A et ALA)	121
<b>Figure 49</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Ruminobacter</i> au cours des 5 jours de culture dans les quatre milieux (F, FLA, A et ALA)	123
<b>Figure 50</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Ruminococcaceae NK4A214</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	125
<b>Figure 51</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Ruminococcaceae UCG</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	126
<b>Figure 52</b> : Cinétique de la population bactérienne du genre <i>Ruminococcus</i> au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)	127



# TABLE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Fonctions des principales bactéries dans le rumen	40
<b>Tableau 2</b> : Produits de fermentations et capacités des principales espèces bactériennes du rumen à métaboliser l'acide linoléique (c9,c12-C18:2)	47
<b>Tableau 3</b> : Coefficient d'utilisation digestive, micro-organismes impliqués et principaux produits formés lors de la digestion des différents glucides chez les Ruminants	56
<b>Tableau 4</b> : Composition du concentré PASSIO VL 3L	74
<b>Tableau 5</b> : Composition chimique du concentré PASSIO VL 3L	74
<b>Tableau 6</b> : Composition des tampons (g/L)	75
<b>Tableau 7</b> : Composition des substrats de culture	75
<b>Tableau 8</b> : Composition chimique des substrats de culture	76
<b>Tableau 9</b> : Activités microbiennes de biohydrogénation à J1	96
<b>Tableau 10</b> : Comparaison des quantités produites de trans 10, trans 11 et d'acide stéarique et du pourcentage de disparition de l'acide linoléique sur 3 heures à J5 dans les milieux F et A	97
<b>Tableau 11</b> : Comparaison des quantités produites de trans 10, trans 11 et d'acide stéarique et du pourcentage de disparition de l'acide linoléique sur 3 heures dans les milieux F et FLA à J1 et J5	100
<b>Tableau 12</b> : Comparaison des quantités produites de trans 10, trans 11 et d'acide stéarique et du pourcentage de disparition de l'acide linoléique sur 3 heures dans les milieux A et ALA à J1 et J5	101
<b>Tableau 13</b> : Corrélations entre les paramètres de la biohydrogénation et les genres bactériens	132
<b>Tableau 14</b> : Corrélations entre les genres bactériens	139



# INTRODUCTION

Les produits laitiers ont une place privilégiée dans l'équilibre alimentaire de l'Homme grâce à des qualités nutritionnelles indiscutables. Ils sont une source importante de protéines par l'apport de l'ensemble des acides aminés essentiels, de lipides, de minéraux, en particulier de calcium, et de vitamines.

La matière grasse du lait a connu un regain d'intérêt de part les recommandations nutritionnelles relatives à la composition de la matière grasse, en particulier les oméga 3 et les acides linoléiques conjugués (CLA), et de part la volonté d'améliorer les qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments d'origine animale.

D'un point de vue quantitatif, la teneur en matière grasse du lait ou taux butyreux (TB) varie en fonction de l'alimentation de la vache. A titre d'exemple, elle évolue en sens inverse de l'apport énergétique de la ration : le TB diminue lorsque l'apport énergétique augmente. D'autre part, certaines pathologies influencent également le TB, en particulier l'acidose à l'origine d'une diminution du TB. Enfin, d'autres facteurs non alimentaires peuvent intervenir dans les variations du TB, à titre d'exemples le stade de lactation, la saison et la luminosité, la race de la vache et la génétique individuelle au sein d'une même race.

D'un point de vue qualitatif, la matière grasse du lait peut être également influencée par l'alimentation de la vache. Ce phénomène est d'autant plus important qu'une multitude d'interrogations est soulevée par l'effet sur la santé humaine de la consommation d'acides gras (AG) trans issus de produits d'origine animale. En effet, certains CLA, en particulier les isomères trans 11 (t11), font l'objet de nombreuses études en raison de leurs potentiels effets anticarcinogènes, immuno-modulateurs et anti-adipogènes. D'autre part, les oméga 3 montreraient un intérêt dans la prévention des maladies cardio-vasculaires. Cependant, tous les AG trans ne montrent pas d'effet bénéfique sur la santé humaine, en particulier les isomères trans 10 (t10) qui pourraient entraîner un diabète insulino-résistant.

Les AG trans présents dans les aliments ont deux origines principales : naturelle et technologique. Les AG trans d'origine industrielle sont produits au cours des processus de transformation de la matière première, par exemple l'hydrogénation partielle des matières grasses. Les AG trans d'origine naturelle sont issus de la biohydrogénation (BH) ruminale des lipides contenus dans la ration des animaux : ils sont les intermédiaires des différentes étapes de la BH. Une partie des AG du lait est prélevée dans le sang : elle concerne les AG à chaînes longues (> 16 atomes de carbone). Le reste est synthétisée par la mamelle, majoritairement à

partir d'acide acétique (C2) et à moindre mesure d'acide butyrique (C4), et regroupe les AG à chaînes courtes ( $\leq 16$  atomes de carbone).

Compte tenu des connaissances et hypothèses actuelles des effets des divers AG sur la santé humaine, il est intéressant d'améliorer le profil en AG du lait en modulant l'alimentation des troupeaux. La réflexion est soutenue par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) qui porte un intérêt à préciser l'impact des pratiques traditionnelles d'élevage sur les teneurs en AG trans dans les produits d'origine animale. L'intention de l'AFSSA est de fixer des objectifs aux professionnels de l'élevage s'inscrivant dans une préoccupation de santé publique, d'autant plus nécessaire que les teneurs en AG trans des produits laitiers peuvent varier du simple au triple.

L'objectif de la présente étude est de mettre au point différents milieux de culture de contenu ruminal afin de trouver les conditions nécessaires pour sélectionner les populations microbiennes à l'origine de la voie t11 de la BH, de la voie t10 et de l'isomérisation finale en acide stéarique (C18:0). Ainsi, l'expérimentation a pour but d'établir un lien entre la composition d'un milieu de culture (et par conséquent, un type de ration), les populations microbiennes et les deux principales voies de biohydrogénation.

La première partie de ce document est consacrée à l'étude bibliographique du rumen dans son ensemble, d'un point de vue anatomique, physico-chimique et microbien, ainsi que du métabolisme ruminal des glucides et des lipides. Dans une seconde partie, la méthode de l'expérimentation sera décrite, avant de présenter les résultats obtenus lors des deux semaines de culture.

# **PREMIERE PARTIE**

## **ETUDE BILIOGRAPHIQUE**





## **1. Le Rumen**

Les Ruminants ont la particularité de posséder trois pré-estomacs dont la muqueuse est aglandulaire : le réticulum ou réseau, le rumen ou panse et l'omasum ou feuillet. Un quatrième compartiment correspond à un estomac sécrétant, semblable à l'estomac des Monogastriques : l'abomasum ou caillette.

Ces quatre réservoirs gastriques occupent près de 4/5 de la cavité abdominale, le rumen étant le plus volumineux, jusqu'à 200 litres chez un bovin adulte.

### **1.1. Anatomie du rumen** [1, 108]

#### **1.1.1. Conformation externe** (Figures 1 et 2)

Le rumen ressemble à un sac bilobé, allongé crânio-caudalement.

Il se divise en deux vastes compartiments : un sac ventral et un sac dorsal. Ils sont séparés par le sillon longitudinal droit, donnant attache au feuillet profond du grand omentum, et par le sillon longitudinal gauche sur lequel s'appuie le feuillet superficiel du grand omentum.

La face droite du rumen se caractérise par la présence d'un sillon accessoire, issu du sillon longitudinal droit et se dirigeant dorso-crânialement. Ces deux sillons délimitent l'insula du rumen, région dépourvue de papilles ruminales.

L'extrémité caudale des sacs ruminiaux est individualisée par le sillon caudal, prolongement des deux sillons longitudinaux. Elle forme un cul de sac dorsal et un cul de sac ventral, eux même délimités des sacs ruminiaux par des sillons coronaires. Ces derniers partent verticalement à la jonction des sillons longitudinaux et du sillon caudal.

La partie crâniale du rumen se compartimente en deux éléments : dorsalement, l'atrium de rumen, et ventralement, le récessus du rumen. Atrium et récessus sont délimités par le sillon crânial, prolongement des deux sillons longitudinaux.

Le sillon rumino-réticulaire sépare le rumen du réticulum.

Figure 1 : Conformation extérieure du réticulo-rumen, face gauche [1]

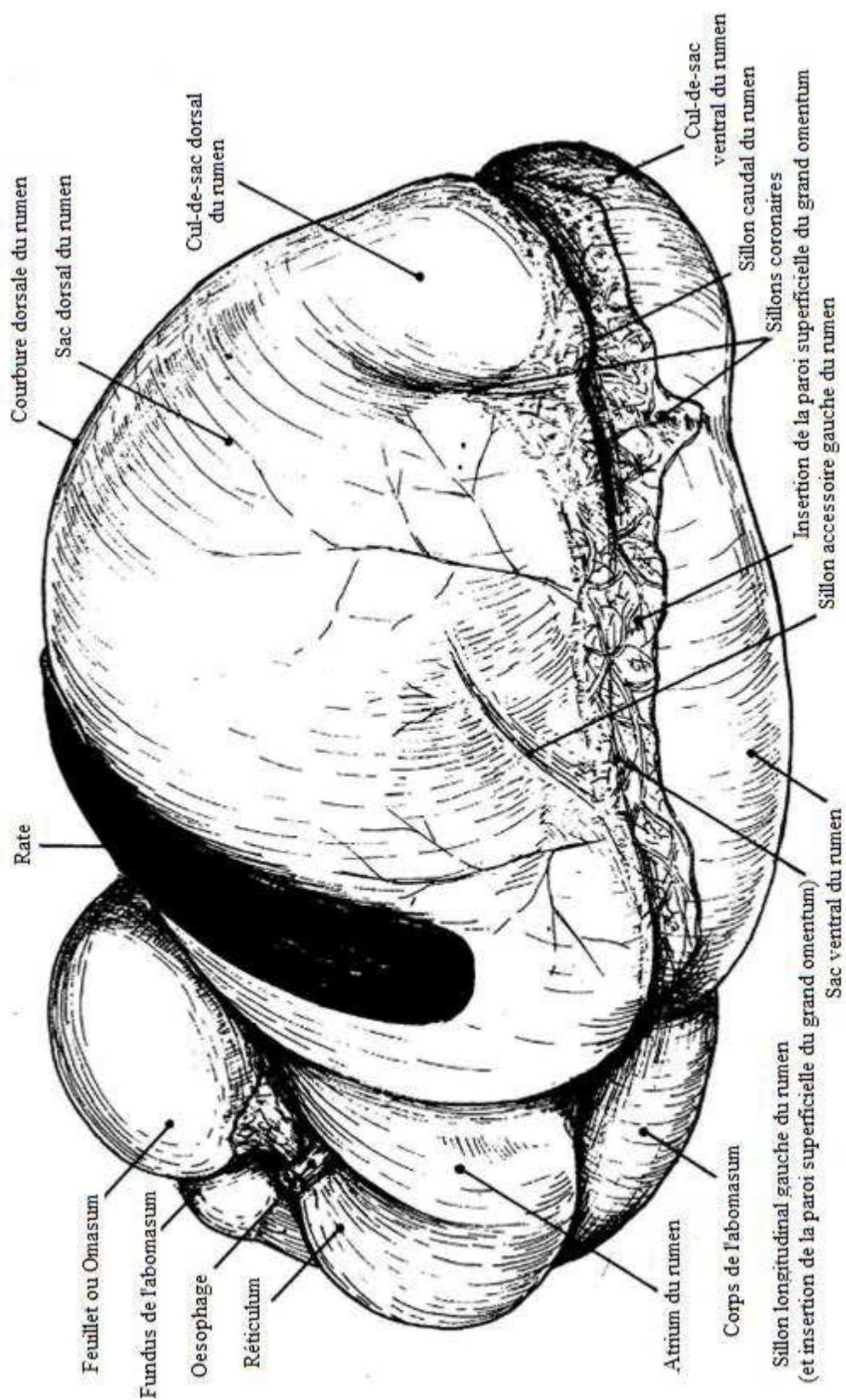
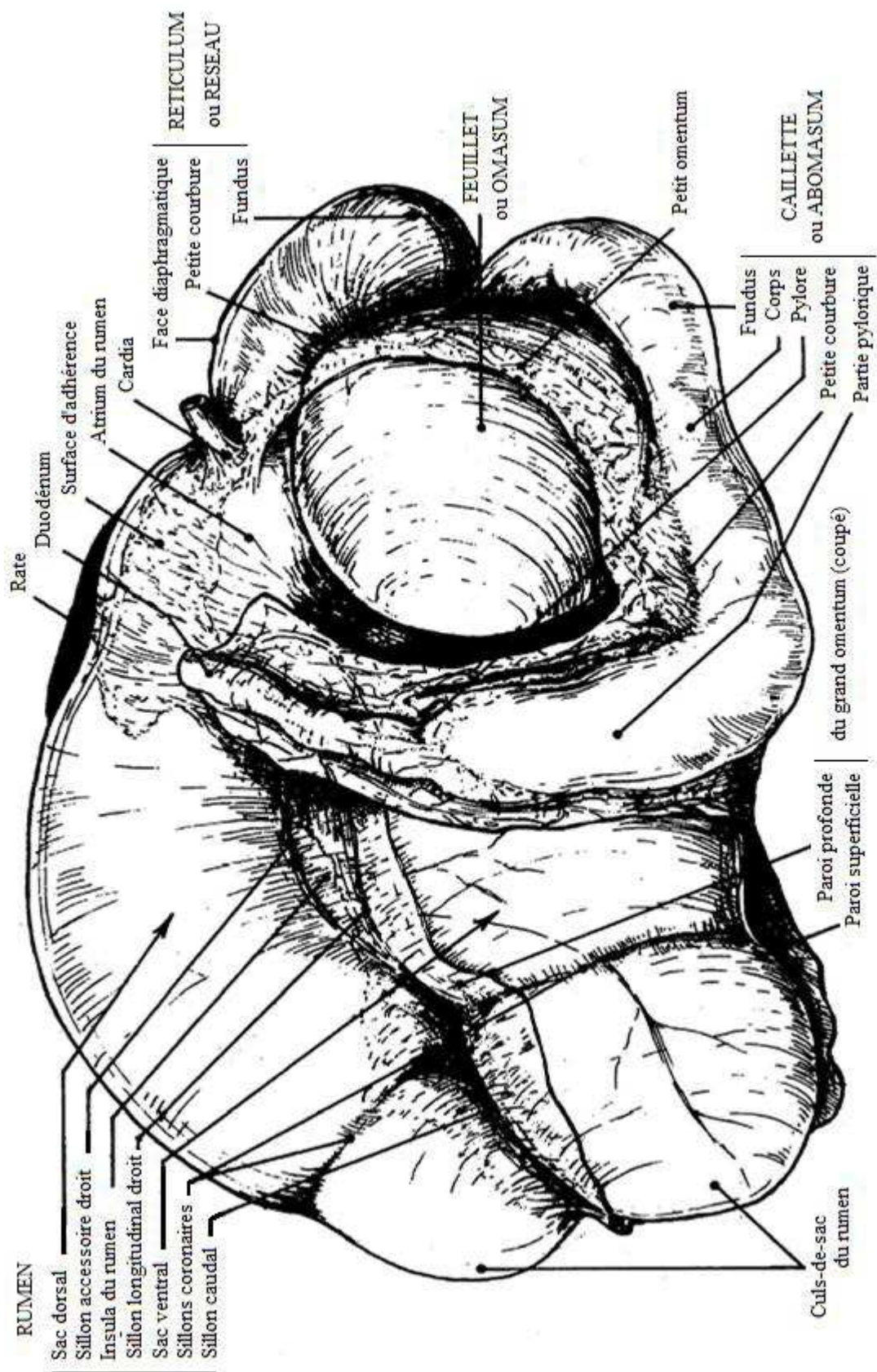


Figure 2 : Conformation extérieure du réticulo-rumen, face droite [1]



### **1.1.2. Conformation interne** (Figure 3)

A chaque sillon extérieur correspond un relief charnu intérieur : les piliers, portant le même nom. Se distinguent deux principaux piliers : le pilier caudal est épais et sépare le cul de sac ventral et le cul de sac dorsal, le pilier crânial forme une lame issue de l'adossement des parois de l'atrium et du récessus du rumen.

Le sac ventral et le sac dorsal communiquent par l'ostium intra-ruminal. Ce dernier est délimité par les piliers longitudinaux, le pilier crânial et le pilier caudal.

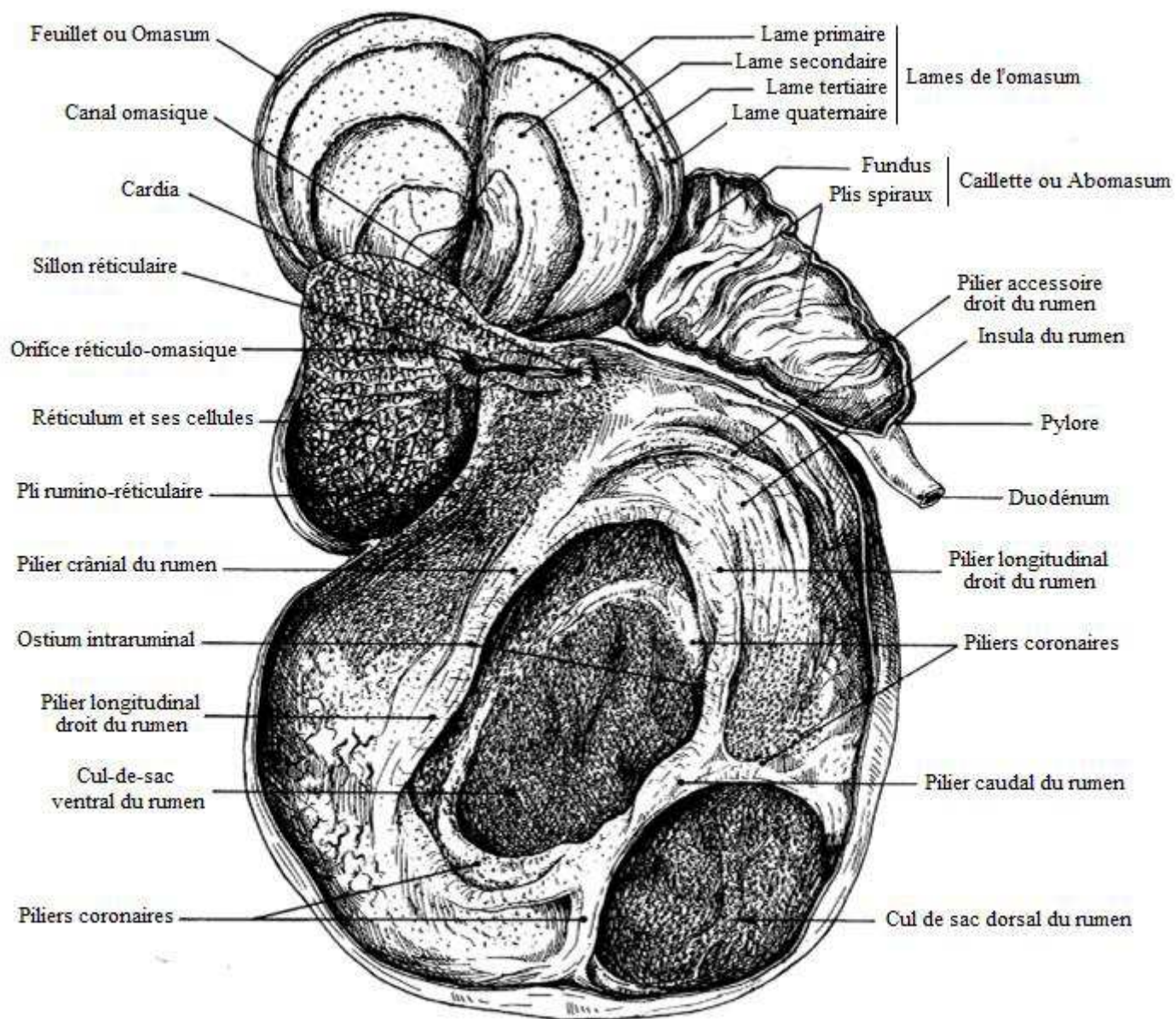
L'atrium du rumen est ouvert sur le réticulum par l'ostium rumino-réticulaire, mesurant environ 20 cm de long et 15 cm de large. Au plafond de l'atrium s'abouche l'œsophage.

La paroi ruminale est différente selon la région du pré-estomac. Au niveau du sac ventral et des culs de sacs caudaux, elle est tapissée de papilles dilomorphes, formant le champ papillaire. Ces papilles sont de taille réduite dans le sac dorsal du rumen, voire absentes sur les piliers et dans la région de l'insula du rumen.

Les papilles ruminales permettent d'augmenter la surface de contact avec le contenu ruminal afin d'optimiser l'absorption des acides gras volatils (AGV). La taille et la forme des papilles sont modulées par la ration alimentaire. En effet, leur développement nécessite la présence d'AGV, en particulier le butyrate (C4).



Figure 3 : Conformation intérieure du réticulo-rumen [1]



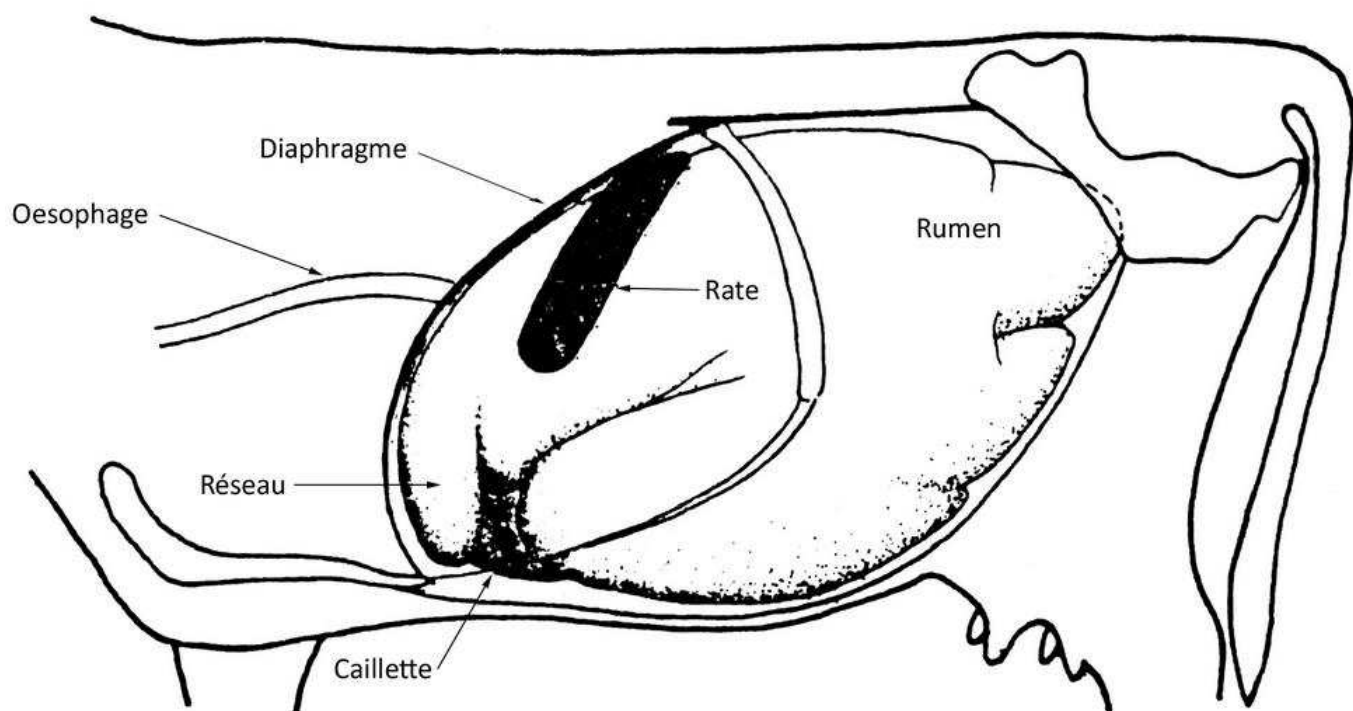
### 1.1.3. Topographie (Figure 4)

Crânio-caudalement, le réticulo-rumen s'étend du 7<sup>ème</sup> espace intercostal jusqu'à l'entrée du bassin.

Dorso-ventralement, il s'étend sur toute la hauteur de l'abdomen à gauche, de la région sous lombaire au plancher de la paroi abdominale. Du côté droit, le pré-estomac occupe la moitié ventrale de la cavité abdominale.

Dans son étendue transversale, le rumen se projette essentiellement du côté gauche, où il est accolé à la paroi abdominale. Pour autant, il déborde largement à droite du plan médian par son sac ventral, et dans une moindre mesure, par son sac dorsal également.

Figure 4 : Topographie du rumen, vue latérale gauche [104]



## **1.2. Paramètres physico-chimiques du réticulo-rumen**

### **1.2.1. L'anaérobiose**

Le milieu ruminal se caractérise par des conditions d'anaérobiose, l'oxygène représentant moins d'1% des gaz ruminiaux. Ces conditions sont permises grâce à l'absorption immédiate du dioxygène (O<sub>2</sub>) par les bactéries anaérobies facultatives. De plus, les apports d'oxygène sont très faibles, essentiellement par déglutition et par diffusion à partir des vaisseaux des parois [30].

Les gaz du milieu ruminal regroupent en majorité du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) (60%), du méthane (CH<sub>4</sub>) (27%), du diazote (N<sub>2</sub>) (7%) et du dihydrogène (H<sub>2</sub>) (0,2%) [125]. La majeure partie est éliminée par éructation, et une partie est incorporée dans divers métabolismes bactériens.

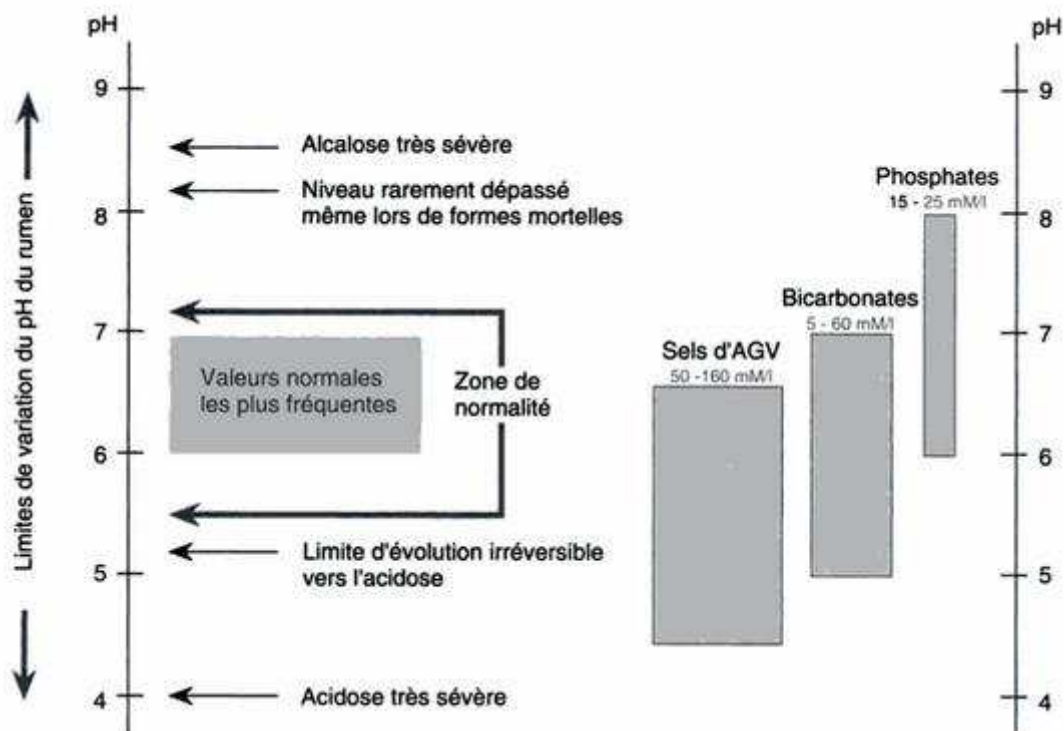
L'anaérobiose est essentielle pour garantir un milieu favorable au développement et au maintien des populations microbiennes, puisque la majorité des bactéries du rumen sont des anaérobies strictes : *Selenomonas ruminantium*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Lachnospira multiparus*, *Clostridium haemolyticum* et quelques espèces du genre *Treponema* [78].

### **1.2.2. Le pH**

La valeur physiologique du pH ruminal varie dans une large gamme, entre 5,5 et 7,3. La valeur optimale est autour de 6,2.

Le pH résulte d'un équilibre entre les acides : les AGV et l'acide lactique issus des fermentations microbiennes, et les bases : les bicarbonates (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et les phosphates contenus dans la salive (Figure 5). L'ammoniac provenant de la dégradation des protéines par les bactéries peut également jouer le rôle de base.

Figure 5 : Etendue des variations du pH du rumen et systèmes tampons [101]

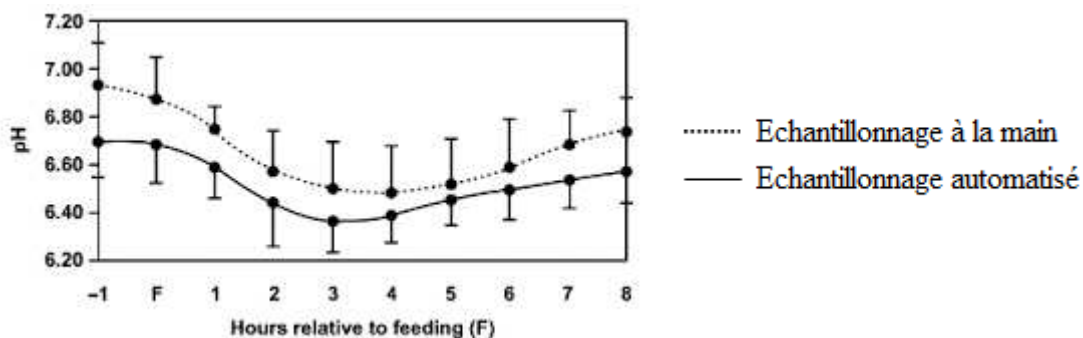


La gamme de variations est divisée en différentes zones correspondant à l'état normal et aux écarts possibles lors de déviations de l'activité fermentaire. Les tampons sont représentés en regard de l'échelle pH pour situer leur zone d'intervention.

Des variations physiologiques du pH ruminal sont observées en lien avec le repas (Figure 6). Par exemple, dans les 2 à 6 heures suivant la prise de nourriture, s'observe une diminution postprandiale du pH ruminal inhérente à la production d'AGV. Cette baisse de pH est d'autant plus importante que la ration est riche en amidon puisque la production d'AGV et d'acide lactique est plus élevée et la sécrétion salivaire moindre. S'en suit une remontée du pH ruminal liée à l'absorption des AGV à travers l'épithélium du rumen et la sécrétion salivaire abondante.

D'autre part, une augmentation du pH ruminal peut s'observer durant un jeûne.

Figure 6 : Evolution du pH ruminal en lien avec la prise alimentaire [81]

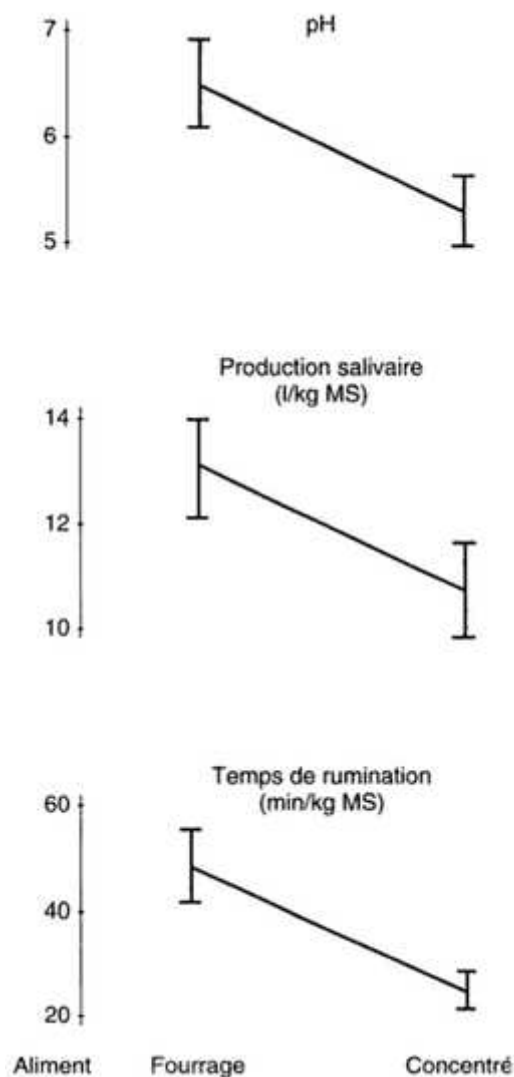




La salive possède un pH de 8,5 et sa production est très abondante (jusqu'à 200 litres par jour) [34]. Elle permet de limiter la chute de pH consécutive à l'accumulation d'acides formés par les réactions de fermentations ruminales, en particulier d'acide lactique, et ainsi, d'assurer un environnement ruminal stable. Le pouvoir tampon de la salive est essentiellement permis par les bicarbonates, et à moindre échelle par les phosphates [26]. En effet, la valeur du pKa de l'acide carbonique (6,25), proche des valeurs de pH physiologique du rumen, et les quantités importantes de  $\text{HCO}_3^-$  dans la salive (125 mmol/L) font du couple  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  un des principaux systèmes tampons du rumen [27].

Alors que la composition de la salive est relativement stable, la production salivaire est très variable d'un point de vue quantitatif. Elle est conditionnée en majeure partie par la durée de mastication et de rumination, dont le rôle est essentiel dans l'apport continu de salive dans le rumen. Ainsi, l'intensité de la sécrétion salivaire varie selon le type d'aliment, la granulométrie de la ration et la teneur en matière sèche (MS) [70]. Par exemple, une ration finement divisée s'accompagne d'un temps de rumination plus court par rapport à une ration plus riche en fourrages, et ainsi, d'une production salivaire moindre (Figure 7). De plus, une granulométrie fine accroît la fermentescibilité de la ration, et par conséquent, tend à abaisser le pH [101].

Figure 7 : Relation pH ruminal – production salivaire – temps de rumination en fonction du régime alimentaire [55]



**En conclusion, les variations du pH ruminal sont principalement dues au rythme de distribution des aliments, aux caractéristiques de la ration (teneur en MS, granulométrie), à la vitesse d'ingestion et à la sécrétion salivaire.**

### **1.2.3. La température [7, 101]**

La température ruminale est supérieure à la température rectale : elle est comprise 39 et 41°C, soit au moins un degré de plus par rapport à la température corporelle. Pour autant, elle est très variable : elle augmente lorsque les fermentations sont très intenses (jusqu'à 41°C) et diminue de plusieurs degrés après abreuvement (de 5 à 10°C).

La température ruminale est maximale après les repas.

### 1.2.4. Le potentiel d'oxydo-réduction

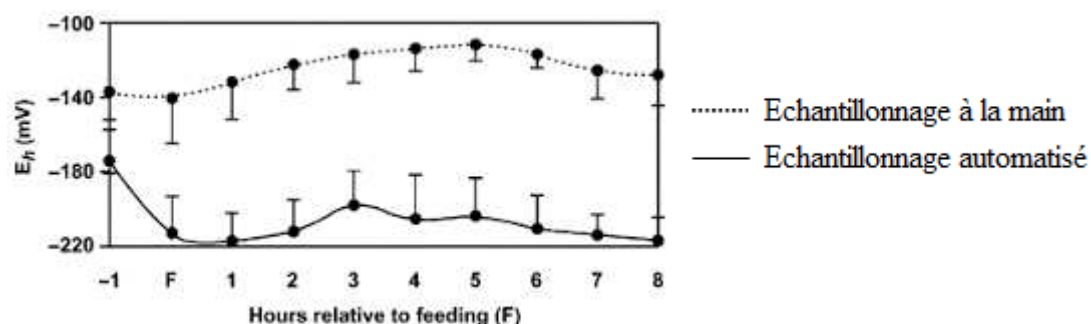
Du fait des conditions d'anaérobiose, le milieu ruminal est réducteur : son potentiel d'oxydo-réduction ( $E_h$ ) est très négatif, variant entre  $-150$  et  $-260$  mV. La gamme de variation du potentiel redox dépend fortement de la ration : il est plus élevé lorsque la proportion de concentrés dans la ration augmente [81].

Les heures suivant le repas, le potentiel redox augmente, avant de diminuer (Figure 8).

Les variations du  $E_h$  sont liées à la présence d'oxygène dans la phase gazeuse du rumen, suite à la déglutition ou à la diffusion depuis les capillaires sanguins. Le microbiote ruminal maintient le milieu très réducteur en consommant très rapidement l'oxygène introduit dans le rumen [6]. Ainsi, un gradient de potentiel redox s'établit entre la surface et la profondeur du milieu ruminal. La pénétration de l' $O_2$  n'excède pas 0,5 cm de profondeur au sein du contenu ruminal [101].

Le potentiel d'oxydo-réduction est généralement lié négativement au pH ruminal, mais cette relation n'est pas toujours significative [54].

**Figure 8** : Evolution du potentiel redox en lien avec la prise alimentaire [81]



### 1.3.5. La pression osmotique

La pression osmotique du contenu ruminal est voisine de celle du sang, en moyenne 250 mosm/L, ce qui favorise les échanges à travers la paroi du rumen. Cependant, elle varie au sein d'une gamme plus large, entre 200 et 400 mosm/L.

Lorsque le contenu ruminal est hyper-osmotique, s'observe un passage d'eau du secteur vasculaire au rumen. Le phénomène inverse se produit lors d'hypo-osmolarité du contenu ruminal.

La pression osmotique varie avec l'ingestion et l'abreuvement [4]. Une augmentation est observée après un repas : elle peut atteindre 350 à 400 mosm/L dans les 30 à 90 minutes suivant le repas [101]. Cette hausse de la pression osmotique s'explique par la dissolution des minéraux présents dans les aliments ingérés et la production d'AGV par fermentation microbienne [4].

La composition de la ration influence la pression osmotique. En effet, une proportion plus importante de concentrés dans la ration induit une augmentation de la pression osmotique [4]. Cependant, selon Giger-Reverdin *et al* (1997), la variation de pression osmotique serait plus liée à la teneur de la ration en glucides rapidement fermentescibles que par le pourcentage de concentrés.

### **1.3. Stratification du contenu ruminal**

Le contenu ruminal se divise en trois phases : la phase gazeuse, la phase solide et la phase liquide (Figure 9).

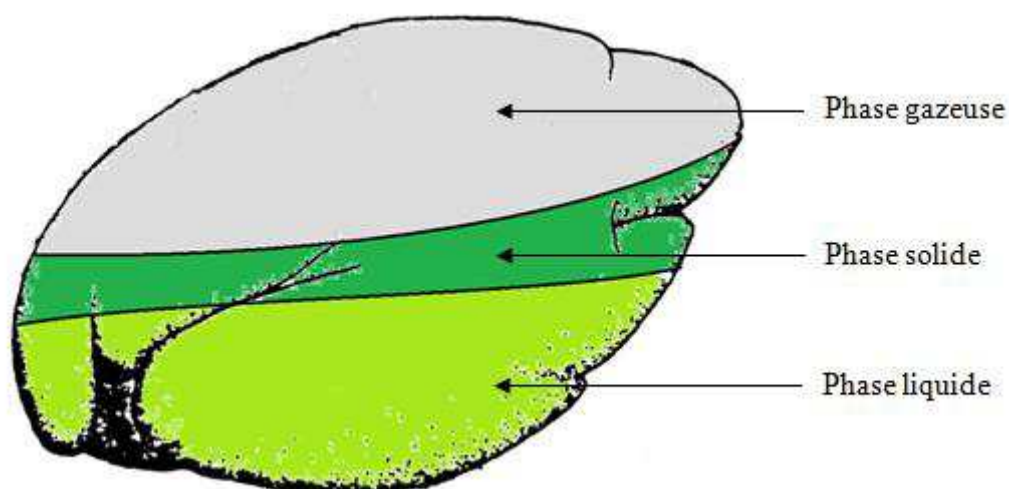
La phase gazeuse est située dans le sac dorsal du rumen. Elle provient en grande partie des fermentations microbiennes : la production horaire moyenne est de 25 litres. La composition des gaz issus de l'activité de la flore ruminale est dépendante de plusieurs phénomènes, notamment de la nature de l'aliment et du comportement alimentaire. Deux gaz sont majoritaires : le CO<sub>2</sub> (65%) et le CH<sub>4</sub> (35%). L'O<sub>2</sub> n'est retrouvé qu'à l'échelle de traces, étant donné sa consommation très rapide par les micro-organismes ruminants [51]. L'éructation permet l'évacuation de la phase gazeuse.

La phase solide correspond à la partie centrale du contenu ruminal. Elle se compose des particules grossières ingérées, qui sont destinées à la rumination. La teneur en MS de la phase solide est comprise entre 14 et 18% : elle représente la majeure partie de la matière sèche du contenu ruminal. D'autre part, elle contient environ 75% de la biomasse bactérienne totale du rumen.

La phase liquide se localise dans le sac ventral du rumen. Elle est issue de l'abreuvement, de l'eau apportée par les aliments et de la sécrétion salivaire (100 à 200 litres par jour). L'eau représente la fraction majoritaire du contenu ruminal, jusqu'à 85%. Au sein de la phase liquide, sont présents des particules alimentaires en suspension, des microorganismes et des molécules en solution. Dans le rumen, le rôle de l'eau est primordial : elle permet l'imbibition

des aliments, favorise les mouvements de brassage et est indispensable à l'action des enzymes digestives et à la croissance bactérienne [101].

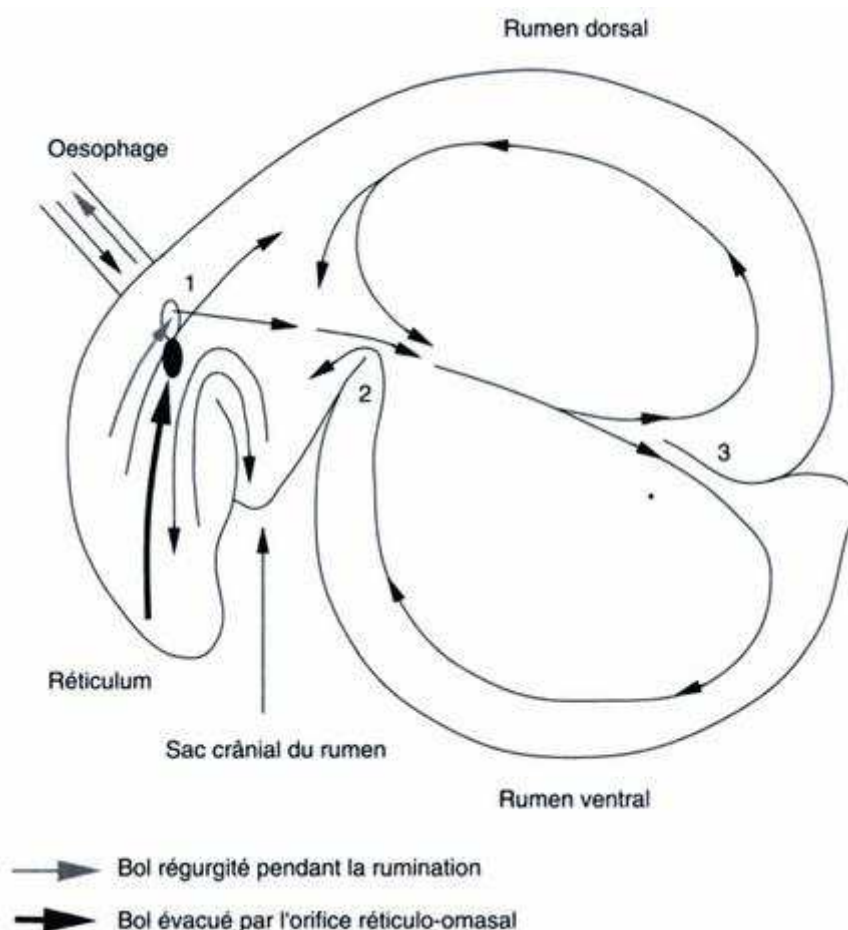
Figure 9 : Stratification du contenu ruminal [106]



#### **1.4. Motricité du réticulo-rumen [80]**

La motricité ruminale a trois principaux rôles (Figure 10). Tout d'abord, le brassage du contenu ruminal permet de renouveler les particules au contact des microorganismes et ainsi, d'augmenter le rendement des fermentations microbiennes. De plus, il favorise la stratification : les particules les plus fines sédimentent au fond du rumen pour être ensuite dirigées vers l'omasum, et les grosses particules restent dans le haut du rumen pour repartir vers la mastication. D'autre part, les contractions ruminales participent directement à la régurgitation physiologique du bol alimentaire pour la rumination, et à la vidange du rumen vers le feuillet. Enfin, les mouvements ruminiaux aident à l'éructation, importante pour l'évacuation des gaz de fermentation produits et ainsi, limiter la météorisation.

Figure 10 : Mouvements des digesta dans le réticulo-rumen [80]



Se distinguent deux types de cycles moteurs du réticulo-rumen : les cycles simples correspondant à des contractions du réseau et du rumen, et les cycles complexes caractérisés par des contractions secondaires du rumen (Figure 11).

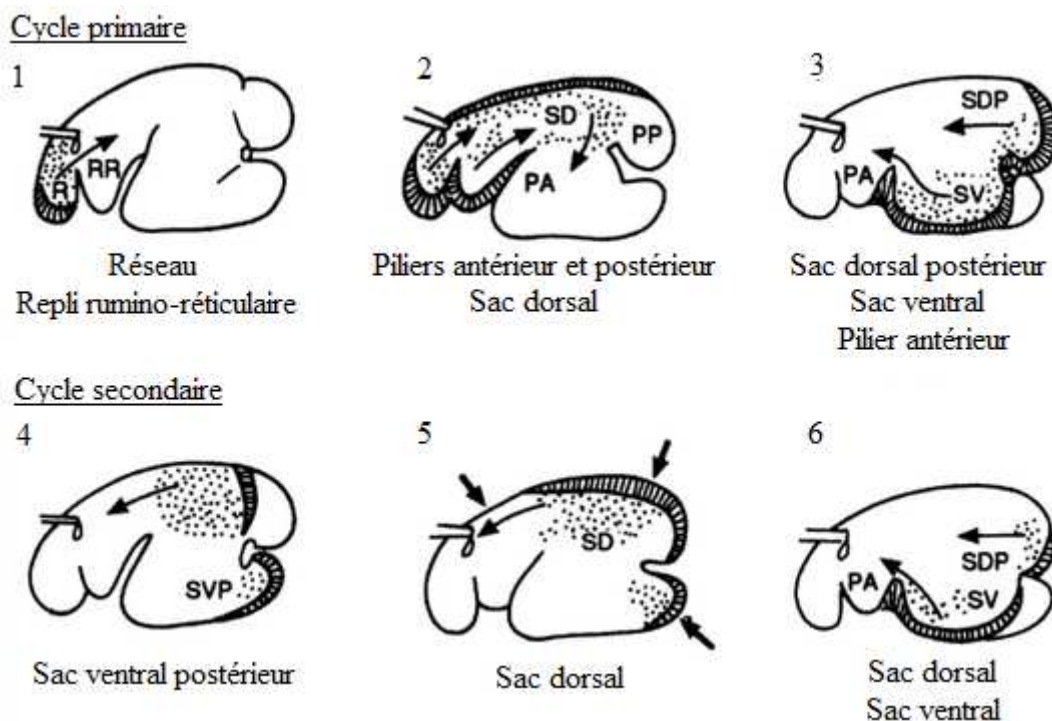
Le réseau subit des contractions régulières, une toutes les 55 secondes, et biphasiques : la première onde est une contraction partielle, et la seconde une contraction complète au cours de laquelle tout le contenu du réticulum bascule dans le rumen.

Un cycle simple correspond à l'enchaînement de contractions primaires : la contraction réticulaire (onde R) est suivie par la contraction du sac dorsal (onde D1), puis du sac ventral (onde V1). La propagation est alors crânio-caudale. Les cycles simples permettent le brassage du contenu ruminal et la vidange du rumen.

Après un repas, les contractions ruminales sont plus nombreuses que les contractions réticulaires. En effet, des contractions secondaires du rumen se propagent dans le sens inverse, caudo-crânialement : les ondes D2 et V2. Lorsque ces ondes sont précédées d'un cycle simple R-D1-V1, le cycle est dit complexe. Plusieurs séries d'ondes D2 et V2 peuvent se suivre avant le retour d'une contraction réticulaire. L'onde D2 correspond à la contraction

éruptive : elle intervient lorsque du gaz est au contact du cardia et concerne le sac dorsal du rumen.

Figure 11 : Cycle moteur du réticulo-rumen mettant en jeu successivement le réseau et le rumen [80]



*Le cycle réticulo-ruminal est dit complet lorsqu'un cycle primaire est suivi d'un cycle secondaire ou éructatif. La contraction primaire se propage de façon antérograde (1, 2, 3). La contraction secondaire débute au niveau du sac ventral postérieur et se propage de façon rétrograde (4, 5, 6).*

La rumination est permise par une contraction isolée du réseau, toujours suivie d'une onde R. Cette contraction est déclenchée par la présence de particules grossières au contact du cardia. Elle assure la régurgitation du bol alimentaire.

Les contractions du réticulo-rumen sont contrôlées par le nerf vague (nerf X) qui impose une activité rythmique intrinsèque. A l'échelle du rumen, cette motricité est modulée par deux types de récepteurs. Les mécanorécepteurs de la couche musculaire sont sensibles à l'étirement du rumen et provoquent une contraction. Les récepteurs épithéliaux sont des mécanorécepteurs et chémorécepteurs : ils sont sensibles à l'étirement, à l'acidité, aux AGV et à une forte osmolarité. Ils sont mis en jeu lors de fermentations excessives : ils inhibent les contractions et par conséquent, entraînent un arrêt de la rumination.

**Le réticulo-rumen est un fermenteur volumineux caractérisé par des conditions physico-chimiques particulières : anaérobiose, pH, potentiel redox, température, pression osmotique. Des mécanismes de contrôle permettent de maintenir ces paramètres les plus stables possibles, afin de garantir la survie du microbiote ruminal et l'optimisation des fermentations ruminales.**

**D'autre part, la mastication, la rumination et la motricité du réticulo-rumen interviennent dans l'accessibilité des particules alimentaires vis-à-vis de la micro-population ruminale.**

## **2. Environnement microbien du Rumen**

Le microbiote ruminal se caractérise par une extrême densité et diversité : il abrite des milliards de bactéries, plusieurs centaines de milliers de protozoaires et des dizaines de milliers de champignons.

La composition de la microflore ruminale influence directement les performances digestives et métaboliques du ruminant. En particulier, le rôle des bactéries est considéré plus important par rapport à celui des protozoaires et des champignons dans l'efficacité de la dégradation des aliments et la synthèse de protéines microbiennes, qui contribue à la production de viande et de lait [89].

### **2.1. Les bactéries**

La population bactérienne représente 50% de la biomasse microbienne et jusqu'à 10% de la matière sèche du réticulo-rumen, soit 1 kg du contenu ruminal. Le rumen d'un bovin adulte contient entre  $10^{10}$  et  $10^{11}$  bactéries par mL [118]. La majorité des bactéries ruminales sont anaérobies strictes, non sporulées. Plus de 200 espèces ont été isolées, dont une trentaine se retrouve uniquement dans le rumen.

Les populations bactériennes occupent l'ensemble du rumen : elles sont libres dans la phase liquide ruminale, liées aux particules végétales, associées à l'épithélium du rumen ou attachées à la surface des protozoaires [63, 141]. Les bactéries liées aux particules végétales, présentes dans la phase solide du contenu ruminal, sont les plus abondantes par leur nombre : elles correspondent à 75% de la population bactérienne totale. De plus, elles produisent jusqu'à 90% des enzymes ruminales endoglucanases et xylanases, essentielles à la dégradation des glucides pariétaux [135]. En comparaison, les bactéries associées à la phase



liquide du contenu ruminal représentent 20 à 30% de la microflore bactérienne [31, 89] et environ 1% des bactéries se trouve au niveau de la paroi ruminale [106].

Les bactéries ruminales peuvent être classées selon des critères morphologiques (forme, mode de groupement, présence ou absence de flagelles, nature de la paroi, mobilité...) ou selon des critères physiologiques (substrats, voies métaboliques...). Ainsi, la deuxième classification permet de distinguer : les bactéries cellulolytiques, les bactéries hémicellulolytiques, les bactéries pectinolytiques, les bactéries amylolytiques, les bactéries protéolytiques, les bactéries lipolytiques, les bactéries utilisatrices des glucides simples et les bactéries utilisatrices des acides organiques (Tableau 1) [29].

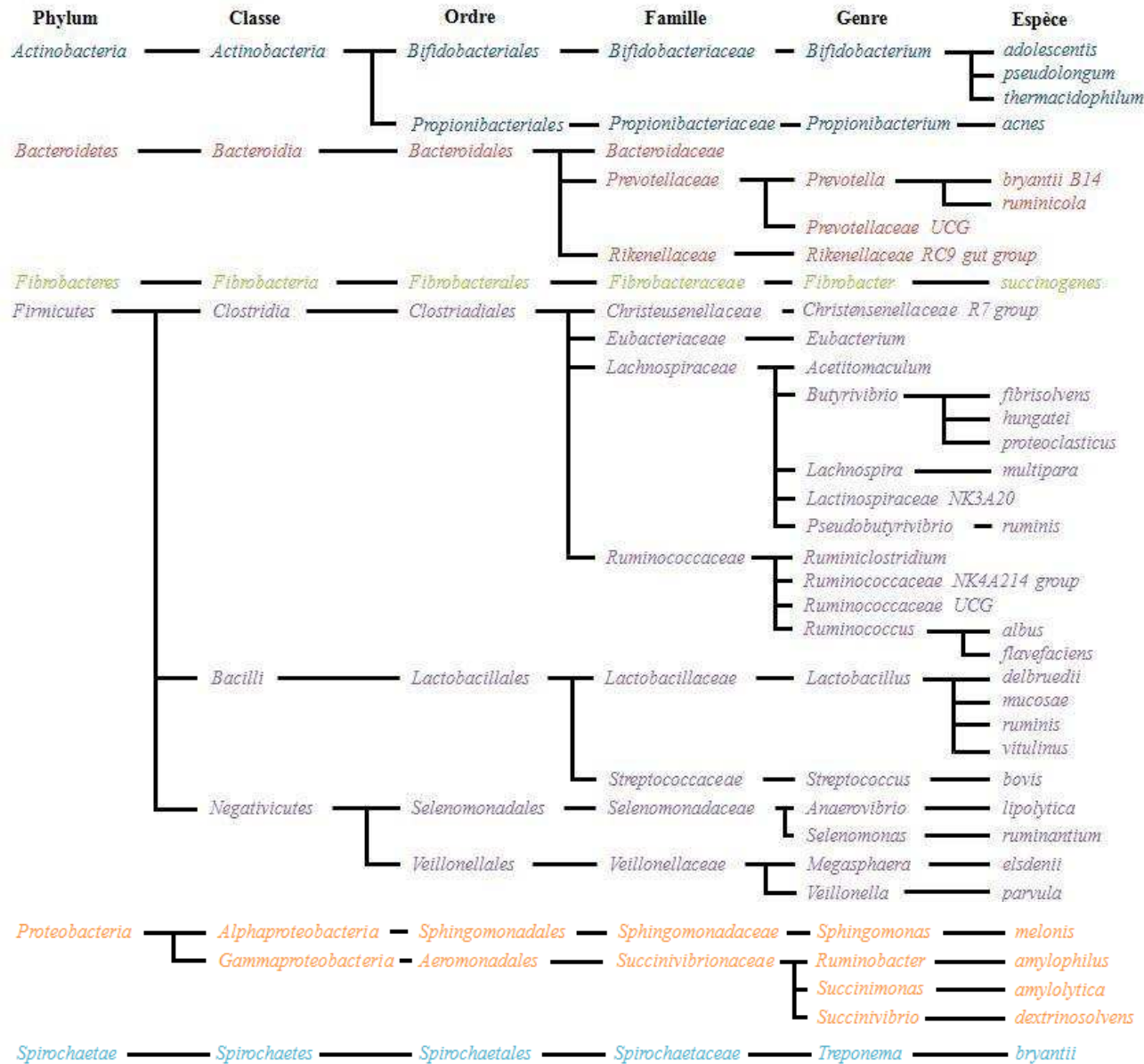
De part le développement des techniques de biologie moléculaire, la classification des bactéries s'établit autour de leur affiliation taxonomique par homologie et différence entre les génomes bactériens (Figure 12). De nombreuses études ont porté sur le pyroséquençage de l'ADNr 16S bactérien.

Deux phyla sont majoritaires dans le rumen des bovins : les Firmicutes et les Bacteroidetes, dont les familles les plus abondantes sont les Lachnospiraceae, les Ruminococcaceae, les Prevotellaceae et les Rikenellaceae [50, 146]. Les autres bactéries du rumen appartiennent aux phyla des Proteobacteria (3 à 5%), des Actinobacteria (2,5%), et en moindre abondance des Fibrobacteres et des Spirochaetae [69, 92]. La distribution spatiale des phyla est hétérogène entre les différentes phases du contenu ruminal. En effet, la phase liquide contient 49% de Firmicutes et 39% de Bacteroidetes, tandis que la phase solide compte 69% de Firmicutes et 29% de Bacteroidetes [120].

Tableau 1 : Fonctions des principales bactéries dans le rumen [18, 30]

	Hydrolyse						Substrats de fermentation								Produits de fermentation									
	Cellulose	Hémicellulose	Pectine	Amidon	Protéines	Lipides	Cellobiose	Glucose	Maltose	Saccharose	Galactose	Fructose	Pentoses	Lactate	Acides aminés	Acétate	Propionate	Butyrate	Formate	Succinate	Lactate	Ethanol	H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
<i>F. succinogenes</i>	+	+	+	+			+	+	+		+					+	+		+	+				
<i>R. flavofaciens</i>	+	+	+				+									+			+	+		+	+	+
<i>R. albus</i>	+	+	+				+									+			+	+		+	+	+
<i>B. fibrisolvens</i>	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+		+	+			+	+	+
<i>P. ruminicola</i>		+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+				
<i>L. multipara</i>			+				+	+		+		+				+					+		+	+
<i>S. bovis</i>			+	+	+		+	+	+	+	+				+	+					+			+
<i>R. amylophilus</i>				+	+				+							+			+	+	+	+		
<i>S. amylolytica</i>				+					+		+					+	+			+				
<i>S. ruminantium</i>				+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+		+	+
<i>L. ruminis</i>								+													+			
<i>L. vitulinus</i>								+													+			
<i>M. elsdenii</i>								+	+	+		+		+	+	+	+	+					+	+
<i>V. parvula</i>														+		+	+							
<i>A. lipolytica</i>						+					+					+	+			+			+	+

Figure 12 : Arbre phylogénétique des principaux taxons bactériens présents dans le rumen [87, 106]



### **2.1.1. Les bactéries fibrolytiques**

Les bactéries fibrolytiques ont la particularité de dégrader les glucides des parois végétales, comprenant la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. La majorité est présente dans la phase solide du contenu ruminal. Leur nombre est d'autant plus important que la ration est riche en fourrages. Les bactéries fibrolytiques représentent entre 4 et 9% de la population bactérienne ruminale [86], mais leur proportion peut atteindre jusqu'à 17% selon l'étude de Martin *et al* (2001).

Les bactéries fibrolytiques présentes dans le rumen sont essentiellement représentées par quatre espèces : *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* [32, 46, 118].

*Fibrobacter succinogenes*, anciennement *Bacteroides succinogenes*, est un bacille Gram négatif, anaérobie stricte. Elle représente l'espèce bactérienne cellulolytique dominante dans le rumen [118]. Elle se fixe aux fibres alimentaires dans les 5 minutes suivant l'ingestion, et atteint le maximum d'adhésion ( $10^9$  bactéries par gramme de MS) en 24 heures. La bactérie possède de nombreuses enzymes responsables de la dégradation de la cellulose. En effet, Forsberg *et al.* (1997) ont mis en évidence différentes cellulases produites par cette bactérie grâce à des études moléculaires et biochimiques : xylanase, acétylxylane estérase,  $\alpha$  arabinofuranosidase, et  $\alpha$  glucuronidase. Une activité hydrolytique moindre concerne la pectine. D'autre part, *F. succinogenes* utilise comme substrat de fermentation la cellobiose et le glucose [29]. Enfin, certaines souches sont capables de fermenter d'autres glucides, plus ou moins complexes, comme l'amidon, le maltose et le lactose. Les principaux produits issus de la fermentation sont l'acétate (C2) et le succinate [118], et en moindre quantité, le formate, l'isovalérate et le propionate (C3).

*Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* sont des coques Gram positif, anaérobies stricts, non motiles. Elles représentent les deux autres espèces bactériennes prédominantes dans le rumen, après *F. succinogenes*. La colonisation des fibres alimentaires est moins considérable par rapport à celle de *F. succinogenes*, mais elle reste tout de même notable :  $10^7$  bactéries par gramme de MS en 24 heures pour *R. flavefaciens* et  $10^6$  bactéries par gramme de MS en 48 heures pour *R. albus*. Ces deux ruminocoques hydrolysent la cellulose, l'hémicellulose et la pectine. Leur action fermentaire concerne essentiellement la cellobiose, mais quelques souches sont capables de fermenter certains glucides simples, en particulier le

glucose et des pentoses (par exemple le xylose). Les deux bactéries produisent essentiellement du C2, et en moindre proportion du formate et du succinate [18].

*Butyrivibrio fibrisolvens* est une bactérie polyvalente d'un point de vue métabolique : elle est capable de réaliser diverses fonctions. Son activité cellulolytique est moins importante par rapport à celle de *F. succinogenes* et des ruminocoques, mais son spectre d'activité s'étend à de nombreux autres glucides [18]. Outre la cellulose, *B. fibrisolvens* est capable d'hydrolyser l'hémicellulose et la pectine. Elle est une des principales espèces productrices de C4 [29]. Les autres produits de fermentation regroupent le formate et le C2 en faible quantité, ainsi que de l'éthanol, du lactate, du H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub>.

*Prevotella ruminicola*, anciennement *Bacteroides ruminicola*, est une espèce particulièrement ubiquiste. Elle possède une activité hémicellulolytique, à l'image de *R. flavefaciens*, *R. albus* et *B. fibrisolvens*. Cependant, ses principaux substrats restent l'amidon et les sucres simples. La bactérie produit les trois principaux acides gras volatils : le C2, le C3 et le C4 [18, 29].

*Lachnospira multiparus* ou *Lachnospira multipara* est la principale bactérie pectinolytique du rumen. Elle fermente la cellobiose et le glucose. Les produits de fermentation regroupent le lactate et le C2, ainsi que du CO<sub>2</sub> et du H<sub>2</sub> [118].

Outre *L. multipara*, d'autres bactéries possèdent des enzymes pectinolytiques : *B. fibrisolvens*, *P. ruminicola*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Treponema bryantii* et *Streptococcus bovis*.

### **2.1.2. Les bactéries amylolytiques et utilisatrices des glucides simples**

Le rumen contient de nombreuses bactéries amylolytiques : *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium*, sans oublier les bactéries cellulolytiques : *B. fibrisolvens* et *F. succinogenes*, dont l'activité amylolytique reste néanmoins secondaire. Le développement des bactéries amylolytiques est élevé lorsque la ration est riche en glucides rapidement fermentescibles (les sucres simples et l'amidon). Le principal produit de fermentation est le C3 lors de fermentation de l'amidon, ainsi que le C4 suite à la fermentation des sucres simples, et le lactate [18, 29].

*S. bovis* fait partie des quelques bactéries ruminales anaérobies facultatives : elle tolère l'oxygène. Elle utilise l'amidon comme principal substrat de fermentation. Elle est tout de

même capable de fermenter des glucides simples, comme la cellobiose, le glucose, le maltose, le galactose, le fructose et le lactose, mais elle ne possède pas l'arsenal enzymatique pour dégrader la cellulose. Son principal produit fermentaire est le lactate, mais elle peut produire du C2 et du formate lorsque la ration est riche en fourrages [18, 103]. La bactérie montre une certaine résistance à l'acidité : elle est ainsi retrouvée lorsque le pH ruminal avoisine 5,5. Son acido-résistance reste tout de même plus limitée que celle des lactobacilles : la croissance de *S. bovis* devient impossible en dessous d'un pH de 5 [17]. En raison de la production importante de lactate et de sa capacité d'acido-résistance, *S. bovis* joue un rôle particulier dans le développement de l'acidose lactique des Ruminants [118].

*R. amylophilus*, anciennement *Bacteroides amylophilus*, est capable de fermenter l'amidon et le maltose, mais pas le glucose. Elle produit du C2, du formate et du succinate, ainsi que du lactate et de l'éthanol en faible quantité. En général, la bactérie est présente en nombre réduit dans le rumen. Cependant, sa proportion augmente lorsque la ration est riche en amidon : elle peut atteindre jusqu'à 10% de la population bactérienne [3].

Certaines souches de *P. ruminicola* ont la capacité de fermenter l'amidon. Les principaux produits de fermentation sont le C2, l'acide formique et l'acide succinique.

*S. amylolytica* utilise l'amidon, le maltose et le galactose afin de produire en majorité de l'acide succinique.

*S. ruminantium* se caractérise par une acido-résistance élevée : elle peut persister à un pH inférieur à 5. Le bacille dégrade l'amidon et une large gamme de sucres simples. Il produit du lactate, à l'image de *S. bovis*, du C2 et du C3. Sont également issus de ses fermentations de faibles quantités de succinate, du H<sub>2</sub> et du CO<sub>2</sub> [118].

De nombreuses bactéries, fibrolytiques et amylolytiques, sont capables de dégrader les sucres simples, dont *B. fibrisolvans*, *P. ruminicola*, *S. bovis* et *S. ruminantium*. Néanmoins, un autre groupe bactérien présente une forte activité fermentaire des glucides simples : les lactobacilles. Les deux principales espèces rencontrées dans le rumen sont *Lactobacillus ruminis* et *Lactobacillus vitulinus*. Suite à la fermentation de divers glucides simples, les lactobacilles produisent essentiellement du lactate. *L. ruminis* synthétise principalement l'isomère L de l'acide lactique, alors que *L. vitulinus* produit l'isomère D [118]. Ces bactéries se caractérisent par une résistance importante à l'acidité : elles continuent de croître à des valeurs de pH ruminal inférieures à 5, alors que la majorité de la flore ruminale a alors

disparu. Ainsi, à des valeurs de pH extrêmement faibles, la population bactérienne est quasiment réduite à une monoculture de lactobacilles [103]. De part leur persistance à pH très acide et leur production importante de lactate, les lactobacilles contribuent au développement et au maintien de l'acidose lactique du rumen.

Enfin, au sein du phylum des Spirochaetae, l'espèce *Treponema bryantii* est capable de dégrader la plupart des sucres, à l'exception du fructose, en complément de son activité vis-à-vis de la pectine et de la cellobiose [122, 118].

### **2.1.3. Les bactéries utilisatrices de lactate**

Au sein de la flore procaryote ruminale, trois espèces montrent une activité lactolytique importante : *Selenomonas ruminantium*, *Megasphaera elsdenii* et *Veillonella parvula*.

Le pH optimum de fermentation de l'acide lactique est compris entre 6 et 6,5. Les voies de fermentation du lactate sont multiples. Le C2 est le produit fermentaire majoritaire en conditions normales. Cependant, la proportion de lactate converti en C3 augmente avec la concentration ruminale en acide lactique [83]. Du C4 est également formé suite à la fermentation du lactate par *M. elsdenii* [118].

Les bactéries utilisatrices de lactate jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'acidose lactique du rumen. En effet, grâce à la consommation de lactate, elles participent à la régulation de la concentration ruminale d'acide lactique et par conséquent, à l'équilibre du pH ruminal. Ainsi, elles font partie des mécanismes de contrôle de l'acidose aiguë du rumen. *M. elsdenii* est d'autant plus importante dans cette régulation qu'elle est la seule bactérie à conserver son activité lactolytique pour des valeurs de pH comprises entre 4,8 et 5,5 [15]. Sa croissance est inhibée pour des valeurs de pH inférieures à 4,8 [103]. D'après une étude de Counotte et Prins (1981), *M. elsdenii* contribue à hauteur de 60 à 80% dans la fermentation du lactate ruminal dans des conditions alimentaires normales.

### **2.1.4. Les bactéries protéolytiques**

Pour la plupart des bactéries ruminales, l'activité protéolytique est secondaire, de faible proportion par rapport à leur action principale de dégradation des glucides. En effet, la plupart des bactéries protéolytiques sont avant tout fibrolytiques ou amylolytiques. En contrepartie, elle est exercée par un nombre très important de bactéries : près de la moitié des souches bactériennes ruminales possède une activité protéolytique [29, 133].

L'espèce bactérienne la plus active dans la protéolyse ruminale est *R. amylophilus*, bactérie principalement amylolytique. Deux autres espèces semblent montrer une importance majeure : *B. fibrisolvens* et *P. ruminicola* [18]. Enfin, certaines souches de *S. bovis* et *S. ruminantium* jouent un rôle secondaire dans la dégradation ruminale des protéines.

Une étude de Wallace (1985) met en évidence une synergie entre les bactéries ruminales impliquées dans la dégradation des protéines, en particulier entre *S. bovis* et *S. ruminantium*, et entre *S. ruminantium* et *P. ruminicola*. Sur milieux de culture à base de caséine, l'auteur a observé une potentialisation de la croissance lorsque ces bactéries étaient associées, par rapport à des cultures pures [132].

### **2.1.5. Les bactéries transformant les lipides**

Le métabolisme des lipides se divise en deux étapes : la lipolyse et la biohydrogénation (BH). Plusieurs bactéries interviennent dans la lipolyse ruminale, à titre d'exemple des bactéries du genre *Butyrivibrio*, *Eubacterium* et *Fusocillus*. Néanmoins, le principal acteur de la digestion lipidique ruminale est *Anaerovibrio lipolytica*, bacille Gram négatif.

L'essentiel de la lipolyse est effectué par *A. lipolytica*. La bactérie possède une lipase extracellulaire, dont l'action est d'hydrolyser les triglycérides en acides gras libres (AGL) et en glycérol. Par la suite, la fermentation du glycérol donne lieu à la production de C3 principalement, et de succinate [43, 48]. Le pH optimal de croissance de *A. lipolytica* est 7,4 [43]. La bactérie est sensible à l'acidité : sa croissance diminue à pH 5,7, et elle est inhibée à partir d'un pH de 5,3 [45].

*A. lipolytica* est incapable d'hydrolyser les galactolipides et les phospholipides [29]. L'hydrolyse des phospholipides est permise par certaines souches bactériennes du genre *Butyrivibrio* [41].

La BH consiste en une série de réactions d'isomérisation et de réduction afin d'obtenir des acides gras saturés (AGS) à partir des acides gras insaturés (AGI) issus de la lipolyse. Kemp et Lander (1984) divisent les bactéries capables d'hydrogéner l'acide linoléique (c9c12-c18:2) et l'acide  $\alpha$  linoléique (c9c12c15-c18:3) en deux groupes : le groupe A et le groupe B.

Le premier réunit les bactéries qui réalisent les premières étapes de la BH. Il s'agit principalement de *B. fibrisolvens*, productrice d'acide ruménique (c9,t11-C18:2) et d'acide vaccénique (t11-C18:1). D'autres espèces bactériennes produisent différents isomères, comme le t10,c12-C18:2 pour *Propionibacterium acnes* [74] et pour *M. elsdenii*, bactérie



essentiellement connue pour son activité lactolytique, et le t9,t11-CLA et le t11-C18:1 produits par *S. ruminantium*.

Le second regroupe les bactéries dont l'activité enzymatique concerne l'ensemble des réactions de BH, jusqu'à l'obtention du produit terminal, l'acide stéarique (C18:0). Les bactéries du groupe B sont moins nombreuses, d'où la vitesse moindre de l'hydrogénation finale et l'accumulation de produits intermédiaires. Il s'agit de deux bactéries du genre *Butyrivibrio*, *B. hungatei* et *B. proteoclasticus*, et certaines souches d'*Eubacterium* et de *Fusocillus* [56].

Par ailleurs, l'étude de Kemp *et al* (1975) a montré que *Ruminococcus albus*, bactérie fibrolytique, possède une activité lipolytique importante.

Maia *et al* (2007) ont étudié le métabolisme du c9,c12-C18:2 chez 26 espèces bactériennes présentes dans le rumen, ainsi que sa toxicité sur cette population microbienne. D'autres espèces interviennent dans la digestion lipidique, et synthétisent des produits finaux variés (Tableau 2).

Tableau 2 : Produits de fermentation et capacité des principales espèces bactériennes du rumen à métaboliser l'acide linoléique [79]

Bactérie	Produits fermentaires
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	t11-C18:1
<i>Butyrivibrio hungatei</i>	t11-C18:1
<i>Clostridium aminophilum</i>	c9-C18:1
<i>Clostridium proteoclasticum</i>	c9,t11-C18:2 t11-C18:1 C18:0
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	C16:0
<i>Lachnospira multipara</i>	-
<i>Mitsuokella multiacidus</i>	c9-C18:1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	-
<i>Streptococcus bovis</i>	OH-C18:0

## 2.2. Les protozoaires

Les protozoaires présents dans le rumen sont des organismes eucaryotes unicellulaires. Ils représentent un peu moins de la moitié de la biomasse microbienne. Les protozoaires du rumen font partie de deux embranchements : les flagellés et les ciliés. Ces derniers sont les plus importants par leur nombre et leur influence sur la digestion [29].

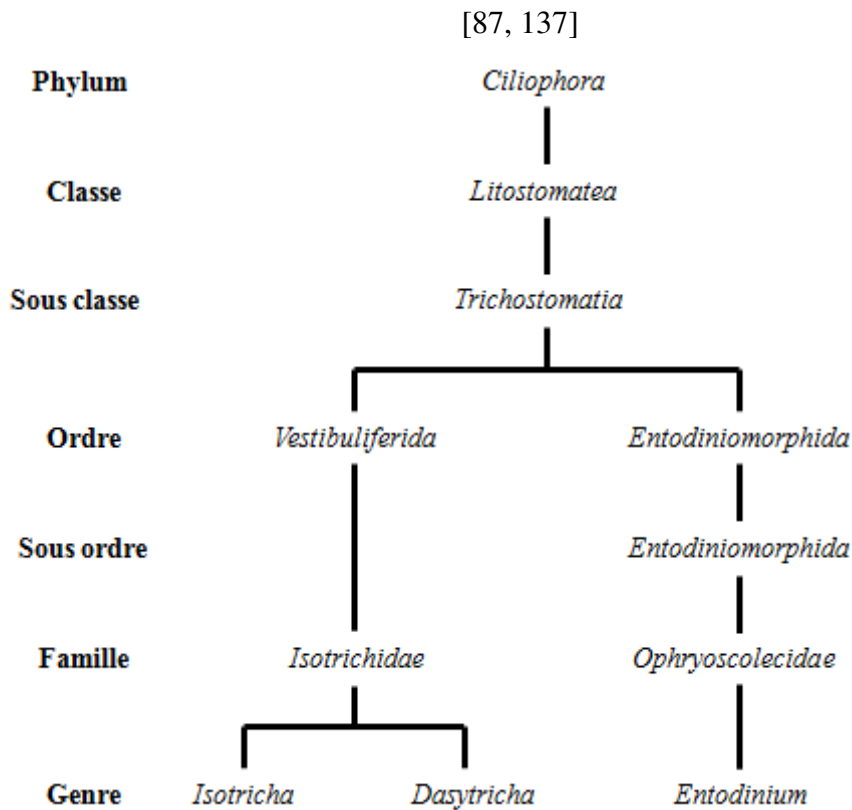
Les connaissances sur les protozoaires flagellés sont à ce jour limitées. Bien que leur concentration atteigne parfois  $10^3$  à  $10^4$  protozoaires/mL, leur contribution à la biomasse microbienne du rumen est considérée négligeable en raison de leur petite taille (4 à 15  $\mu\text{m}$ ). Ils participent à l'équilibre microbien du rumen par leur capacité à ingérer les bactéries [29].

La majorité des protozoaires ruminiaux appartient à l'embranchement des ciliés, caractérisé par la présence de cils vibratiles permettant leur mobilité. Leur concentration peut atteindre  $10^4$  à  $10^6$  par mL de contenu ruminal.

Ces protozoaires sont des microorganismes anaérobies stricts, dont la taille varie entre 20 et 150  $\mu\text{m}$ . Une partie se retrouve dans la phase solide du contenu ruminal, fixée aux particules végétales, tandis que d'autres sont libres dans la phase liquide [29, 51].

Les protozoaires ciliés sont représentés par deux groupes appartenant à la sous classe des Trichostomatia : les Holotriches et les Entodiniomorphes. Les premiers font partie de l'ordre des Vestibuliferida. Les seconds appartiennent à l'ordre des Entodiniomorphida, sous ordre des Entodiniomorphina, famille des Ophryoscolecidae. Les principaux genres rencontrés dans le rumen sont le genre *Entodinium* au sein des Entodiniomorphes, et les genres *Isotricha* et *Dasytricha* parmi les Holotriches [136, 137]. La taxonomie des protozoaires ciliés ruminiaux est détaillée dans la figure 13.

Figure 13 : Arbre phylogénétique des principaux protozoaires ciliés présents dans le rumen



Après phagocytose, les Entodiniomorphes sont capables de digérer au sein de leurs vacuoles digestives les parois cellulaires et les chloroplastes. Certains ont donc une activité cellulolytique.

Les Holotriches jouent un rôle important dans la dégradation des sucres solubles et de l'amidon. Une partie des produits de cette dégradation est stockée sous forme d'amylopectine. Lorsque la ration est riche en glucides, ce stockage permet une fermentation progressive de l'amidon, en diminuant l'accessibilité des substrats aux bactéries amylolytiques, et ainsi, de limiter le risque d'acidose.

Enfin, les protozoaires ont une activité protéolytique. Cette dernière est moins efficace que l'action bactérienne, mais elle a l'avantage de dégrader les protéines insolubles [51, 93, 136].

Les protozoaires ingèrent des particules alimentaires, mais également des bactéries et d'autres protozoaires. La prédation d'autres microorganismes ruminants permet d'une part de réguler les populations bactériennes et d'autre part, de récupérer les peptides, les acides aminés et les acides nucléiques pour leur propre synthèse cellulaire [51, 93, 136].

Les populations de protozoaires varient en nombre selon l'alimentation. En effet, leur nombre est plus important lorsque la ration est riche en fourrages, alors que les protozoaires

disparaissent pour des rations trop riches en concentrés suite à la baisse du pH ruminal car ils sont sensibles au pH acide. De plus, les protozoaires sont très sensibles à la non nutrition : 3 jours suffisent à leur disparition. A contrario, des ingestions fréquentes favorisent le développement des protozoaires [136].

### **2.3. Les champignons**

Les champignons présents dans le rumen sont anaérobies stricts. Trois genres sont décrits : *Neocallimastic*, *Piromonas* et *Caecomyces*. Leur concentration est moindre par rapport aux autres microorganismes ruminiaux :  $10^3$  à  $10^5$  zoospores par mL de contenu ruminal.

L'activité des champignons ruminiaux est essentiellement tournée dans la digestion des glucides pariétaux. Peu après l'ingestion des aliments, les zoospores se fixent sur les particules végétales, puis un système rhizoïdal pénètre les tissus lignifiés. Les activités enzymatiques mènent à la formation de cellobiose, qui est ensuite fermentée. Une autre caractéristique des champignons est la capacité à solubiliser la cellulose.

Des études menées à la station de recherche sur la nutrition des Herbivores de l'INRA montrent que l'activité protéolytique des champignons est faible. Elle se limite à l'hydrolyse de l'extensine des parois végétales grâce à des métalloprotéases.

Enfin, les champignons du rumen sont capables de fermenter la plupart des mono et disaccharides. Ce catabolisme glucidique se termine par la production de lactate, de formate, de  $C_2$ , de  $H_2$ , de  $CO_2$  et d'éthanol [51].

L'intervention des champignons dans la digestion ruminale est toutefois limitée, du fait d'une croissance très lente. Ils ne sont pas indispensables, parfois absents. Toutefois, ils montrent une importance relative pour des fourrages de mauvaise qualité.

### **2.4. Variations du microbiote ruminal**

Le microbiote ruminal se caractérise par une incroyable diversité de microorganismes. Le nombre et la proportion des différentes populations microbiennes peuvent varier suite à des changements de l'environnement ruminal, en particulier lors de modifications des conditions physico-chimiques du réticulo-rumen. Cette variabilité peut être physiologique, en lien avec la composition de la ration et son mode de distribution, ou à d'autres occasions, pathologique (dysbiose), par exemple lors d'acidose ruminale.

### **2.4.1. Variations physiologiques**

Le principal facteur influençant le microbiote ruminal est la composition de la ration. Le phénomène peut s'expliquer par le fait que les souches bactériennes ont chacune des activités enzymatiques dominantes adaptées à un type de substrat, même si un certain nombre d'entre elles sont polyvalentes. Ainsi, une proportion importante d'un type de substrat dans la ration favorise le développement de la population bactérienne utilisant ce dernier. Plusieurs essais ont été menés pour déterminer les variations du microbiote ruminal en fonction du régime alimentaire. Tajima *et al.* (2000) ont étudié les changements au sein des populations bactériennes lors du passage d'une ration riche en fourrages à une ration riche en concentrés, par séquençage à haut débit. Ils ont observé une chute du nombre de bactéries cellulolytiques, en particulier *F. succinogenes* et *R. flavefaciens*, ainsi que des bactéries pectinolytiques *S. dextrinosolvans* et *T. bryantii*. A l'inverse, les bactéries amylolytiques ont montré une croissance exponentielle suite au changement d'alimentation, en particulier *S. ruminantium*, *P. ruminicola* et *S. bovis*. Par contre, aucun changement important n'a été constaté pour *A. lipolytica*, principale bactérie lipolytique. Une autre étude menée chez des chèvres a montré une abondance des genres *Ruminococcus* et *Lachnospira* supérieure pour une ration riche en fourrages par rapport à une ration complète, et inversement pour le genre *Anaerovibrio* [77].

D'autre part, il existe une variation quantitative de la population bactérienne du rumen en lien avec la prise alimentaire. En effet, Leedle *et al.* (1982) ont constaté sur des vaches recevant un repas quotidien, une diminution du nombre de bactéries ruminales jusqu'à 4 heures après le repas, suivie d'une augmentation pour atteindre une valeur maximale à 16 heures post prandial. La diminution initiale peut s'expliquer par la dilution des populations bactériennes par les aliments et la salivation. Quant à l'augmentation observée par la suite, elle serait due à la croissance bactérienne en réponse à l'apport de nutriments.

Lors de jeûne, les protozoaires sont la première population microbienne du rumen à être touchée. Leur activité commence à décliner dès le premier jour de diète, avant de disparaître à 72 heures. De même, les bactéries sont mises à mal par une période de jeûne : leur nombre diminue progressivement les premiers jours, puis atteint des valeurs très faibles après 4 à 5 jours de diète [73].

Lors de la disparition des protozoaires ruminiaux, une augmentation des populations bactériennes est observée. La multiplication des bactéries s'explique par l'absence de l'activité prédatrice des protozoaires.

### **2.4.2. Variations pathologiques (dysbioses)**

Les variations du microbiote ruminal peuvent avoir une étiologie pathologique. La plus importante, tant d'un point de vue de la prévalence que des modifications des populations ruminales engendrées, est l'acidose du rumen.

L'acidose ruminale est une maladie très courante en élevage. Elle est due à la consommation d'une ration riche en glucides rapidement et hautement fermentescibles (GRHF) sur une durée très brève (acidose lactique aiguë) ou sur une période prolongée (acidose subaiguë). L'apparition d'une acidose ruminale n'est pas déterminée uniquement par un régime alimentaire riche en GRHF. En effet, d'autres facteurs sont associés au développement d'une acidose ruminale, comme le type d'aliment et les conditions de distribution et d'ingestion. Les aliments les plus fréquemment mis en cause sont les aliments riches en amidon, en particulier le blé et l'orge [16]. L'ingestion brutale d'une quantité très importante de concentrés est souvent accidentelle, et conduit à une acidose lactique aiguë. La majorité des cas d'acidose ruminale apparaissent pendant des périodes de transition alimentaire, lors du passage d'une ration à faible proportion de concentrés à un régime riche en concentrés. Ils sont alors liés à un apport en concentrés insuffisamment étalé dans le temps pour permettre l'adaptation de la population ruminale [68]. Selon Grohn et Bruss (1990), les périodes à risque pour les vaches laitières sont les 6 à 8 premières semaines post partum, et à un moindre degré, les 3 dernières semaines ante partum. Environ deux tiers des cas d'acidose surviennent dans les 2 premiers mois de lactation.

Les mécanismes à l'origine d'une acidose lactique aiguë sont complexes (Figure 14). L'apport d'une grande quantité de grains et, par conséquent, d'amidon, entraîne une production importante d'AGV. Le pH ruminal diminue. En réponse à l'acidité, la composition du microbiote ruminal est modifiée. Les protozoaires meurent lorsque le pH descend en dessous de 6, suivis par les bactéries fibrolytiques pour un pH inférieur à 5,5. La disparition des protozoaires s'accompagne de la perte de la fonction de stockage de l'amidon dans le rumen [8, 91, 103]. Au fur et à mesure de la baisse du pH, la diversité bactérienne s'amenuise : *S. bovis* et les lactobacilles deviennent prédominants grâce à leur tolérance à l'acidité. *S. bovis* oriente alors son métabolisme vers la production d'acide lactique, au lieu de la synthèse d'AGV. L'accumulation de lactate est renforcée, et le pH ruminal continue de diminuer. Lorsqu'il est inférieur à 5, *S. bovis* et les bactéries lactolytiques ne se développent plus, au profit des lactobacilles qui possèdent une forte capacité d'acido-résistance [116]. Ces

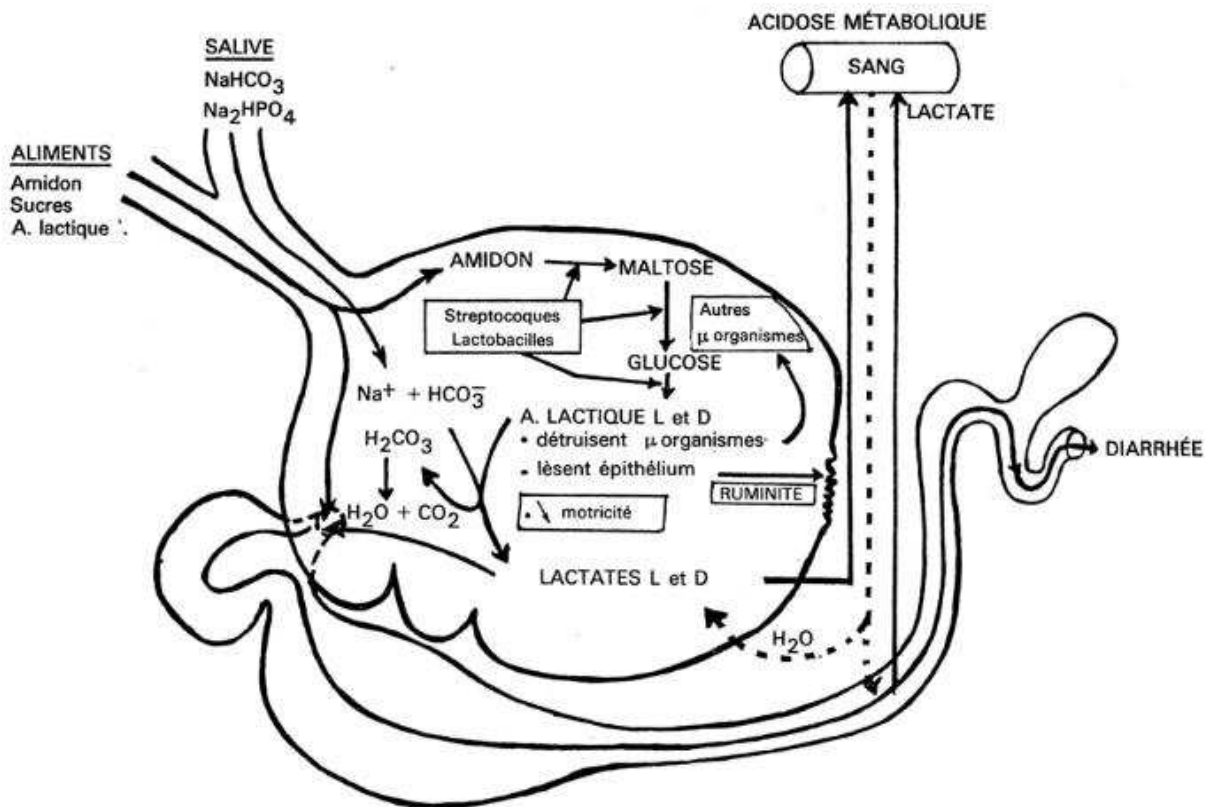
derniers peuvent représenter jusqu'à 90% de la flore bactérienne pour des valeurs de pH aux alentours de 4,5 [24].

Lors d'une acidose subaiguë, s'observent une diminution de la population cellulolytique et une augmentation de la population amylolytique. L'accumulation importante d'acide lactique n'a pas lieu, puisque les bactéries utilisant le lactate sont présentes. La pathologie se caractérise par des pics de concentration ruminale en lactate, et une diminution modérée du pH ruminal [68]. La principale modification biochimique est une augmentation des concentrations en AGV [95].

La modification du microbiote du rumen s'accompagne de modifications biochimiques. Tout d'abord, pendant les 8 premières heures, s'observe une augmentation des AGV, suivie d'une accumulation d'acide lactique [107]. Le lactate a un fort pouvoir osmotique : il attire l'eau dans le rumen. Les signes cliniques associés à l'augmentation de l'osmolarité ruminale sont une déshydratation et des diarrhées [100].

De plus, l'acide lactique est un agent caustique : il entraîne des lésions de la paroi du rumen affectant l'intégrité de l'épithélium ruminal. Ces lésions se traduisent par une ruminite lors d'acidose aiguë, et une parakératose lors de chronicité. L'altération de la paroi ruminale permet le passage du lactate dans le sang, à l'origine d'une acidose métabolique. La baisse du pH sanguin bloque le cycle de Krebs, et conduit à des lésions dans d'autres organes comme le foie, le cœur et les reins. Par ailleurs, l'acide lactique passe dans la caillette et les intestins : il favorise le développement d'ulcères abomasaux et de diarrhées [103]. Enfin, les lésions de la paroi ruminale entraînent le passage des bactéries dans le sang, et par conséquent, la formation d'abcès, en particulier hépatiques. Des troubles locomoteurs, principalement la fourbure, et un arrêt de la motricité du rumen sont également observés lors d'acidose ruminale.

Figure 14 : Pathogénie de l'acidose lactique ruminale [8]



En élevage laitier, accroître la proportion de concentrés dans la ration a pour but d'augmenter la production laitière. Néanmoins, les bénéfices à court terme engendrés par une production laitière plus élevée sont souvent estompés par les répercussions à long terme sur la santé de l'animal.

**Le rumen est un véritable écosystème microbien, où les relations entre microbiote, contenu ruminal et conditions physico-chimiques sont très étroites. Les modifications de la population bactérienne ruminale sont particulièrement liées à des facteurs alimentaires. Il est alors intéressant d'éviter les pratiques d'élevage susceptibles de déséquilibrer le microbiote du rumen, d'autant plus que les bactéries ruminales sont responsables de l'efficacité de la digestion microbienne.**



### **3. Digestion des aliments d'origine végétale par les microorganismes ruminiaux**

#### **3.1. Digestion des glucides**

Les glucides représentent 75% de la masse du tissu végétal. Ils regroupent les glucides pariétaux (la cellulose, l'hémicellulose et la pectine), les glucides de réserve (l'amidon) et les sucres simples.

Après adhésion des microorganismes aux particules alimentaires, la digestion des glucides pariétaux et de l'amidon se divise en deux étapes : une hydrolyse extracellulaire permise par la sécrétion de nombreuses enzymes bactériennes, puis une fermentation intracellulaire des sucres libérés suite à la première étape. Les glucides hydrosolubles (oses et les diholosides) présents dans les cellules végétales sont directement absorbés par les microorganismes, et suivent un processus fermentaire similaire aux produits d'hydrolyse des polyholosides.

La digestibilité de chaque nutriment est appréciée grâce à un coefficient d'utilisation digestive (CUD) (Tableau 3). Le CUD correspond au rapport entre la quantité de nutriment ingérée et la quantité absorbée au niveau de l'intestin après digestion. Le CUD d'un nutriment peut être difficile à estimer du fait de l'existence de phénomènes d'interaction digestive entre les différents aliments ingérés [90].

Tableau 3 : Coefficient d'utilisation digestive, microorganismes impliqués et principaux produits formés lors de la digestion des différents glucides chez les Ruminants

	<b>Coefficient d'utilisation digestive</b>	<b>Microorganismes impliqués</b>	<b>Produits principaux formés</b>
<b>Cellulose</b>	40 à 90%	<p><b>Bactéries</b> (<i>R. albus</i>, <i>R. flavefaciens</i>, <i>F. succinogenes</i>)</p> <p><b>Protozoaires</b> <i>Entodiniomorphes</i></p> <p><b>Champignons</b></p>	
<b>Hémicellulose</b>	80 à 90%	<p><b>Bactéries</b> (<i>B. fibrisolvans</i>, <i>P. ruminicola</i>, <i>R. albus</i>, <i>R. flavefaciens</i>)</p> <p><b>Protozoaires</b> <i>Entodiniomorphes</i></p> <p><b>Champignons</b></p>	<p><b>C2</b></p> <p>CO<sub>2</sub></p> <p>CH<sub>4</sub></p>
<b>Pectines</b>	100%	<p><b>Bactéries</b> (<i>L. multiparus</i>, <i>B. fibrisolvans</i>, <i>P. ruminicola</i>, <i>T. bryantii</i>)</p> <p><b>Protozoaires</b></p>	
<b>Amidon</b>	<p>90 à 95% pour le blé et l'orge</p> <p>50 à 90% pour le maïs et le sorgho</p> <p>[109]</p>	<p><b>Bactéries</b> (<i>S. bovis</i>, <i>R. amylophilus</i>, <i>P. ruminicola</i>, <i>S. amylolytica</i>, <i>S. ruminantium</i>, <i>B. fibrisolvans</i>, <i>F. succinogenes</i>)</p> <p><b>Protozoaires</b> <i>Isotrichidae</i></p>	<p><b>C3</b></p> <p>CO<sub>2</sub></p> <p>CH<sub>4</sub></p>
<b>Sucres simples</b>	100%	<p><b>Bactéries</b> (<i>S. bovis</i>, <i>R. albus</i>, <i>R. flavefaciens</i>, <i>S. dextrinosolvans</i>, <i>S. ruminantium</i>, <i>B. fibrisolvans</i>, <i>L. ruminis</i>, <i>L. vitulinus</i>, <i>T. bryantii</i>)</p>	<p><b>C4</b></p> <p>CO<sub>2</sub></p> <p>CH<sub>4</sub></p>

La fermentescibilité des glucides végétaux diffère selon leur nature, leur origine botanique et les éventuels traitements technologiques appliqués à la plante (broyage, aplatissage, pression) (Figure 15). A titre d'exemple, la présence de protéines sur l'enveloppe des grains d'amidon constitue une limite importante à leur dégradation [10].

**Figure 15** : Fermentescibilité des différentes sources glucidiques (par ordre de vitesse décroissante de fermentation) [138]

<b>Sucres</b>	>	<b>Inuline</b>	>	<b>Amidon</b>	>	<b>Cellulose</b>
Pulpes d'agrumes		Pulpes de betteraves		Grains > Pommes de terre		Pellicules de graines issues de céréales
Mélasses		Racines d'endives		Blé, seigle > Orge, avoine > Maïs > Sorgho		Drèches de brasserie
Betteraves		Topinambours		Immature ou ensilé > Sec		Fourrages jeunes
Fruits				Farine fine > Farine grossière		
Tiges de maïs et de sorgho				Forme cuite >> Forme crue		
Lactosérum et dérivés						

### **3.1.1. Dégradation des glucides pariétaux**

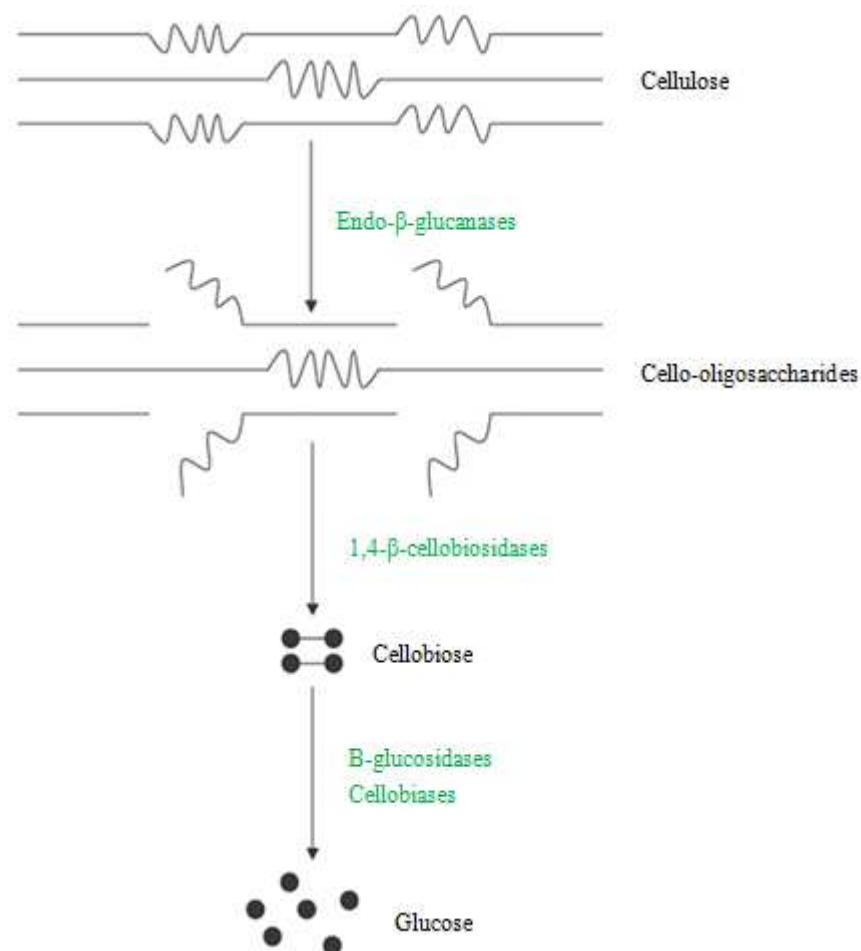
Les glucides pariétaux sont les composants des parois cellulaires. Ils représentent 30 à 40% de la MS végétale pour des fourrages jeunes, et jusqu'à 60 à 75% pour les stades les plus tardifs [110]. Ils forment une trame assurant la rigidité des structures végétales.

La digestion ruminale des glucides pariétaux est réalisée par les bactéries fibrolytiques, qui colonisent les fibres alimentaires après fixation, par les protozoaires, qui ingèrent des petites particules en suspension, et par les champignons, qui pénètrent dans les tissus végétaux grâce à leur rhizoïde. Dans le rumen, le degré de dégradation des parois des cellules végétales évolue en sens inverse de la teneur en lignine, c'est-à-dire de l'âge de la plante. Par exemple, la digestion des parois d'un ray-grass jeune est de l'ordre de 90%, alors que celle de la paille de blé n'est que de 40% [51].

La cellulose est le constituant principal des parois végétales, composé d'une chaîne linéaire de glucoses reliés par des liaisons  $\beta$  1-4. Plusieurs polymères sont assemblés par des liaisons faibles de type hydrogène : ils forment alors des microfibrilles de cellulose, très résistantes.

Les microorganismes ruminiaux sécrètent plusieurs types d'enzymes qui agissent en synergie : chaque enzyme produit le substrat de la suivante (Figure 16). Les endo- $\beta$ -glucanases rompent de manière aléatoire les liaisons  $\beta$ 1-4 des chaînes glucosiques pour former des cello-oligosaccharides. Par la suite, les 1,4- $\beta$ -cellobiosidases (4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase) découpent les cello-oligosaccharides en unités de cellobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la cellulose. Enfin, les  $\beta$ -glucosidases et les cellobiases hydrolysent les produits précédents en glucose [51].

Figure 16 : Dégradation enzymatique de la cellulose [67]



L'hémicellulose diffère de la cellulose par la présence de monomères distincts du glucose, sous forme de courtes chaînes latérales de xylose, galactose, mannose ou arabinose, liées au polymère de glucose.

La digestion ruminale de l'hémicellulose est permise par tous les types de microorganismes ruminants : les bactéries, les protozoaires et les champignons [37]. Les bactéries du rumen sécrètent tout un panel d'enzymes intervenant dans l'hydrolyse de l'hémicellulose : des xylanases, des  $\beta$ -glucosidases ou encore des  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases, dont une a été isolée chez *R. albus* [12].

Hillaire *et al* (1990) ont montré que les champignons du rumen produisent des enzymes actives contre la cellulose et l'hémicellulose et que leur présence dans le rumen améliore de 30 à 50% la digestion des glucides pariétaux de la paille de blé.

Les pectines sont des polymères de molécules d'acide uronique, le plus souvent l'acide galacturonique, liées en  $\beta$  1-4. Entre les monomères, s'intercalent des molécules de rhamnose. Les pectines forment des fibres solubles, très facilement digérées par les microorganismes du rumen : la totalité des pectines est hydrolysée dans le réticulo-rumen.

Les enzymes pectinolytiques sont sécrétées par des bactéries et des protozoaires [51]. Les champignons ne semblent pas intervenir dans l'hydrolyse des pectines [44].

### **3.1.2. Dégradation de l'amidon**

L'amidon est un glucide de réserve des végétaux. Il correspond à un polymère de glucose formé par des liaisons de type  $\alpha$ 1-4.

La digestion enzymatique de l'amidon est essentiellement réalisée par les bactéries amylolytiques et quelques protozoaires. Les derniers sont capables d'ingérer les grains d'amidon afin de réaliser une fermentation intracellulaire. Concernant les bactéries, plusieurs enzymes interviennent. La première, l' $\alpha$ -amylase, est libérée dans la phase liquide du rumen. Son activité consiste à rompre les liaisons  $\alpha$ -glucosidiques pour donner du maltose. Les autres enzymes intervenant après transport du maltose dans la bactérie sont des dextrinases intracellulaires. Elles rompent les liaisons afin de libérer deux molécules de glucose, qui seront par la suite fermentées dans la bactérie.

La totalité de l'amidon n'est pas hydrolysée dans le réticulo-rumen : une fraction est digérée dans l'intestin grêle grâce aux amylases pancréatiques.

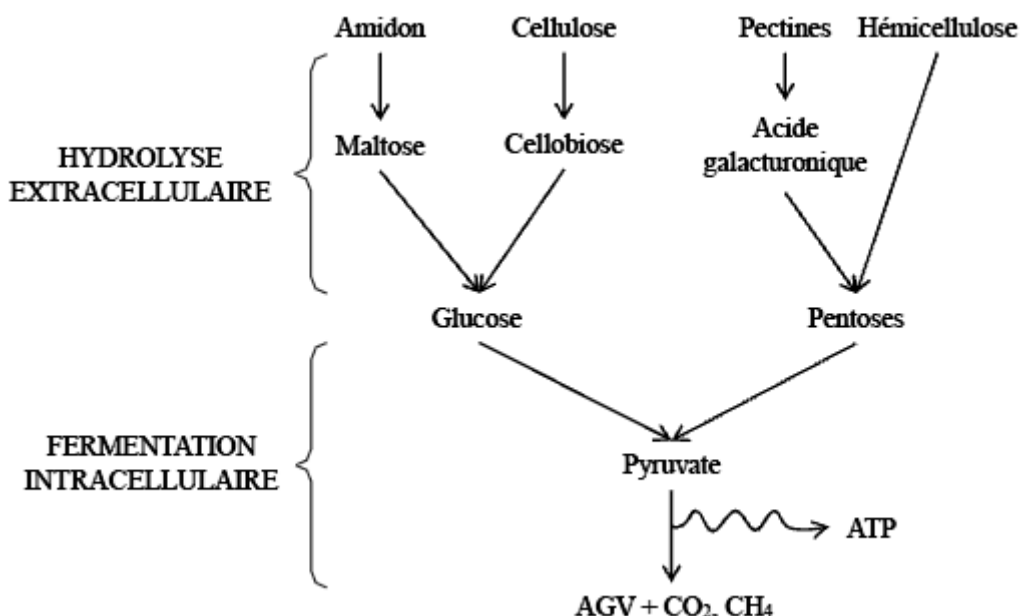
### **3.1.3. Métabolisme bactérien des oses simples**

Les sucres simples absorbés par les bactéries et les produits issus de l'hydrolyse des glucides pariétaux et de l'amidon subissent un métabolisme intracellulaire. Ils sont transformés en pyruvate par la voie d'Emden-Meyerhof. Par la suite, le pyruvate est rapidement catabolisé en AGV (C2, C3 et C4) et en gaz ( $\text{CO}_2$  et  $\text{CH}_4$ ) [37]. A noter que la machinerie fermentaire produit également de la chaleur, de l'ordre de 500 à 600 kcal par jour pour une vache laitière [138]. Les deux réactions libèrent de l'énergie sous forme d'adénosine tri-phosphate (ATP). Cette dernière est utilisée par les microorganismes ruminiaux pour leur croissance [37].

### **3.1.4. Devenir des produits terminaux de la digestion des glucides**

Les produits terminaux issus de la digestion des glucides végétaux sont les AGV, dont leurs proportions respectives sont variables, le  $\text{CO}_2$  et le  $\text{CH}_4$  (Figure 17).

Figure 17 : Dégradation et utilisation des glucides par les bactéries ruminales



L'absorption des AGV est principalement réalisée au niveau de l'épithélium des papilles ruminales, présentes en nombre élevé dans le sac ventral du rumen. Néanmoins, une partie des AGV est également assimilée à travers la paroi des autres pré-estomacs, en particulier le réticulum et l'omasum [51].

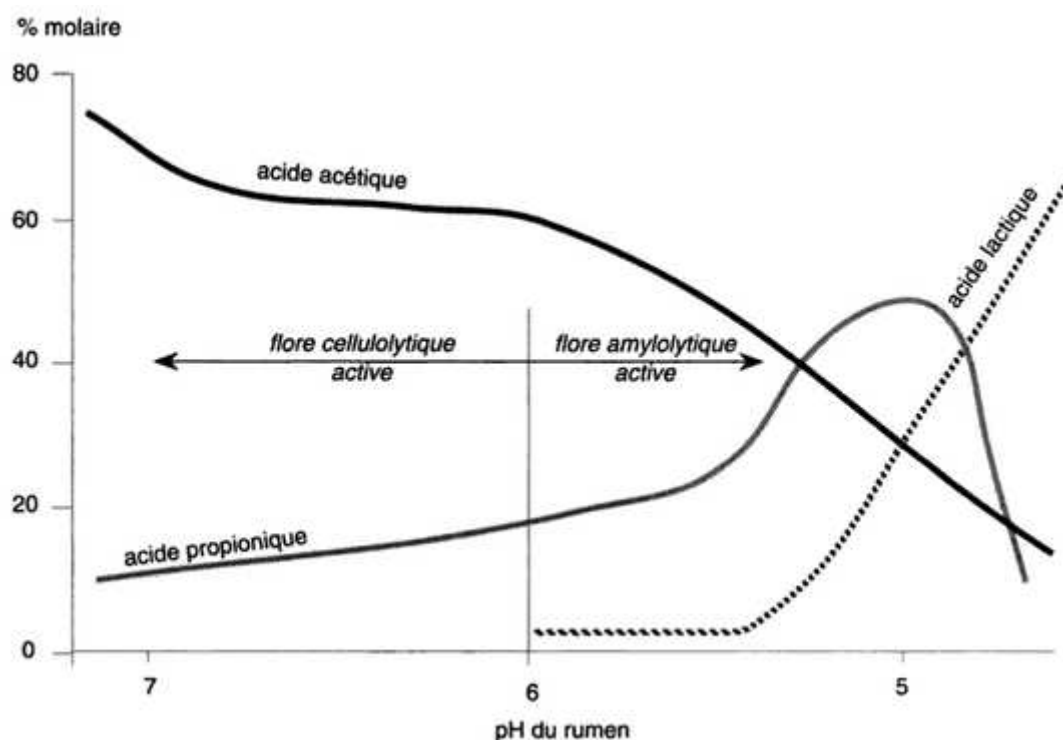
La production d'AGV est très importante dans le rumen : elle est estimée à 3 kg par jour. Un pic de production est observé 4 heures après la prise alimentaire. Au moins 80% des AGV proviennent de la fermentation ruminale des glucides. Ils représentent la source majeure d'énergie pour les Ruminants : ils peuvent couvrir jusqu'à 70% des besoins énergétique de l'animal [138].

Les proportions respectives en AGV dépendent majoritairement du régime alimentaire. Les rations riches en fourrages induisent une augmentation de la formation de C2 puisque les bactéries fibrolytiques produisent préférentiellement du C2. Au contraire, lorsque la quantité de concentrés augmente dans la ration, la production de C3 est favorisée en raison de l'hydrolyse de l'amidon, au détriment de la formation de C2. Enfin, les aliments riches en glucides solubles, tels que la betterave, conduisent à l'augmentation de la production de C4 [37, 119].

D'autre part, le pH ruminal joue un rôle dans la production des principaux AGV. En effet, chaque souche bactérienne montre une préférence pour une plage de pH. Ainsi, un pH ruminal haut favorise le développement des bactéries fibrolytiques, et par conséquent, la

production de C2, alors qu'un pH ruminal bas avantage la population amylolytique productrice de C3 [55]. Le phénomène est illustré sur la figure 18.

Figure 18 : Effets du pH ruminal sur l'orientation des fermentations dans le rumen [55]



Enfin, la quantité d'AGV produits dans le rumen dépend de la vitesse de dégradation du substrat. En effet, une teneur importante d'amidon dans la ration induit une production intense d'AGV en un temps réduit, puisque la dégradation de l'amidon est un processus plus rapide par rapport à la digestion des glucides pariétaux.

### **3.1.5. Facteurs de variation de la fermentation des glucides**

L'efficacité de la digestion des glucides pariétaux dépend de plusieurs facteurs. Les deux principaux sont le temps de séjour des aliments dans le réticulo-rumen et le pH ruminal. Le premier est lié à la structure physique des aliments. Un temps de séjour faible, en raison d'un broyage trop fin des fourrages, diminue la digestibilité des fibres puisque le microbiote ruminal n'a pas le temps nécessaire pour dégrader efficacement les glucides pariétaux [52]. D'autre part, Staples *et al.* (1984) ont montré qu'une baisse de pH ruminal de 0,6 à 0,7 unité en dessous du pH optimal (6,7 à 7,1) réduit la digestion de la cellulose de 20 à 55%. Le phénomène s'explique par la diminution de l'activité cellulolytique à pH bas au profit de l'activité amylolytique. Enfin, des variations de la fermentescibilité des glucides pariétaux sont associées à la teneur en lignine, c'est-à-dire de l'âge de la plante : la digestibilité des

glucides pariétaux décroît au fur et à mesure que la quantité en lignine (et donc l'âge du végétal) augmente [51].

Concernant l'amidon, la vitesse de dégradation ruminale varie selon l'origine végétale de l'amidon. Par exemple, la dégradabilité est très élevée (supérieure à 90%) pour l'avoine, l'orge et le blé, alors qu'elle est faible pour le maïs et le sorgho. Ainsi, la digestion ruminale de l'amidon issu de l'avoine ou de l'orge est plus rapide par rapport à celle de l'amidon issu d'autres céréales [109]. Le phénomène s'explique par la présence de protéines au niveau de l'enveloppe des grains d'amidon qui limitent de manière importante sa digestion [10]. Des traitements technologiques autorisent à modifier la digestibilité ruminale de l'amidon. A titre d'exemple, il est possible d'augmenter de manière significative la vitesse de digestion de l'amidon du maïs ou du sorgho grâce à des traitements hydrothermiques, à l'origine d'une rupture de l'enveloppe des grains d'amidon [9]. A l'inverse, un traitement par tannage des grains d'orge ou de blé permet d'accroître de 20 à 30% la protection de l'amidon : sa fermentescibilité est alors réduite [85]. Outre la matière première alimentaire, d'autres facteurs rentrent en compte dans la variation de la capacité ruminale à dégrader l'amidon. En 1986, Robinson *et al.* (1986) ont montré que le niveau d'ingestion joue un rôle sur la digestion des amidons lents, en raison de la réduction du temps de séjour ruminal des aliments. D'autre part, il apparaît que l'activité amylolytique du rumen varie en fonction du niveau d'apport d'amidon dans la ration. En effet, les études laissent apparaître un minimum de fermentescibilité pour une teneur de 40% d'amidon lent dans la ration. Au-delà de ce seuil de 40%, l'activité amylolytique microbienne semblerait devenir dominante et plus active [85].

### **3.2. Digestion des lipides**

La ration des Ruminants est en général pauvre en lipides. Les lipides présents dans les fourrages sont essentiellement des phospholipides et des galactolipides riches en c9,c12,c15-C18:3. Par contre, l'essentiel des lipides contenus dans les aliments concentrés sont des triacylglycérols riches en AGI à 18 carbones, en particulier le c9,c12-C18:2 ou l'acide oléique (c9-C18:1). Ces trois AG constituent les AGI majoritaires dans la ration des Bovins [40].

Dans le rumen, le métabolisme lipidique associe plusieurs mécanismes complexes. Il se divise en deux étapes : la lipolyse des esters d'AG, et la BH des AGI.

La composition des AG sortant du rumen influence la composition des denrées alimentaires d'origine animale, comme la viande et le lait.



### **3.2.1. Lipolyse des lipides alimentaires**

La lipolyse consiste en une hydrolyse extracellulaire des esters d'AG issus des aliments. Elle permet de former des AGL, du glycérol et des oses. Ces deux derniers produits sont rapidement fermentés en AGV, en particulier en C3 et en C4 [123].

L'hydrolyse des triglycérides est rapide et quasi-complète : le taux d'hydrolyse ruminale est supérieure à 85%. Elle est réalisée par une lipase bactérienne, produite en majeure partie par *A. lipolytica* [43].

Les phospholipides et les galactolipides sont hydrolés en AGL par des estérases, essentiellement synthétisées par des bactéries du genre *Butyrivibrio* [41]. Une activité lipolytique a été détectée chez les protozoaires ruminants par Harfoot et Hazlewood (1997), mais son importance est encore inconnue.

### **3.2.2. Biohydrogénation des acides gras insaturés**

La BH est une série de réactions visant à saturer les doubles liaisons des AGI. Elle est réalisée par plusieurs bactéries ruminales dans le but d'éviter les effets toxiques des AGI. Le plus souvent, la réaction chimique est incomplète, d'où l'accumulation d'intermédiaires insaturés dans le rumen. Elle se divise en deux étapes : tout d'abord, une isomérisation (très faible pour c9-C18:1) et par la suite, une ou plusieurs réductions pour arriver au même produit final, l'acide stéarique (C18:0).

Nous nous intéresserons à la BH du c9,c12-C18:2 et du c9,c12,c15-C18:3 car ils sont à l'origine de la majorité des isomères intermédiaires de la BH présents dans le rumen.

#### **3.2.2.1. Biohydrogénation de l'acide linoléique**

Il existe deux voies de BH : la voie t11 et la voie t10. Le choix d'une voie plutôt que l'autre est fonction du régime alimentaire. Dans les conditions physiologiques, la voie t11 est très majoritaire, avec un ratio t10/t11 bien inférieur à 1. Les isomères t11 montreraient un intérêt pour la santé du consommateur humain, en particulier dans la prévention de certains cancers [98]. A l'inverse, les isomères t10 auraient des effets néfastes puisqu'ils seraient à l'origine d'un syndrome métabolique chez l'Homme et provoquent une diminution significative du TB du lait des vaches, lorsque ces dernières sont nourries avec une ration riche en concentrés.

La première étape de la BH du c9,c12-C18:2 est une isomérisation caractérisée par la formation d'une double liaison trans en position 11. La réaction est réalisée par une  $\Delta 12$  isomérase et produit de l'acide ruménique (c9,t11-C18:2). Cet intermédiaire possède deux doubles liaisons conjuguées, une en position 9 et une en position 11. Il est l'isomère majoritaire des CLA produits.

La deuxième étape correspond à l'hydrogénation des doubles liaisons par des réductases microbiennes. Le c9,t11-C18:2 est alors transformé en acide vaccénique (t11-C18:1) suite à la réduction de la double liaison en position 9. Enfin, la dernière réaction produit du C18:0 à partir du t11-C18:1 [23].

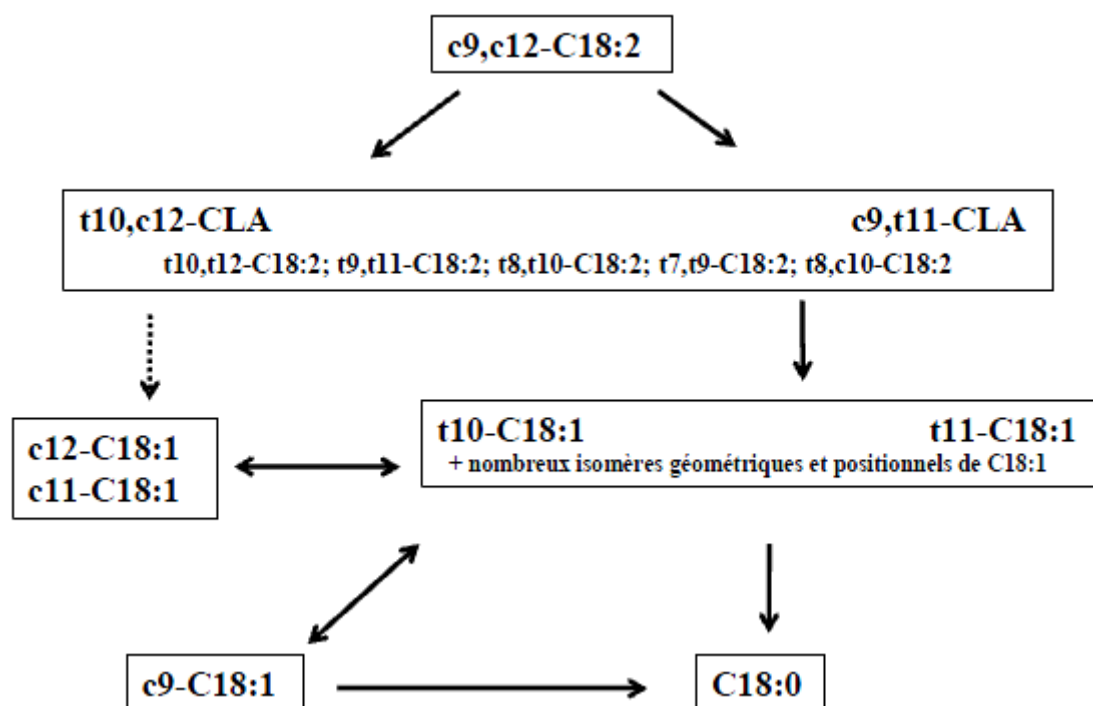
La voie t11 de la BH du c9,c12-C18:2 est généralement majoritaire. Cependant, dans certaines conditions d'alimentation, notamment une forte proportion d'amidon et de c9,c12-C18:2 dans la ration, elle peut être remplacée par la voie t10 [146].

La voie t10 se décompose en deux étapes à l'image de la voie t11. L'isomérisation du c9,c12-C18:2 est réalisée par une  $\Delta 9$  isomérase, dont l'action concerne la double liaison en position 9. Elle engendre la production de t10,c12-C18:2. Par la suite, l'hydrogénation du t10,c12-C18:2 donne du t10-C18:1, transformé à son tour en C18:0 [23].

Les deux voies de la BH du c9,c12-C18:2 sont illustrées dans la figure 19.

Les deux premières réactions, à savoir l'isomérisation et la première hydrogénation, sont rapides : les intermédiaires produits sont presque aussitôt consommés. A contrario, la dernière étape, l'hydrogénation en C18:0, est une réaction plus lente, en raison d'un nombre moindre de bactéries capables de la réaliser. De ce fait, les trans-C18:1, en particulier le t11-C18:1 ou le t10-C18:1, ont tendance à s'accumuler dans le contenu ruminal.

Figure 19 : Biohydrogénation de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2) et de l'acide oléique (c9-C18:1) [25]



### 3.2.2.2. Biohydrogénation de l'acide $\alpha$ -linoléique [23]

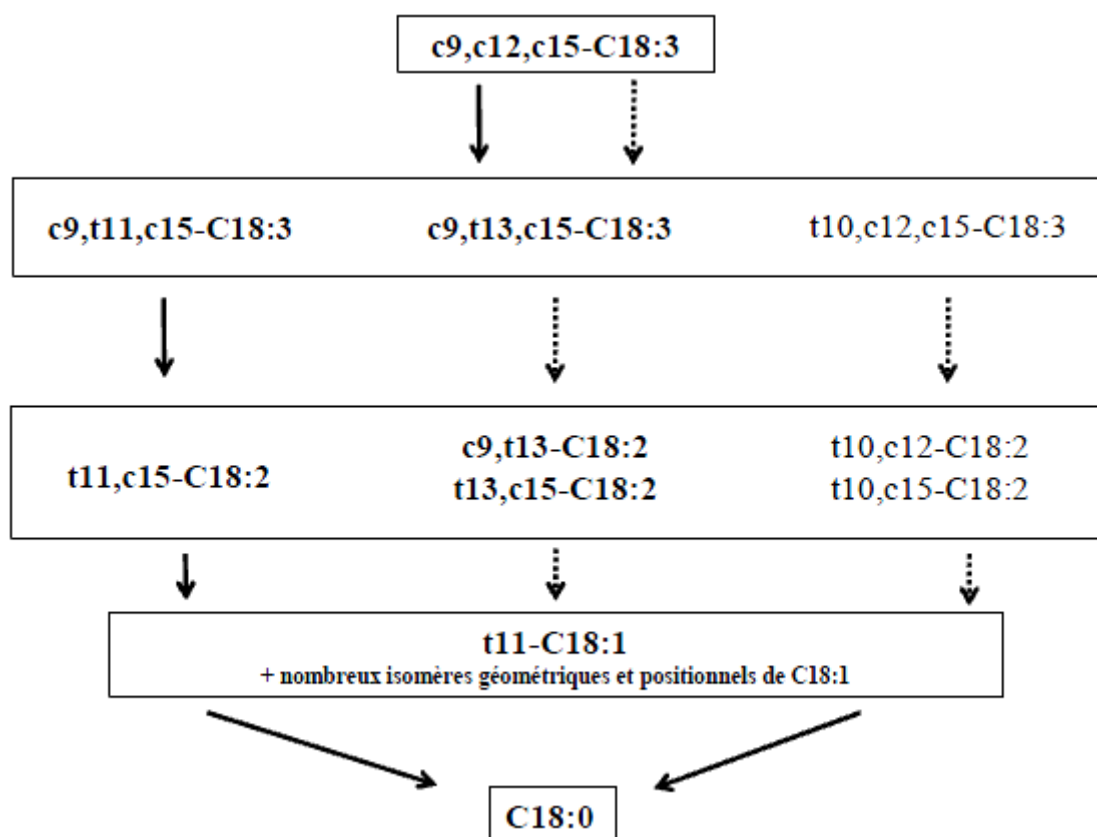
La BH du c9,c12,c15-C18:3 est comparable à la BH du c9,c12-C18:2 décrite ci-dessus. Le processus diffère par une réaction d'hydrogénation supplémentaire entre le produit de l'isomérisation et la formation de t11-C18:1 (Figure 20).

L'isomérisation du c9,c12,c15-C18:3 produit du c9,t11,c15-C18:3, un acide linoléique conjugué (CLnA). Les étapes suivantes correspondent à l'hydrogénation des doubles liaisons. Tout d'abord, le c9,t11,c15-C18:3 est transformé en t11,c15-C18:2. Ensuite, ce dernier est réduit en t11-C18:1. Enfin, la réaction finale est identique à la BH du c9,c12-C18:2 : le C18:0 est produit à partir du t11-C18:1.

A noter que l'hydrogénation du t11,c15-C18:2 est parfois couplée à une isomérisation produisant du t15-C18:1 et du c15-C18:1.

D'autres voies de la BH du c9,c12,c15-C18:3 ont été proposées par Destailats *et al* (2005) et Kramer *et al* (2004). Les premiers ont rapporté la formation de c9,t13,c15-C18:3, tandis que les seconds ont décrit la production de t10,c12,c15-C18:3 (Figure 20). Cependant, ces deux voies restent minoritaires.

Figure 20 : Biohydrogénation de l'acide  $\alpha$ -linoléique (c9,c12,c15-C18:3) [144]



### 3.2.3. Facteurs de variation du métabolisme lipidique dans le rumen

L'étape limitante du catabolisme ruminal des AGI est la BH, puisque la lipolyse est un processus quasi-complet quelles que soient l'alimentation et les conditions physico-chimiques du rumen. Une exception serait tout de même relevée avec la présence de trèfle violet dans la ration. En effet, Van Ranst *et al.* (2009) ont montré *in vitro* que la polyphénoloxydase, une enzyme contenue dans le trèfle violet, inhibe l'activité lipolytique des bactéries.

L'alimentation est le principal agent modulateur de l'efficacité de la BH, en particulier la proportion respective en fourrages et en concentré. En effet, l'augmentation du pourcentage de concentrés dans la ration diminue de manière significative la BH du c9,c12-C18:2 et du c9,c12,c15-C18:3. Par exemple, Doreau *et al.* (1997) ont constaté que pour des rations contenant plus de 70% de concentrés, la BH est comprise entre 50 et 80% pour le c9,c12,c15-C18:3 (au lieu de 93%) et entre 35 et 60% pour le c9,c12-C18:2 (au lieu de 85%). La principale hypothèse de la chute du pourcentage de BH est la baisse de pH associée à l'ingestion d'une ration riche en amidon. L'effet inhibiteur d'un faible pH ruminal a été démontré *in vitro* par Van Nevel et Demeyer (1996). L'inhibition du métabolisme ruminal des

lipides pour des valeurs de pH faibles (inférieures à 6) peut s'expliquer par le fait que les deux principales bactéries intervenant dans la digestion lipidique, *A. lipolytica* et *B. fibrisolvans*, sont sensibles à l'acidité : leur croissance est stoppée en dessous d'un pH de 5,3 et 5,5 respectivement.

Outre la proportion de fourrages et de concentrés dans la ration, une supplémentation lipidique dans l'alimentation est susceptible de moduler l'efficacité de la BH des AGI. En effet, une augmentation importante de la matière grasse (MG) diminue le pourcentage de BH. Il a été montré *in vitro* qu'un excès de c9,c12-C18:2 entraîne une inhibition de sa propre BH. Le phénomène se traduit par une accumulation des intermédiaires réactionnels et une saturation des réactions d'isomérisation et d'hydrogénation [126].

D'autre part, l'impact d'un apport lipidique dans la ration est nuancé par la forme de la matière grasse ajoutée. Par exemple, l'apport de lipides alimentaires sous forme de graines montre un effet moins prononcé sur la BH que l'ajout d'huile. Cette différence s'explique par la nécessité d'une digestion préalable des parois végétales par le microbiote ruminal pour libérer les AG contenus dans les graines. Ainsi, ces derniers sont accessibles pour les bactéries lipolytiques de manière progressive, d'où une diminution du risque de saturation des réactions de BH et de l'accumulation des intermédiaires [13].

#### **3.2.4. Facteurs de variation de la proportion en isomères trans 11 et trans 10**

La déviation de la voie t11 vers la voie t10 est observée lors de perturbation de la communauté bactérienne du rumen [145]. A titre d'exemple, des souches de *M. elsdenii* [59] et de *P. acnes* [74] sont susceptibles de produire du t10,c12-C18:2, un CLA précurseur du t10-C18:1, tandis que la principale bactérie utilisant la voie t11 est *B. fibrisolvans*.

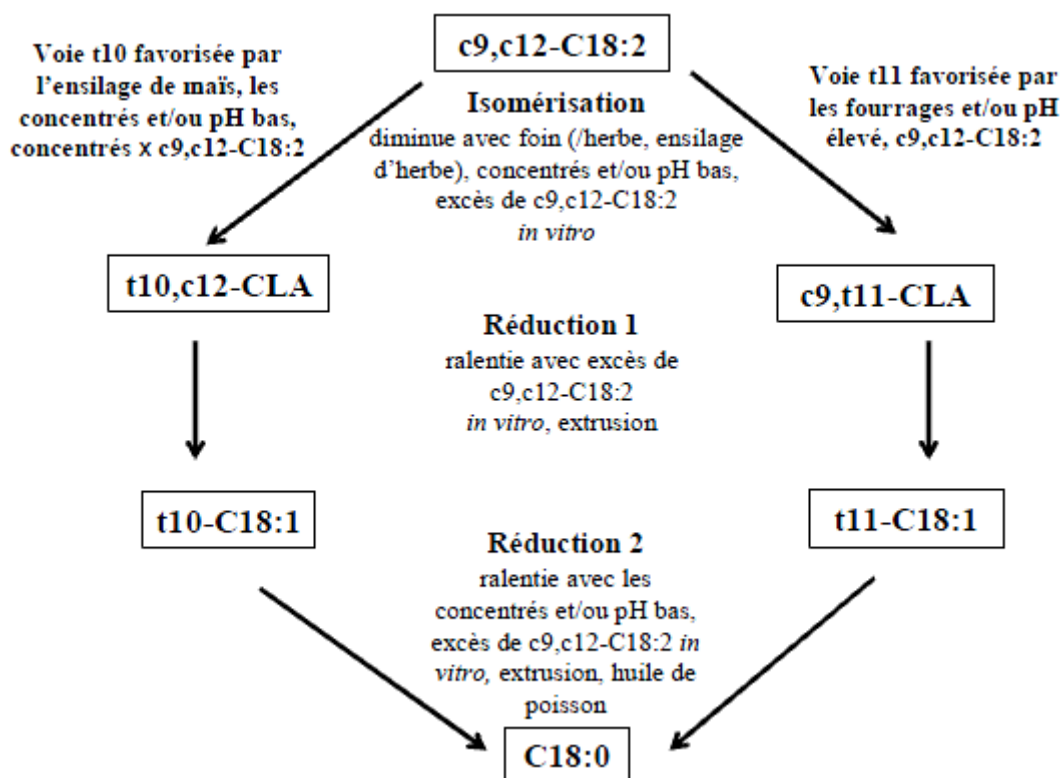
Les conditions physico-chimiques ruminales influencent également les voies réactionnelles de la BH. Par exemple, un faible pH ruminal entraîne une augmentation du ratio t10/t11. Le phénomène s'explique par une production importante de t10-C18:1 et dans une moindre mesure de t10,c12-C18:2, associée à une diminution du taux d'isomérisation de c9,c12-C18:2 en c9,t11-C18:2. De plus, un pH bas diminue l'hydrogénation finale des trans-C18:1 en C18:0, d'où l'accumulation des intermédiaires trans. Ainsi, lors de pH bas, par exemple lors d'apport important d'amidon dans la ration, la voie t10 est privilégiée au détriment de la voie t11 [126].

Zened *et al.* (2011b) ont constaté que l'association d'un apport notable d'amidon et d'une quantité significative de c9,c12-C18:2 entraîne une déviation majeure de la BH du c9,c12-C18:2 de la voie t11 à la voie t10, en raison d'une modification de la communauté bactérienne. Cependant, le phénomène n'est pas retrouvé lorsque seul un des deux éléments est augmenté dans la ration.

Ainsi, la voie t10 de la BH du c9,c12-C18:2 est privilégiée par l'apport important de concentrés dans la ration et un pH ruminal bas, alors que la voie t11 est favorisée pour des rations riches en fourrages et un pH ruminal haut. D'autre part, les différentes réactions de la BH sont modulées de manière individuelle. L'isomérisation et l'hydrogénation finale sont ralenties par une quantité notable de concentrés, un pH ruminal bas et un excès de c9,c12-C18:2 dans la ration. Un excès de c9,c12-C18:2 montre également une effet négatif sur la transformation des CLA en trans-C18:1.

L'ensemble des facteurs modulant la BH du c9,c12-C18:2 est présenté dans la figure 21.

Figure 21 : Principaux facteurs alimentaires et leurs effets sur la biohydrogénation de l'acide linoléique (c9,c12-C18:2) [126]



La BH est une réaction d'hydrogénation des AGPI réalisée par les bactéries ruminales. Elle se déroule en plusieurs étapes, et donne lieu à la production d'intermédiaires (CLA, CLnA, t-C18:1) qui peuvent être retrouvés dans les produits issus des Ruminants : le lait et la viande. Des intermédiaires, en particulier les isomères t11, seraient intéressants pour le consommateur dans la prévention de certains cancers. Au contraire, d'autres auraient des effets néfastes, comme les isomères t10 qui entraîneraient un diabète lipoatrogène et qui sont à l'origine d'une diminution importante du TB chez la vache.

Deux voies de la BH du c9,c12-C18:2 sont connues : la voie t11 réalisée par des bactéries fibrolytiques, majoritairement *Butyrivibrio fibrisolvens*, et la voie t10 qui est effectuée par des bactéries impliquées dans le métabolisme du lactate, *Megasphaera elsdenii* et *Propionibacterium acnes*.

Dans les conditions physiologiques normales, la voie t11 est fortement majoritaire. Cependant, lors de situations d'alimentation particulières (ration à base d'ensilage de maïs, riche en concentrés et/ou supplémentée en c9,c12-C18:2), une déviation de la voie t11 vers la voie t10 est observée : la dernière devient majoritaire.

De nombreuses études ont abordé les effets du régime alimentaire sur la BH du c9,c12-C18:2 et sur sa déviation de la voie t11 à la voie t10. Cependant, peu ont été menées sur les populations microbiennes associées à ces phénomènes. D'autre part, l'étude de la BH peut être difficile par la diversité des voies possibles et la cascade des réactions qui la composent. Dans un contexte de maîtrise de la BH ruminale des AG, il serait alors intéressant d'individualiser certaines réactions afin de les étudier chacune séparément.

Ainsi, ce travail propose de mettre au point des milieux de cultures dans le but d'étudier de manière singulière les populations microbiennes à l'origine de la voie t11, de la voie t10 et de l'isomérisation finale en C18:0.





# **DEUXIEME PARTIE**

# **EXPERIMENTATION**



## **1. Matériels & Méthodes**

Les AG trans présents dans les produits issus des Ruminants auraient un impact sur la santé du consommateur. Cependant, leurs effets diffèreraient selon les isomères : les isomères t11 montreraient des effets bénéfiques, en particulier des propriétés anticarcinogènes, tandis que les isomères t10 seraient à l'origine de troubles métaboliques chez l'Homme et entraîne une diminution importante du TB dans le lait des vaches laitières. Dans des conditions physiologiques normales, la voie de la BH ruminale majoritaire est la voie t11. Cependant, une déviation de la voie t11 vers la voie t10 peut être observée lorsque la ration distribuée aux vaches est riche en concentrés et/ou supplémentée en MG. L'objectif de notre étude est de caractériser les populations microbiennes à l'origine des deux voies de la BH ruminale, ainsi que de la réaction finale de la BH, et d'enrichir les connaissances sur les circonstances amenant à l'usage d'une voie plutôt que l'autre.

D'après plusieurs études, le régime alimentaire de la vache module la BH ruminale, tant d'un point de vue quantitatif [22] que d'un point de vue qualitatif lié à la déviation de la voie t11 vers la voie t10 [126]. Afin d'étudier la communauté bactérienne réalisant les différentes réactions de la BH ruminale, un fluide ruminal a été cultivé dans 4 milieux différents : deux milieux riches en fibres (milieux FF) dont un supplémenté en c9,c12-C18:2, et deux milieux riches en amidon (milieux AA), dont un supplémenté en c9,c12-C18:2. Tout au long des cultures, des prélèvements ont été réalisés en vue d'identifier les effets des différents substrats sur les populations bactériennes ainsi que sur la BH du c9,c12-C18:2. Suite aux résultats des études précédentes, il est probable que les bactéries réalisant la voie t11 soient avantagées pour des régimes riches en fibres, à l'instar des milieux FF. A contrario, la croissance des populations bactériennes à l'origine de la voie t10 serait favorisée lors d'apport important en amidon, à l'image des milieux AA.

Le protocole a été réalisé sur deux semaines consécutives, avec des inocula différents pour chaque semaine.

## **1.1. Conditions de cultures**

### **1.1.1. Inoculum**

Pour l'étude, l'inoculum est constitué par la phase liquide du contenu ruminal issu deux vaches taries de race Prim'Holstein munies d'une canule ruminale. Le prélèvement a eu lieu avant le repas du matin, à l'aide d'un pot. Les phases liquides des deux contenus ruminiaux sont ensuite filtrées sur un tamis en métal de 1,6 mm, avant d'être mélangées à raison de 1 litre de chaque vache. Le contenu ruminal est rapidement acheminé à l'ENVT, tout en respectant les conditions de température (39°C) et d'anaérobiose. Les prélèvements sont effectués le premier jour de chacune des deux semaines.

La ration des deux vaches prélevées est constituée de foin grossier à volonté et de 2kg d'un concentré du commerce, PASSIO VL 3L, dont la composition est décrite dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Composition du concentré PASSIO VL 3L

Tourteau de soja	30%
Céréales	42%

Tableau 5 : Composition chimique du concentré PASSIO VL 3L

MS (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

### **1.1.2. Solutions tampons**

Deux solutions tampon ont été utilisées durant l'expérimentation. La première est un tampon riche en  $\text{HCO}_3^-$  à pH = 7, la seconde un tampon riche en phosphates à pH = 5,5. Les solutions sont préparées au maximum 24 heures avant utilisation et conservées au réfrigérateur. Avant mélange avec l'inoculum et les milieux de culture, les tampons sont chauffés à 39°C et saturés avec du  $\text{CO}_2$  afin d'assurer le pouvoir tampon  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ . Les compositions respectives des solutions tampons sont détaillées dans le tableau 6.

**Tableau 6** : Composition des tampons (g/L)

	Tampon bicarbonate à pH =7	Tampon phosphate à pH = 5,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	8,72
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	23,89	0,93
NaHCO <sub>3</sub>	9,24	2,31
NaCl	0,705	0,705
KCl	0,675	0,675
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,108	0,108
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,180	0,180

### 1.1.3. Substrats

Quatre substrats différents ont été utilisés dans cette étude. Les compositions sont décrites dans le tableau 7. Les deux substrats à base de fibres (substrats F et FLA), appelés milieux FF, ont pour objectif de sélectionner la voie t11 de la BH ruminale. A contrario, les deux substrats à base d'amidon (substrat A et ALA), nommés milieux AA, permettent la sélection d'une micropopulation utilisant la voie t10. Les substrats FLA et ALA ont la particularité de contenir du c9,c12-C18:2 pur du commerce (pureté 99%, Sigma, FRANCE). Les quantités exactes de c9,c12-C18:2 introduites dans chaque milieu sont reportées en annexe 1.

**Tableau 7** : Composition des substrats de culture

	Milieux FF		Milieux AA	
	Substrat F	Substrat FLA	Substrat A	Substrat ALA
Son de blé (g)	1,25	1,25	1,25	1,25
Foin grossier (g)	1	1		
Foin de Crau (g)			0,4	0,4
Amidon de blé (g)*			0,7	0,7
Caséine (g)**	0,15	0,15	0,15	0,15
Acide linoléique pur (g)***		0,1		0,1
Tampon bicarbonate à pH = 7 (mL)	80	80		
Tampon phosphate à pH = 5,5 (mL)			80	80

#### Origine des substrats purs

\* *Sigma-Aldrich, France*

\*\* *Sigma-Aldrich, France*

\*\*\* *Pureté 99%, Sigma, FRANCE*

Le son de blé, le foin grossier et le foin de Crau ont préalablement été broyés à l'aide d'un broyeur Retsch® (Broyeur ultra-centrifuge ZM 200, Retsch, France), à la vitesse de 8000 tours/minute, et à la grille de 0,5 mm pour le son de blé et de 1 mm pour les foins.

Pour chaque matière première, les teneurs en NDF, amidon et PB ont été déterminées par les méthodes officielles, ce qui a permis de déterminer la composition de chaque milieu (Tableau 8).

**Tableau 8** : Composition chimique des substrats de culture

	Substrat F	Substrat FLA	Substrat A	Substrat ALA
NDF (% MB)	47	45	30	29
Amidon (% MB)	6	6	34	32
PB (% MB)	16	16	15	14
Acide linoléique pur ajouté (g)	0	0,1	0	0,1

#### **1.1.4. Déroulement des cultures**

A l'arrivée à l'ENVT, un échantillon de 100 mL d'inoculum est prélevé. Son pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre (pH330®, WTW, Allemagne). L'échantillon est conservé au congélateur à - 20°C.

D'autre part, 80 mL d'inoculum est mélangé avec 80 mL de tampon bicarbonate à pH = 7. Le pH du mélange est noté. La même opération est réalisée avec du tampon phosphate à pH = 5,5.

Par la suite, un volume de 80 mL d'inoculum est mélangé à 80 mL de tampon dans des erlenmeyers de 250 mL contenant le substrat (tel indiqué dans le tableau 7). A raison de trois répétitions pour chaque substrat, 12 cultures sont mises à incuber pour chaque semaine.

Les récipients sont ensuite placés dans un bain marie rotatif (Incubateur Aquaron® AI 15, Infors HT, Allemagne) à 130 tours/minutes et dans l'obscurité. Le respect des conditions d'anaérobiose est permis grâce à une saturation en CO<sub>2</sub> des milieux de culture, avant d'être fermés hermétiquement. Une tubulure connecte les erlenmeyers à l'eau du bain marie afin d'autoriser l'évacuation des gaz fermentaires produits sans pour autant permettre l'entrée de gaz extérieur.

Durant les 5 jours de culture, les milieux de cultures sont renouvelés à 50% deux fois par jour, le matin à 9 heures et le soir à 19 heures. Ainsi, après retrait d'un échantillon homogène de 80

mL sous agitation magnétique, chaque culture est alimentée par 80 mL de tampon dans lequel est dilué le substrat correspondant. Les erlenmeyers sont ensuite replacés dans les conditions de culture décrites ci-dessus.

Les échantillons prélevés (12 au total) sont placés dans un bain de glace afin de stopper les activités microbiennes. Pour chacun d'eux, différentes opérations sont effectuées :

- la mesure du pH à l'aide d'un pH mètre
- le prélèvement de deux échantillons de 5 mL destinés au dosage des AGV, mélangés à 0,2 mL d'acide sulfurique à 25% pour stopper les fermentations
- le prélèvement de deux échantillons de 2 mL destinés à l'analyse du microbiote

Les prélèvements pour les AGV sont conservés jusqu'à analyse au congélateur – 20°C et pour le microbiote à – 80°C. Pour chaque prélèvement, un seul échantillon est analysé, le deuxième est conservé en cas de problème à la première analyse.

Cette procédure est réalisée deux fois par jour, de J1 au soir à J4 au soir. A J5, le pH de chaque culture est mesuré à l'aide d'un pH mètre, après avoir effectué les prélèvements nécessaires pour les différentes mesures (activités microbiennes et enzymatiques) et analyses (AGV et microbiote).

## **1.2. Mesure des activités microbiennes**

### Mesure des activités microbiennes à J1

Dans 3 tubes de culture cellulaire en Pyrex de 18 mL, un volume de 2 mL d'inoculum est mélangé à 2 mL de tampon bicarbonate à pH = 7 et à 2 mg de c9,c12-C18:2 pur, puis rempli de CO<sub>2</sub>. Les mélanges sont mis à incuber pendant 3 heures dans un bain marie à 39°, sous agitation magnétique et en condition d'anaérobiose. Après incubation, les tubes sont conservés au congélateur à - 20°C jusqu'à analyse.

Deux tubes non incubés sont également réalisés afin d'estimer l'état initial avant incubation. Un seul mélange sera analysé, le deuxième servira en cas de problème de quantification.

Le même protocole est suivi en remplaçant le tampon bicarbonate à pH = 7 par le tampon phosphate à pH = 5,5.

## Mesure des activités microbiennes à J5

Pour chaque culture incubée, est réalisé le mélange suivant dans deux tubes en Pyrex de 18 mL : 2 mL de culture, 2 mL de solution tampon identique à celle utilisée durant les 5 jours de culture, et 2 mg de c9,c12-C18:2 pur. Les 24 tubes obtenus (12 cultures x 2 tubes pour chacune) sont mis à incuber pendant 3 heures dans un bain marie à 39°, sous agitation magnétique et en condition d'anaérobiose. Après incubation, les tubes sont conservés au congélateur à - 20°C jusqu'à analyse.

Deux tubes non incubés par culture sont également réalisés afin d'estimer l'état initial avant incubation. Un seul mélange sera analysé, le deuxième servira en cas de problème de quantification.

Les activités microbiennes seront par la suite évaluées par le dosage des AG présents dans chaque tube par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

### **1.3. Mesure des activités enzymatiques**

Comme le pH optimal des  $\Delta 9$  et  $\Delta 12$  isomérases est compris entre 7,2 et 7,5 [19], nous utiliserons uniquement le tampon bicarbonate à pH 7 pour cette mesure.

## Mesure des activités enzymatiques à J1

Dans un erlenmeyer, 50 mL d'inoculum sont mélangés avec 50 mg de chloramphénicol et mis sous agitation pendant 5 minutes. Ensuite, le mélange est incubé pendant 5 heures à l'étuve à 39°C et en anaérobiose. Le chloramphénicol a pour action d'inhiber la traduction de l'ADN en ARNm, et de ce fait, de stopper toute production d'enzymes. Par la suite, 2 mL d'inoculum inactivé, 2 mL de tampon bicarbonate à pH = 7 et 2 mg de c9,c12-C18:2 pur sont introduits dans trois tubes en Pyrex de 18 mL. Les mélanges sont mis à incuber pendant une heure, dans un bain marie à 39°C et en condition d'anaérobiose. Après incubation, les tubes sont conservés au congélateur à - 20°C jusqu'à analyse.

Deux tubes non incubés sont également réalisés afin d'estimer l'état initial avant incubation. Un seul mélange sera analysé, le deuxième servira en cas de problème de quantification.



## Mesure des activités enzymatiques à J5

Le protocole de mesure des activités enzymatiques à J5 est identique à celui suivi à J1. Il est réalisé pour chacune des 12 cultures.

Les activités enzymatiques seront par la suite évaluées par le dosage des AG présents dans chaque tube par CPG.

Les mêmes cultures, mesures et prélèvements ont été réalisés lors de la deuxième semaine d'expérimentation.

### **1.4. Analyses**

#### **1.4.1. Dosage des acides gras**

Les AG sont dosés sur les échantillons issus des mesures d'activités microbiennes et enzymatiques, après lyophilisation. L'analyse qualitative et quantitative des AG présents dans chaque échantillon permet de renseigner sur l'efficacité de la BH et sur les voies de la BH empruntées, à savoir la voie t11 ou la voie t10.

Le dosage des AG se divise en deux étapes : l'extraction-méthylation des AG, suivie du dosage à proprement parler par CPG.

La méthode d'extraction – méthylation de Jenkins (2010) a été choisie pour cette étude. L'étalon interne utilisé est le C19:0 à 4 mg/mL, dilué dans du dichlorométhane.

L'ensemble des réactifs, des solvants et de l'appareillage utilisé pour doser les AG est décrit dans les annexes 2 et 3.

L'extraction-méthylation des AG comporte deux étapes : la dérivation des acylglycérols en milieu basique, et la dérivation des AG et des phospholipides en milieu acide. Le protocole est détaillé dans la figure 22.

Figure 22 : Protocole détaillé de l'extraction-méthylation des acides gras [49]

Dans un tube en verre Pyrex contenant l'échantillon

- Déposer 200  $\mu$ L de dichlorométhane
- Ajouter 200  $\mu$ L d'étalon interne

Dérivation en milieu basique

- Ajouter 2 mL de soude méthanolique à 0,5 mol/L à l'aide d'une pipette à répétition HandyStep®, préparée extemporanément (1 g d'hydroxyde de sodium dans 50 mL de méthanol)
- Boucher fermement le tube
- Agiter à l'aide d'un vortex à 1 000 tours par minute, pendant 1 minute
- Placer le tube dans un bain thermostaté à 50°C pendant 10 minutes
- Refroidir le tube dans un bain refroidi pendant 7 minutes

Dérivation en milieu acide

- Ajouter 3 mL d'une solution méthanolique d'acétylchlorure à 10%, préparée extemporanément (6 mL d'acétylchlorure dans 60 mL de méthanol anhydre)
- Agiter à l'aide du vortex à 1 000 tours par minute pendant 1 minute
- Placer le tube dans un bain thermostaté à 80°C pendant 10 minutes
- Refroidir le tube dans un bain refroidi pendant 7 minutes
- Ajouter 1,6 mL d'hexane à l'aide d'une pipette à répétition HandyStep®
- Ajouter 5 mL d'une solution de  $K_2CO_3$  à 6% à l'aide d'une pipette à répétition HandyStep®, préparée extemporanément (6 g de  $K_2CO_3$  dans 100 mL d'eau ultra pure)
- Agiter le tube à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 5 minutes
- Centrifuger à 4 000 tours par minute pendant 10 minutes
- Prélever une partie de la phase supérieure dans un flacon ambrée

Après extraction et méthylation, les AG sont dosés par un chromatographe à phase gazeuse équipée d'un auto-injecteur, d'une colonne capillaire en silice de 100 m et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Deux méthodes chromatographiques sont utilisées afin d'isoler au maximum tous les isomères. Elles sont présentées dans la figure 23. La température du

FID est fixée à 260°C. Les débits de H<sub>2</sub> et d'air sont respectivement de 35 mL par minute et de 400 mL par minute.

Par la suite, les chromatogrammes obtenus sont analysés à l'aide du logiciel PeakSimple® (version 2.83). Pour chaque échantillon, les différents AG sont identifiés grâce à des standards du commerce (Sigma, France) ou par ordre d'élution en absence de standard. Enfin, les quantités en AG sont calculées grâce à des courbes étalons établies avec des standards du commerce. Les données prises en compte sont exprimées en mg d'AG dans l'échantillon, et en pourcentage d'AG par rapport aux AG totaux.

Figure 23 : Méthodes chromatographiques pour le dosage des acides gras

### Méthode 2

#### Conditions de passage

- Volume injecté : 1 µL
- Température de l'injecteur : 255°C
- Pression : 118 kPa (à 60°C)
- Split ratio : 50
- Gaz vecteur : H<sub>2</sub> à débit constant (1 mL par minute)
- Température du détecteur : 260°C

#### Programme de température

Température initiale (°C)	Durée (minutes)	Gradient (°C par minute)	Température finale (°C)
60	2	8	150
150	12	2	175
175	20	5	225
225	10	5	240
240	10	0	240

### Méthode 9

#### Conditions de passage

- Volume injecté : 1 µL
- Température de l'injecteur : 255°C
- Pression : 150 kPa
- Split ratio : 50
- Gaz vecteur : H<sub>2</sub> à pression constante

#### Programme de température

Température initiale (°C)	Durée (minutes)	Gradient (°C par minute)	Température finale (°C)
60	3	8	190
190	13	5	225
225	10	10	230
230	1	0	230

### **1.4.2. Dosage des acides gras volatils**

L'objectif du dosage des AGV est d'évaluer les fermentations dans les différents milieux de culture, de manière qualitative (% de chaque AGV, ratio C2/C3) et quantitative (AGV totaux).

Le mode opératoire de la préparation des échantillons est détaillé dans la figure 24. Tous les volumes ont été prélevés à l'aide d'une micropipette, toujours la même pour chaque réactif.

Le dosage des AGV est effectué par CPG, munie d'un FID. L'étalon interne utilisé est l'acide 4-méthylvalérique à 0,2%. La méthode CPG est détaillée dans la figure 25.

Figure 24 : Préparation des échantillons en vue du passage en CPG pour le dosage des acides gras volatils

### **Préparation de l'étalon interne**

#### **Dans un microtube à centrifuger**

- Déposer 1 mL d'étalon interne
- Ajouter 200  $\mu$ L d'acide métaphosphorique 25%
- Agiter vigoureusement

#### **Dans un flacon d'injection CPG**

- Déposer 75  $\mu$ L d'étalon interne
- Ajouter 100  $\mu$ L du mélange préalablement préparé
- Ajouter 900  $\mu$ L d'eau distillée

### **Préparation de l'échantillon**

#### **Tube destiné au dosage des AGV**

- Décongeler à température ambiante
- Agiter vigoureusement
- Centrifuger à 4 000 tours par minute, à 4°C, pendant 20 minutes

#### **Dans un microtube à centrifuger**

- Déposer 1 mL de surnageant du tube centrifugé
- Ajouter 200  $\mu$ L d'acide métaphosphorique 25%
- Agiter vigoureusement
- Centrifuger à 14 770 tours par minute, à 4°C, pendant 15 minutes

#### **Dans un flacon d'injection CPG**

- Déposer 75  $\mu$ L d'étalon interne
- Ajouter 100  $\mu$ L de surnageant du microtube centrifugé
- Ajouter 900  $\mu$ L d'eau distillée

Figure 25 : Méthode chromatographique pour le dosage des acides gras volatils

### **Méthode 8**

#### Conditions de passage

- Volume injecté : 1  $\mu$ L
- Température de l'injecteur : 250°C
- Splitless
- Gaz vecteur : H<sub>2</sub> à débit constant (4 mL par minute)
- Température de l'injecteur : 250°C

#### Programme de température

Température initiale (°C)	Durée (minutes)	Gradient (°C par minute)	Température finale (°C)
100	0	6	148
148	0	20	188
188	5	50	225
225	11	0	225

### **1.4.3. Analyse du microbiote**

L'analyse du microbiote est réalisée sur l'inoculum initial et sur chacune des 12 cultures, toutes les 12 heures, de J1 au soir à J5 au matin.

L'analyse de la communauté bactérienne s'est déroulée en plusieurs étapes.

Tout d'abord, l'extraction de l'ADN total a été réalisée à l'aide du kit ZR Soil Microbe DNA MicroPrep® après une lyse mécanique par la technique de bead beating. Par la suite, l'ADN est isolé par passage dans une colonne *Fast-Spin* puis filtré pour enlever les acides et polyphénols susceptibles d'inhiber la PCR.

La deuxième étape est un dosage de l'ADN total à l'aide d'un NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific), un spectrophotomètre à micro-volume. Les spectres d'absorption des acides nucléiques présentent une bande d'absorption maximale autour de 260 nm. La quantification de l'ADN est effectuée grâce à l'absorbance des rayons ultraviolets à 260 nm.

Par la suite, une PCR a été réalisée en ciblant les régions V3 et V4 de l'ADNr 16S. L'ADNr 16S est le marqueur génétique le plus utilisé pour identifier les bactéries, car il se compose à la fois de régions très bien conservées et de régions hypervariables. Les régions conservées peuvent servir de sites de liaison d'amorces pour l'amplification du gène entier ou de fragments du gène. A contrario, les régions hypervariables contiennent des séquences spécifiques à l'espèce, à l'image des régions V3 et V4. Cependant, la banque de données des séquences d'ADNr 16S est incomplète puisque ne sont identifiées que des espèces bactériennes cultivables [141].

Ensuite, les fragments d'ADN ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et détectés grâce à un marqueur fluorescent. L'électrophorèse a fourni un chromatogramme contenant un signal de l'échantillon et le signal du standard interne, ce qui nous permettait de contrôler le bon déroulement des étapes précédentes (apparition de la bande) et d'envoyer l'échantillon au séquençage.

Après extraction de l'ADN, les échantillons ont été séquencés par pyroséquençage 454 à la plateforme génomique « Génotoul » de l'INRA de Toulouse.

### 1.5. Calculs réalisés

- pH

En absence d'effet significatif de l'ajout de c9,c12-C18:2 et de différence significative entre les deux semaines, chaque valeur de pH correspond à la moyenne des douze valeurs mesurées dans tous les milieux d'un même type (FF ou AA), le même jour à la même heure, lors des deux semaines.

#### Pour les milieux FF

$$pH_{JX} = \frac{\sum_{\text{Semaine 1}} pH_{JX \text{ Semaine 1}} \text{ des milieux F} + \sum_{\text{Semaine 1}} pH_{JX \text{ Semaine 1}} \text{ des milieux FLA} + \sum_{\text{Semaine 2}} pH_{JX \text{ Semaine 2}} \text{ des milieux F} + \sum_{\text{Semaine 2}} pH_{JX \text{ Semaine 2}} \text{ des milieux FLA}}{12}$$



## Pour les milieux AA

$$pH_{JX} = \frac{\sum pH_{JX \text{ Semaine 1}} \text{ des milieux A} + \sum pH_{JX \text{ Semaine 1}} \text{ des milieux ALA} + \sum pH_{JX \text{ Semaine 2}} \text{ des milieux A} + \sum pH_{JX \text{ Semaine 2}} \text{ des milieux ALA}}{12}$$

- AGV

Les calculs réalisés pour les quantités d'AGV totaux, les quantités de C2, C3 et C4 et le rapport C2/C3 sont similaires aux calculs effectués pour le pH : chaque valeur correspond à la moyenne des mesures récoltées dans tous les milieux d'un même type (FF ou AA), le même jour à la même heure, lors des deux semaines.

Les AGV totaux regroupent le C2, le C3, l'acide isobutyrique, le C4, l'acide isovalérique et l'acide valérique.

- Activités microbiennes

Le pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2 a été calculé de la manière suivante :

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

Plusieurs isomères ont été regroupés en deux groupes : les isomères t10 et les isomères t11 (Figure 26).

Figure 26 : Détails des calculs pour les valeurs des isomères trans 10 et trans 11

$\begin{aligned} \text{Isomères trans 10} &= t10,c12-C18:2 + t10-C18:1 \\ \text{Isomères trans 11} &= c9,t11-C18:2 + t9,t11-C18:2 + t11-C18:1 \end{aligned}$
--

Chaque valeur des paramètres correspond à la moyenne des valeurs mesurées dans chacun des milieux (F, A, FLA ou ALA), le même jour à la même heure, lors des deux semaines.

A titre d'exemple, pour les milieux F :

$$\text{Variable}_{JX} = \frac{\sum \text{Variable}_{JX \text{ Semaine 1}} \text{ des milieux F} + \sum \text{Variable}_{JX \text{ Semaine 2}} \text{ des milieux F}}{6}$$

- Microbiote

L'abondance relative de chaque phyla dans les deux types de milieux (FF et AA) a été obtenue en calculant la moyenne des abondances mesurées à J5 dans chaque type de milieux des deux semaines d'expérimentation.

Le même principe a été appliqué pour les calculs de l'abondance relative de chaque genre bactérien, pour chaque prélèvement des deux semaines réalisé le même jour à la même heure.

### **1.6. Analyse statistique**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le modèle linéaire multivariable de SYSTAT® (Version 9, SPSS Inc., 1998, Chicago) selon le modèle présenté dans la figure 27. L'analyse de mesures répétées a été utilisée afin de mettre en évidence une différence significative de la variable (pH, AGV, paramètres de BH, microbiote) au cours des cultures selon les différentes variables des milieux (substrat riche en fibres ou en amidon, ajout ou non de c9,c12-C18:2).

Les différences ont été considérées significatives pour  $p < 0,01$ .

Figure 27 : Modèle statistique

$\begin{aligned} \text{Variable} = & \text{Moyenne} + \text{Effet « Semaine »} \\ & + \text{Effet « Substrat »} \\ & + \text{Effet « AG »} \\ & + \text{Effet « Substrat x AG »} \end{aligned}$
---

*Effet « Substrat » : Types de milieux (FF ou AA)*

*Effet « AG » : Ajout ou non de c9,c12-C18:2*

Afin d'évaluer la dépendance entre plusieurs variables en même temps, une matrice de corrélation a été utilisée, contenant les coefficients de corrélation (r) entre chaque variable et les autres, selon le test de corrélation de Pearson.

Une corrélation était considérée positive pour un coefficient de corrélation supérieur à 0,6 et négative pour un coefficient de corrélation inférieur à - 0,6.

## 2. Résultats et discussion

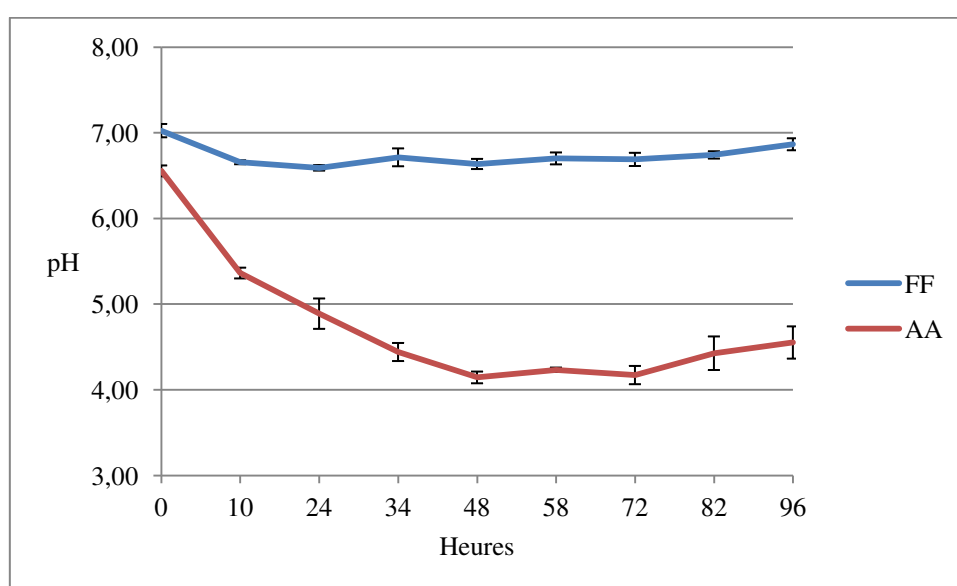
### 2.1. Evolution et comparaison du pH sur 5 jours de culture

D'un point de vue statistique, le type de milieu (FF et AA) a un effet significatif sur le pH ( $p < 0,001$ ). Par contre, concernant l'ajout de c9,c12-C18:2 dans le milieu de culture, aucun effet significatif sur le pH n'est relevé ( $p = 0,92962$ ). De ce fait, l'évolution du pH au cours des 5 jours de culture sera comparée uniquement entre les deux types de milieux, sans tenir compte de l'ajout de c9,c12-C18:2.

Les résultats statistiques réalisés sur le pH sont présentés en annexe 4.

La figure 28 montre l'évolution du pH au cours des 5 jours de culture dans chaque type de milieu (FF et AA).

Figure 28 : Evolution du pH au cours des 5 jours de culture dans les milieux FF et AA



Le type de milieu (FF ou AA) influence fortement le pH du milieu.

Le pH est relativement stable dans les milieux FF : il est toujours compris entre 6,5 et 7. Cette stabilité est due à l'efficacité du tampon bicarbonate  $\text{pH} = 7$  et à la sélection des populations bactériennes fibrolytiques. En effet, les milieux FF sont riches en fibres (son de blé et foin grossier). La dégradation des glucides pariétaux de ces substrats est plus lente, et ainsi, la production d'AGV étalée dans le temps. De ce fait, l'accumulation d'AGV n'a pas été importante entre deux renouvellements de milieux.

Par contre, les milieux de type AA montrent une nette diminution du pH, exponentielle les deux premiers jours de culture avant de se stabiliser entre 4 et 4,5. La première hypothèse est

l'inefficacité du tampon phosphate pH = 5,5. D'autre part, l'apport important d'amidon dans les milieux A et ALA (respectivement 34% et 32% de la MB) a privilégié la population bactérienne amylolytique. L'amidon, glucide rapidement fermentescible, a subi une digestion bactérienne rapide. L'éventuelle accumulation importante d'AGV consécutive a entraîné une baisse du pH du milieu, probablement renforcée par la suite par la production de lactate.

Ainsi, les variations du pH sont potentiellement liées aux fluctuations de la concentration en AGV dans les milieux. Cependant, d'autres éléments peuvent entraîner une diminution nette du pH, à titre d'exemple la synthèse d'acide lactique. L'étude de la production d'AGV permettra de conclure quant à l'origine de la baisse du pH observée dans les milieux AA.

## **2.2. Evolution et comparaison de la production d'acides gras volatils sur 5 jours de culture**

D'un point de vue statistique, le type de milieu (FF et AA) a un effet significatif sur la production d'AGV ( $p < 0,001$ ), à l'exception du C4 ( $p = 0,12769$ ). A contrario, l'analyse statistique montre que l'ajout de c9,c12-C18:2 dans le milieu de culture n'a aucun effet sur les quantités d'AGV produits ( $p = 0,39264$ ), leurs proportions respectives ( $p > 0,01$ ) et le rapport C2/C3 ( $p = 0,94030$ ).

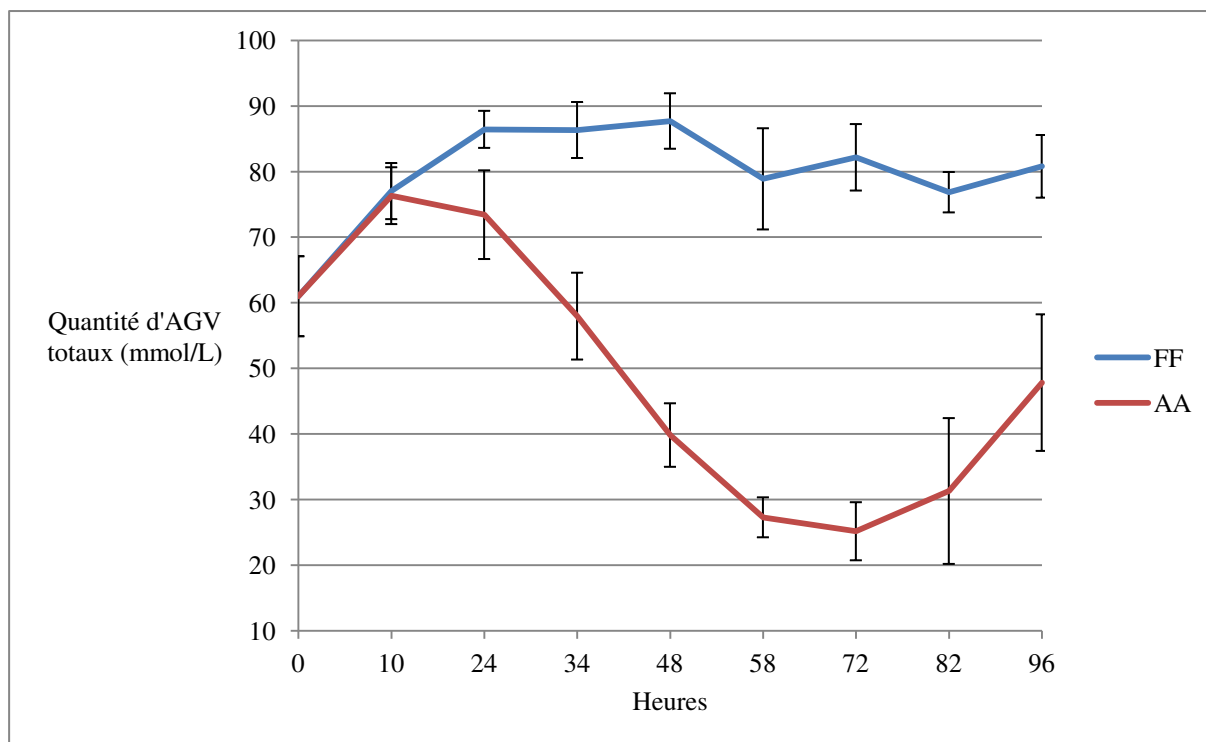
De ce fait, l'évolution de la production d'AGV et du rapport C2/C3 au cours des 5 jours de culture sera comparée uniquement entre les deux types de milieux (FF et AA), sans tenir compte de l'ajout de c9,c12-C18:2.

L'ensemble des résultats statistiques réalisés sur les AGV sont présentés en annexe 5.

### 2.2.1. Quantités d'AGV totaux

Les quantités d'AGV totaux produits dans les milieux FF et AA durant les 5 jours de culture bactérienne sont présentées dans la figure 29.

Figure 29 : Evolution de la quantité d'AGV totaux au cours des 5 jours de culture dans les deux types de milieux (FF et AA)



Dans les milieux FF, la quantité d'AGV totaux augmente progressivement les 24 premières heures, puis se stabilisent entre 78 et 88 mmol/L. Elle atteint son maximum à 48 heures.

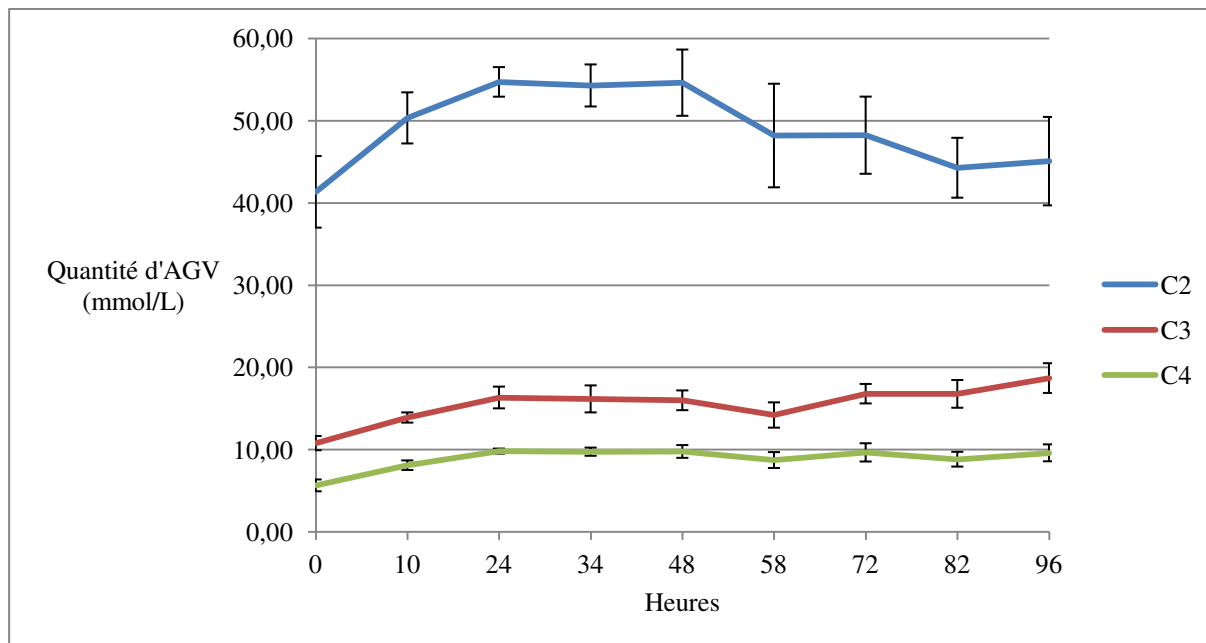
Dans les milieux AA, la quantité d'AGV totaux augmente la première journée de culture, avant de diminuer fortement jusqu'à 25 mmol/L. A partir de 72 heures de culture, la quantité d'AGV totaux remonte pour atteindre 47 mmol/L à la fin de l'expérimentation.

Dans les milieux FF, l'augmentation progressive de la production d'AGV le premier jour de culture peut s'expliquer par le temps d'adaptation de la communauté bactérienne avant d'avoir une activité optimale. En effet, les conditions d'anaérobiose ne sont pas optimales en début d'expérimentation : le fluide ruminal est en contact avec l'air ambiant du fait des prélèvements et des manipulations. L'augmentation du potentiel redox qui en découle ralentit les fermentations bactériennes. Julien *et al* (2009) ont montré que pendant les deux heures suivant le prélèvement, le potentiel redox du fluide ruminal *in vitro* est supérieur à celui mesuré *in vivo*, avant de retrouver un ordre de grandeur similaire. Il en est de même pour les

paramètres fermentaires : à 0 heure, la quantité d'AGV totaux est inférieure *in vitro* par rapport à celle mesurée *in vivo* en lien avec un défaut d'anaérobiose, du transfert du liquide ruminal jusqu'au laboratoire et de la dilution avec la solution tampon. Après 6 heures de culture, aucune différence n'est relevée entre les quantités d'AGV mesurées *in vitro* et *in vivo*. Cependant, cette étude n'explique pas le pic d'AGV totaux à seulement 48 heures après le début de l'expérimentation. Lengowski *et al* (2016) ont étudié les changements de composition du microbiote ruminal pendant l'adaptation à un système *in vitro* par quantification de l'ADN microbien par qPCR en temps réel. Ils ont montré que durant les deux premiers jours d'incubation d'un fluide ruminal, la biomasse bactérienne diminue, quel que soit le milieu de culture. Les nombres les plus bas pour *F. succinogenes* et *R. albus* ont été observés après 24 heures d'incubation. Par la suite, aucune différence significative du nombre de copie de gènes de *F. succinogenes* n'a été relevée. Par contre, l'abondance significativement plus haute de *R. albus* a été observée après 48 heures d'incubation. Ainsi, l'augmentation progressive de la quantité d'AGV totaux jusqu'à 48 heures de culture pourrait s'expliquer par le fait que les bactéries fibrolytiques nécessitent un temps d'adaptation avant d'atteindre leur croissance maximale. Les résultats de l'étude du microbiote nous permettront de conclure.

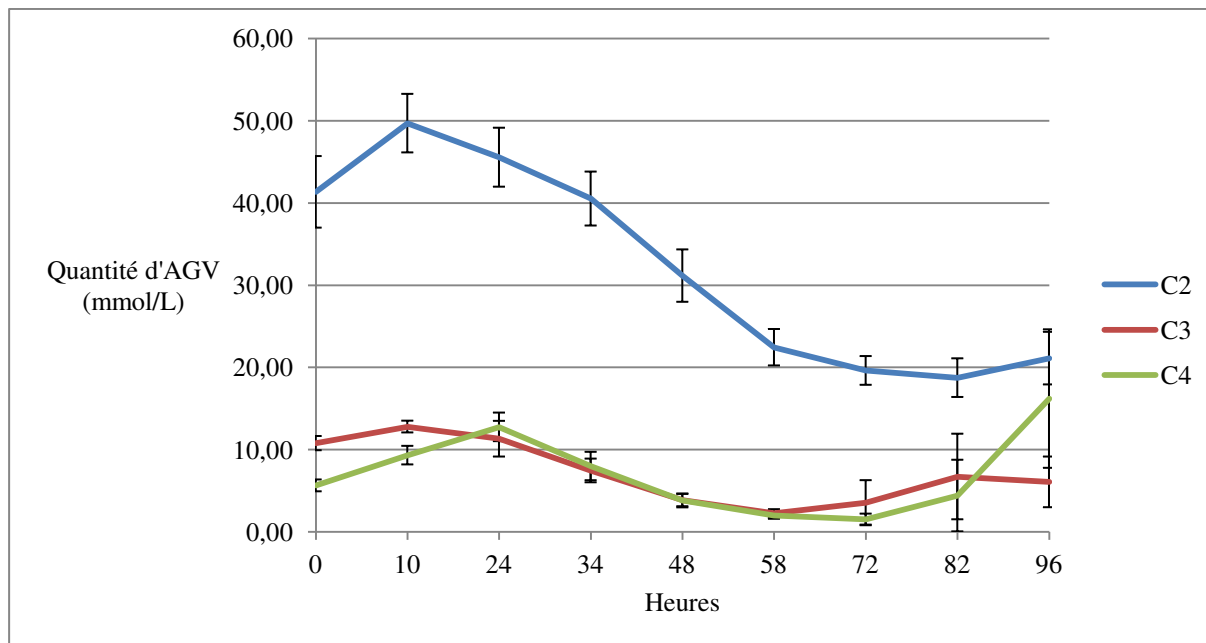
Les quantités moyennes de C2, C3 et C4 mesurées dans les milieux FF tout au long de l'expérimentation sont représentées dans la figure 30. Du fait de leur richesse en fibres, les milieux FF favorisent la croissance des bactéries fibrolytiques, productrices de C2. Ce dernier est alors nettement majoritaire. La légère augmentation du C4 au cours des cultures pourrait s'expliquer par la croissance de bactéries productrices de C4 plutôt fibrolytiques, telle que *B. fibrisolvens*.

**Figure 30** : Evolution des quantités des 3 principaux AGV dans les milieux FF au cours des 5 jours de culture



Dans les milieux AA, la cinétique de la quantité d'AGV totaux se caractérise principalement par une nette diminution à partir de 10 heures d'incubation. Le phénomène est à étudier avec l'évolution du pH. En effet, à 10 heures, le pH a déjà diminué jusqu'à 5,36. A cette valeur de pH, seuls *S. bovis* et les bactéries du genre *Lactobacillus* sont capables de croître et leur métabolisme est dirigé vers la production d'acide lactique, d'où la diminution de la quantité d'AGV produits. Aucun dosage du lactate n'a été réalisé. Cependant, le pH des milieux AA est proche du pKa du lactate (3,9), alors qu'il est autour de 4,8 pour les AGV. Ainsi, les AGV ont probablement été remplacés par l'acide lactique. La baisse de production touche essentiellement le C2 qui reste l'AGV majoritaire (Figure 31). Il est principalement synthétisé par les bactéries fibrolytiques, absentes à des valeurs de pH inférieures à 5,5. A partir de 72 heures de culture, la quantité d'AGV totaux augmente légèrement, en lien avec la production de C4 et en moindre proportion, de C3. Cette tendance est couplée à une légère hausse du pH des milieux, demeurant tout du moins très bas (inférieur à 5), qui souligne probablement une baisse de la concentration en lactate. Le phénomène peut s'expliquer par l'activité lactolytique de *M. elsdenii*. En effet, la bactérie fermente le lactate en C3 lorsque la concentration en acide lactique est importante [83], et également en C4 [118]. De plus, *M. elsdenii* est la seule bactérie à conserver son activité lactolytique pour des valeurs de pH comprise entre 4,8 et 5,5 [15]. Cette hypothèse pourra être validée ou réfutée par l'étude du microbiote.

Figure 31 : Evolution des quantités des 3 principaux AGV dans les milieux AA au cours des 5 jours de culture



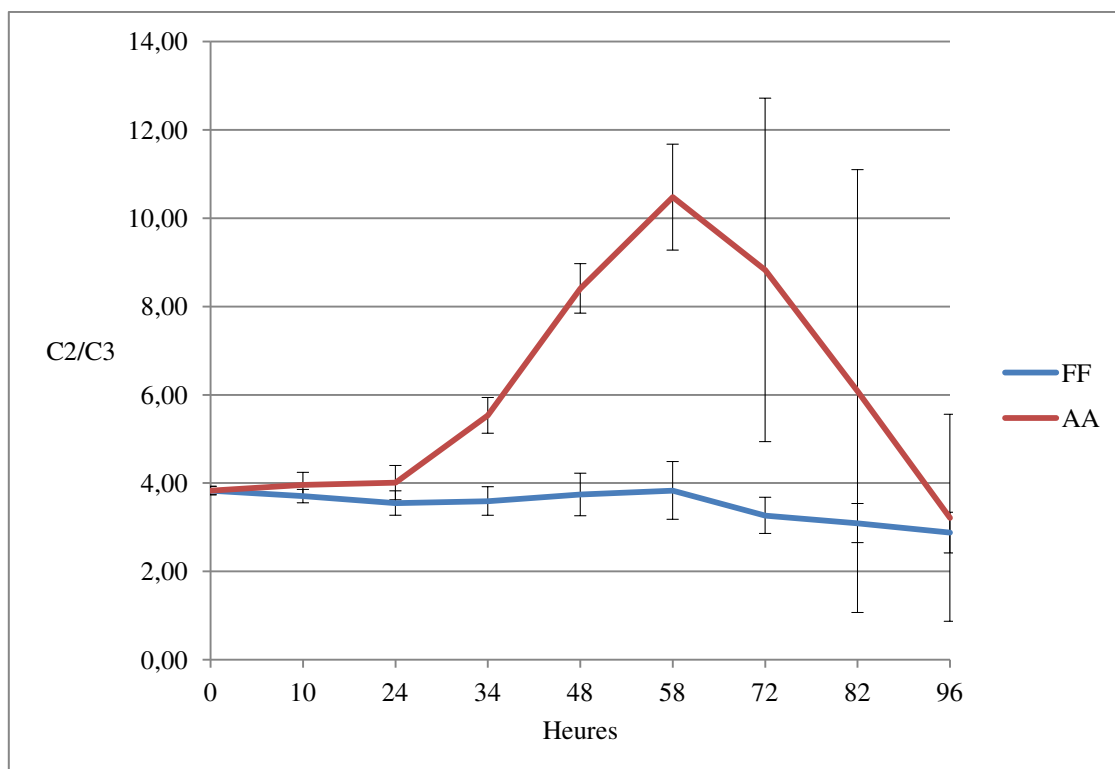
### **2.2.2. Rapport C2/C3**

Le C2 est préférentiellement synthétisé suite à la dégradation des glucides pariétaux par les bactéries fibrolytiques, tandis que le C3 est produit majoritairement lors de l'hydrolyse de l'amidon par les bactéries amylolytiques. L'étude du rapport C2/C3 donne une indication sur les profils fermentaires bactériennes, souvent liées aux proportions de fourrages et de concentrés dans la ration. Le ratio C2/C3 peut être utilisé pour apprécier l'état d'acidose ruminale. En effet, un rapport supérieur à 3,0 peut être considéré comme normal, alors qu'un ratio de 2,5 ou moins traduit un état d'acidose latente [111]. D'autre part, une diminution du rapport C2/C3 est observée lors d'une réduction des fourrages en fines particules [52].

L'évolution du rapport C2/C3 dans les milieux FF et AA durant les 5 jours de culture bactérienne sont présentées dans la figure 32.



Figure 32 : Evolution du rapport C2/C3 au cours des 5 jours de culture dans les deux types de milieux (FF et AA)



Dans les milieux FF, le rapport C2/C3 reste stable durant toute la période de culture, compris entre 2,45 et 3,83. Les conditions physico-chimiques des milieux FF sont relativement constantes tout au long de l'expérimentation. Deux hypothèses sont avancées. La première suggère que les populations bactériennes sont en équilibre dans les milieux FF, et de ce fait, elles n'entraînent pas de modification majeure des milieux et de leur production d'AGV. La seconde serait que la stabilité des milieux permettrait d'éviter des perturbations importantes du microbiote à l'origine d'un bouleversement des profils fermentaires, et par conséquent, d'une modification nette du rapport C2/C3.

Dans les milieux AA, le rapport C2/C3 est très variable. Proche du ratio C2/C3 des milieux FF les 24 premières heures de culture, il augmente fortement par la suite et atteint un pic à 10,37 au bout de 58 heures. Ensuite, il diminue jusqu'à revenir à un ordre de grandeur similaire au rapport des milieux FF à la fin de l'expérimentation. La hausse du ratio C2/C3 est due à une diminution de la production de C3 nettement supérieure à la baisse de la production de C2. En effet, le pourcentage de réduction de la quantité de C3 entre la valeur initiale de l'inoculum et la valeur mesurée à 58 heures est de 79%, alors qu'il est de 45,7% pour le C2. La diminution du rapport C2/C3 observée au-delà de 58 heures est liée à la stabilisation de la quantité de C2 dans les milieux AA, couplée à une légère hausse de la production de C3

(Figure 31). Comme expliqué dans le chapitre précédent (i.e. Quantités d'AGV totaux), la diminution importante de la quantité de C2 peut s'expliquer par la disparition de la majorité de la communauté bactérienne, en particulier les bactéries fibrolytiques, du fait d'un pH très bas (5,36 à 10 heures de culture). D'autre part, la reprise de la production de C3 les 24 dernières heures d'expérimentation peut être liée à l'activité lactolytique de bactéries comme *M. elsdenii*.

### **2.3. Comparaison des activités microbiennes sur 3 heures entre J1 et J5**

Différents paramètres ont été évalués pour étudier les activités microbiennes : le pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2, et les quantités produites d'isomères t10, d'isomères t11 et de C18:0.

#### **2.3.1. Caractérisation de l'inoculum de départ**

Le tableau 9 rassemble les dosages d'AG réalisés sur l'inoculum à J1, mélangé d'une part avec le tampon bicarbonate et d'autre part avec le tampon phosphate. Il représente l'état initial de la capacité bactérienne de biohydrogénation de l'inoculum.

Tableau 9 : Activités microbiennes de biohydrogénation à J1

		<b>Inoculum + Tampon Bicarbonate</b>	<b>Inoculum + Tampon Phosphate</b>
<b>c9,c12- C18:2</b>	Quantité initiale (mg)	2,04	1,99
	Quantité finale (mg)	1,49	1,79
	Disparition (%)	27,2	9,97
<b>t10</b>	Quantité initiale (mg)	0,015	0,014
	Quantité finale (mg)	0,033	0,031
	Quantité produite (mg)	0,018	0,017
<b>t11</b>	Quantité initiale (mg)	0,10	0,098
	Quantité finale (mg)	0,16	0,105
	Quantité produite (mg)	0,06	0,007
<b>C18:0</b>	Quantité initiale (mg)	1,14	1,13
	Quantité finale (mg)	1,43	1,34
	Quantité produite (mg)	0,29	0,21

### 2.3.2. Comparaison des deux types de milieux

Le tableau 10 expose les résultats des dosages des différents paramètres d'études de la BH dans les deux types de milieux (F et A) à J5.

Tableau 10 : Comparaison des quantités produites de trans 10, de trans 11 et d'acide stéarique et du pourcentage de disparition de l'acide linoléique sur 3 heures à J5 entre les milieux F et

A

		Milieux F	Milieux A	ECTM	p
c9,c12-C18:2	Quantité initiale (mg)	1,80	2,57		
	Quantité finale (mg)	1,46	2,67	0,22	<b>0,00525</b>
	Disparition (%)	18,9	- 4,17	6,49	<b>&lt; 0,001</b>
t10	Quantité initiale (mg)	0,007	0,018		
	Quantité finale (mg)	0,041	0,024		
	Quantité produite (mg)	0,034	0,006	0,004	<b>&lt; 0,001</b>
t11	Quantité initiale (mg)	0,14	0,007		
	Quantité finale (mg)	0,28	0,008		
	Quantité produite (mg)	0,14	0,001	0,039	<b>&lt; 0,001</b>
C18:0	Quantité initiale (mg)	0,49	0,039		
	Quantité finale (mg)	0,77	0,052		
	Quantité produite (mg)	0,28	0,013	0,051	0,03973

- Disparition du c9,c12-C18:2

Dans les milieux F, la similarité des quantités initiales de c9,c12-C18:2 à J1 et J5 signifie qu'il ne s'accumule pas au cours des cultures. Par contre, une légère accumulation est observée dans les milieux A, sûrement due à une diminution de l'activité de BH du c9,c12-C18:2 au cours de l'incubation.

La disparition du c9,c12-C18:2 est significativement plus importante dans les milieux F par rapport aux milieux A ( $p < 0,001$ ). Dans les milieux F, l'activité de BH a été conservée, alors qu'elle est nulle dans les milieux A après 5 jours d'incubation.

- Production des isomères t10 et t11

Dans les milieux F, la quantité produite des isomères t10 et t11 a augmentée numériquement entre J1 et J5, sûrement dû à l'accumulation des intermédiaires de la BH.

L'augmentation des isomères t11 pourrait s'expliquer par le développement de *B. fibrisolvans*, responsable de la BH en  $\Delta 12$ . Elle peut être mise en relation avec la hausse de la concentration en C4 dans les milieux F au cours des cultures puisque *B. fibrisolvans* produit principalement du C4. Les résultats de l'analyse du microbiote nous permettront de conclure.

Le phénomène inverse est observé dans les milieux A : la quantité produite des isomères t10 et t11 a diminué numériquement entre J1 et J5, et elle est très faible à J5.

Concernant les isomères t11, le phénomène s'observe déjà à J1 : la quantité produite d'isomères t11 est très faible. Il peut s'expliquer par la disparition des bactéries capables de réaliser les réactions de BH et/ou une inhibition totale de la  $\Delta 12$  isomérase. En effet, les isomères t11 sont des intermédiaires de la BH du c9,c12-C18:2 réalisée par des bactéries fibrolytiques, en particulier *B. fibrisolvans* [134]. Ces dernières ne résistent pas à des pH très faibles, à l'image des valeurs obtenues dans les milieux A, de même que la  $\Delta 12$  isomérase qui a une activité très inhibée à ce pH.

Les isomères t10 ont tendance à s'accumuler dans certaines conditions alimentaires, à titre d'exemple des régimes à base d'ensilage de maïs riches en amidon et supplémentés en lipides [115]. D'autre part, Zened *et al* (2011) ont montré qu'une prolifération des bactéries productrices (*Lactobacillus*) et consommatrices (*Veillonellaceae*) d'acide lactique était liée à une augmentation de la proportion d'isomères t10, suggérant une déviation de la voie t11 de la BH du c9,c12-C18:2 vers la voie t10. Enfin, certaines bactéries acido-résistantes produisent des isomères t10 : *M. elsdenii* [59] et *P. acnes* [74]. Ainsi, une hausse de la production d'isomères t10 auraient pu être attendue dans les milieux A, mais nos résultats ne concordent pas avec les études citées. Il est possible que le pH des milieux A soit devenu tellement faible que la plupart des bactéries et/ou des enzymes des deux voies de la BH du c9,c12-C18:2 aient disparu, même si la production d'isomères t10 persiste légèrement. Une étude [126] a révélé que l'isomérisation du c9,c12-C18:2 est inhibée pour des valeurs de pH basses, suite à une incubation de plus de 2 heures. Il est probable que la BH du c9,c12-C18:2 n'a pas été réalisée dans les milieux A du fait d'un pH trop faible.

Il est important de noter que la ration donnée aux vaches dont les inocula sont issus peut jouer un rôle important dans la sélection de la voie t10 *in vitro*. En effet, Zened *et al* (2012b) ont remarquée que la proportion d'isomères t10 produits est plus importante *in vitro* lorsque les

vaches sont nourries avec une ration riche en amidon et supplémentée en huile. Les résultats suggèrent que l'équilibre entre les bactéries responsables de la BH est modulé par le régime des vaches.

La quantité produite des différents isomères est différente de manière significative entre les milieux F et les milieux A ( $p < 0,001$ ). Ainsi, le type de substrat a un effet majeur sur la BH du c9,c12-C18:2 : un milieu riche en amidon est à l'origine d'une inhibition des réactions de BH.

- Production du C18:0

Aucune différence n'est observée quant à la production de C18:0 entre J1 et J5 dans les milieux F, en corrélation avec la disparition constante du c9,c12-C18:2. Cependant, la quantité d'isomères t10 et t11 a augmenté. Cette discordance entre la production d'isomères intermédiaires et de C18:0 peut être due au fait que les bactéries réalisant l'hydrogénation finale sont moins nombreuses : la vitesse de la réaction est alors moindre par rapport aux autres réactions de la BH, d'où l'accumulation d'intermédiaires. L'hypothèse est cohérente avec la teneur en C18:0 qui est plus faible à J5 par rapport à l'inoculum de départ.

A contrario, la quantité produite de C18:0 diminue dans les milieux A entre J1 et J5. Le phénomène peut s'expliquer par le manque de substrat car le c9,c12-C18:2 n'est pas isomérisé, ou la diminution des bactéries et/ou des enzymes responsables de l'hydrogénation finale en C18:0. En effet, ces bactéries appartiendraient aux genres *Butyrivibrio* et *Eubacterium*, dont les populations déclinent dans les milieux A (i.e. Figures 39 et 41). Ainsi, la dernière étape de la BH est très inhibée, d'où l'absence de production de C18:0.

**En conclusion, les milieux F ont permis la croissance de bactéries fibrolytiques responsables de la voie t11, tout en réduisant l'activité de l'isomérisation finale en C18:0 et en maintenant la voie t10. Par contre, il est probable que la BH du c9,c12-C18:2 n'a pas été réalisée dans les milieux A à cause des valeurs de pH trop faibles, compte tenu de la disparition faible (J1) voire absente (J5) du c9,c12-C18:2, et l'absence de production d'isomères intermédiaires et de C18:0.**

### 2.3.3. Comparaison lors d'ajout ou non d'acide linoléique

Les tableaux 11 et 12 comparent les différents paramètres d'études de la BH dans les milieux additionnés de c9,c12-C18:2 (FLA et ALA) et non additionnés (F et A) à J1 et J5.

- Milieux FF riches en fibres

Tableau 11 : Comparaison des quantités produites de trans 10, de trans 11 et d'acide stéarique et du pourcentage de disparition de l'acide linoléique sur 3 heures dans les milieux F et FLA à J1 et J5

		<b>J1</b>	<b>J5</b>	
		<b>Inoculum + Tampon Bicarbonate</b>	<b>Milieux F</b>	<b>Milieux FLA</b>
<b>c9,c12-C18:2</b>	Quantité initiale (mg)	2,04	1,80	3,26
	Quantité finale (mg)	1,49	1,46	2,58
	Disparition (%)	27,2	18,9	20,8
<b>t10</b>	Quantité initiale (mg)	0,015	0,007	0,12
	Quantité finale (mg)	0,033	0,041	0,20
	Quantité produite (mg)	0,018	0,034	0,08
<b>t11</b>	Quantité initiale (mg)	0,10	0,14	0,74
	Quantité finale (mg)	0,16	0,28	1,39
	Quantité produite (mg)	0,06	0,14	0,65
<b>C18:0</b>	Quantité initiale (mg)	1,14	0,49	2,32
	Quantité finale (mg)	1,43	0,77	2,38
	Quantité produite (mg)	0,29	0,28	0,06

Les milieux FLA se caractérisent par une accumulation importante du c9,c12-C18:2 à J5. Le phénomène peut être dû à une saturation des bactéries responsables de la BH : l'apport quotidien de c9,c12-C18:2 a dépassé les capacités de digestion de la population bactérienne. D'autre part, le pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2 à J5 est similaire entre les milieux F et FLA : l'efficacité de la BH est équivalente dans les deux milieux à J5, mais elle est tout de même inférieure par rapport à J1.

Ainsi, l'ajout de c9,c12-C18:2 semble n'avoir aucun effet sur la disparition de ce dernier, et par conséquent, sur la première réaction d'isomérisation.

A J5, la quantité produite d'isomères t10 et t11 est numériquement supérieure dans les milieux FLA par rapport aux milieux F. D'autre part, entre J1 et J5, la quantité d'isomères produits est multipliée par 2 dans les milieux F. Le phénomène est accentué dans les milieux FLA : la production est multipliée par 10 pour les isomères t11, et par 4 pour les isomères t10. L'ajout de c9,c12-C18:2 favoriserait alors de manière plus importante la voie t11 de la BH.

Par ailleurs à J5, la production de C18:0 est très inférieure dans les milieux FLA par rapport aux milieux F, alors que la quantité d'isomères t10 et t11 est augmentée.

Les deux phénomènes s'expliquent par l'inhibition de la BH du c9,c12-C18:2 lorsque ce dernier est présent en excès. En effet, deux études de Kim *et al* [58, 60] ont montré qu'un excès de c9,c12-C18:2 inhibait les activités réductases de culture *in vitro* de *Butyrivibrio fibrosolvens*. Ce phénomène se traduisait par l'accumulation d'intermédiaires CLA et t-C18:1. D'autre part, la seconde réductase de la BH serait inhibée par des concentrations élevées de CLA. Ceci se manifeste par une saturation des réactions d'isomérisation et d'hydrogénation, ainsi qu'une accumulation des intermédiaires réactionnels [126].

- Milieux AA riches en amidon

Tableau 12 : Comparaison des quantités produites de trans 10, de trans 11 et d'acide stéarique et du pourcentage de disparition de l'acide linoléique sur 3 heures dans les milieux A et ALA, à J1 et J5

		J1	J5	
		Inoculum + Tampon Phosphate	Milieux A	Milieux ALA
c9,c12-C18:2	Quantité initiale (mg)	1,99	2,57	4,77
	Quantité finale (mg)	1,79	2,67	4,93
	Disparition (%)	9,97	- 4,17	- 3,31
t10	Quantité initiale (mg)	0,014	0,018	0,012
	Quantité finale (mg)	0,031	0,024	0,013
	Quantité produite (mg)	0,017	0,006	0,001
t11	Quantité initiale (mg)	0,098	0,007	0,009
	Quantité finale (mg)	0,105	0,008	0,010
	Quantité produite (mg)	0,007	0,001	0,001
C18:0	Quantité initiale (mg)	1,13	0,039	0,032
	Quantité finale (mg)	1,34	0,052	0,037
	Quantité produite (mg)	0,21	0,013	0,005

Les résultats obtenus pour les milieux ALA sont semblables aux résultats des milieux A, mais plus prononcés : une accumulation nette du c9,c12-C18:2, ainsi que la production très faible d'isomères t10, d'isomères t11 et de C18:0. A l'image des milieux A, il est probable que la BH du c9,c12-C18:2 n'ait pas été réalisée dans les milieux ALA suite à la disparition de la plupart de la communauté bactérienne et/ou à une inhibition majeure de leurs activités.

**En conclusion, l'ajout de c9,c12-C18:2 a entraîné une accumulation des isomères t10 et t11 dans les milieux FLA suite à l'inhibition de la deuxième réduction de la BH par les CLA. A contrario, les milieux ALA ne montrent pas d'évolution positive des paramètres de la BH, à l'image des milieux A.**

L'étude des activités enzymatiques met en évidence des tendances similaires, toutefois moins marquées. Leurs activités et/ou leurs synthèses ont été diminuées. Nous avons par conséquent choisi de ne pas les présenter dans ce manuscrit afin d'éviter d'être redondant.

Zened *et al* (2011) ont démontré qu'une augmentation de la proportion d'isomères t10 ou t11 s'explique par la croissance des bactéries réalisant la BH et/ou une hausse de leurs productions enzymatiques, et non par une augmentation de l'activité des enzymes elle mêmes. A la vue des résultats concernant la BH du c9,c12-C18:2 dans les différents milieux, il semblerait que les bactéries fibrolytiques sélectionnées dans les substrats FF privilégient la voie t11, et le phénomène est accentué lors d'ajout de c9,c12-C18:2. Parmi ces bactéries, il est probable de retrouver les genres *Butyrivibrio* et *Ruminococcus*. D'autre part, dans les milieux AA, les bactéries montreraient une très faible activité de BH et/ou leurs enzymes seraient inhibées à des pH bas. Au sein du microbiote ruminal, les bactéries acido-résistantes capables de persister à des pH inférieurs à 5 sont peu nombreuses, les plus connues appartenant aux genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*.



## **2.4. Evolution et comparaison du microbiote sur 5 jours de culture**

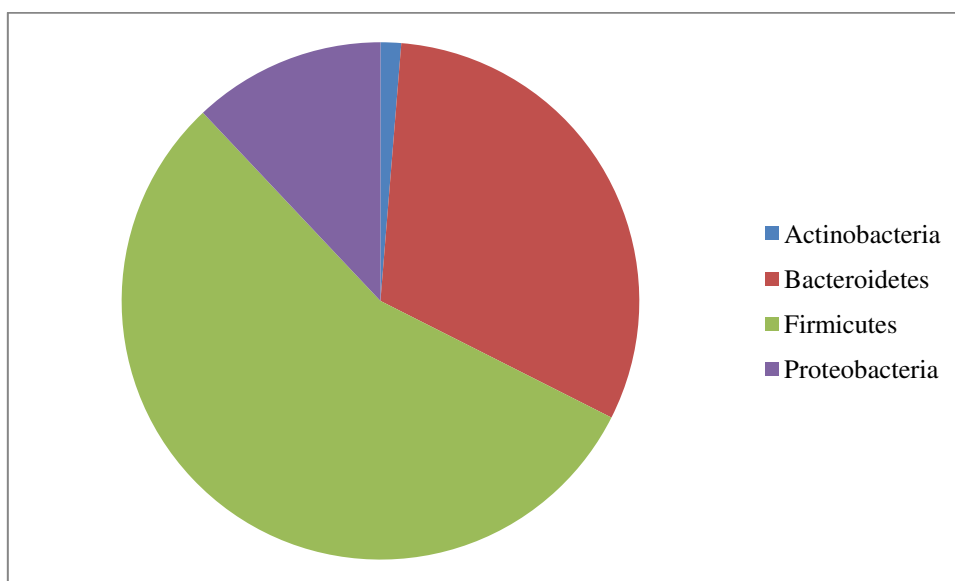
Nous étudierons tout d'abord le microbiote ruminal à l'échelle des 4 principaux phyla (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria), puis à l'échelle des genres, identifiés par PCR en ciblant les régions V3 et V4 de l'ADNr 16S.

L'ensemble des résultats statistiques réalisés sur les phyla et les genres bactériens sont présentés en annexes 6 et 7.

### **2.4.1. A l'échelle des phyla**

Les figures 33, 34 et 35 représentent les proportions respectives des 4 principaux phyla bactériens dans l'inoculum initial (J1), et dans les milieux FF et AA à J5.

Figure 33 : Proportions des 4 principaux phyla bactériens dans l'inoculum

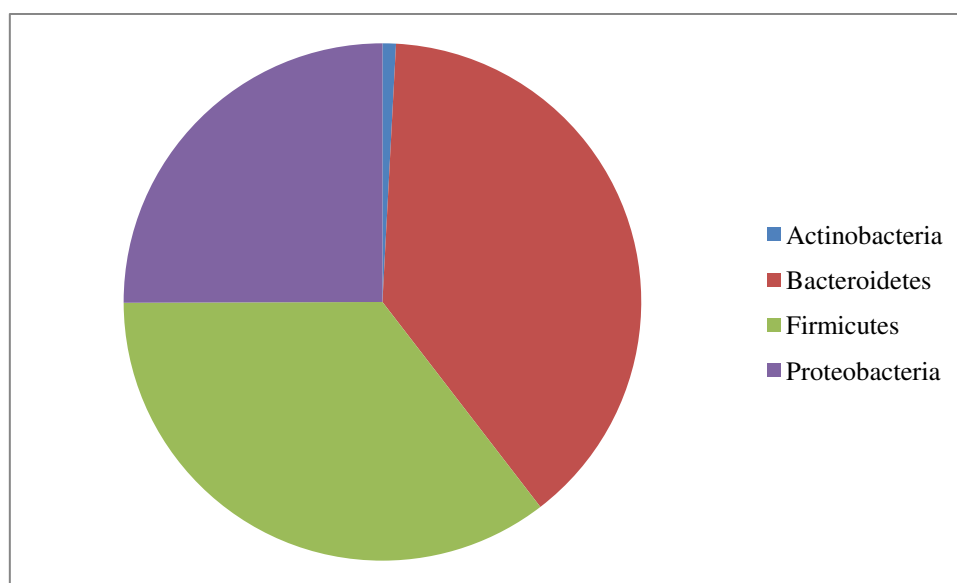


L'inoculum présente une majorité de Firmicutes (55,5%) et de Bacteroidetes (31,2%). Les deux autres phylas sont représentés à hauteur de 12% pour les Proteobacteria et 1,3% pour les Actinobacteria.

Les proportions des différents phyla dans l'inoculum sont en accord avec les diverses études de la population bactérienne ruminale. L'analyse de banques de séquences d'ADNr 16S issues de contenus ruminiaux montre que les Firmicutes représentent 50 à 80% de la communauté bactérienne, les Bacteroidetes 10 à 40%, suivis des Proteobacteria (3 à 5%) [92, 146]. Néanmoins, la proportion de Proteobacteria est plus élevée dans notre inoculum en comparaison des études réalisées par ailleurs. La plupart des bactéries du phyla étant

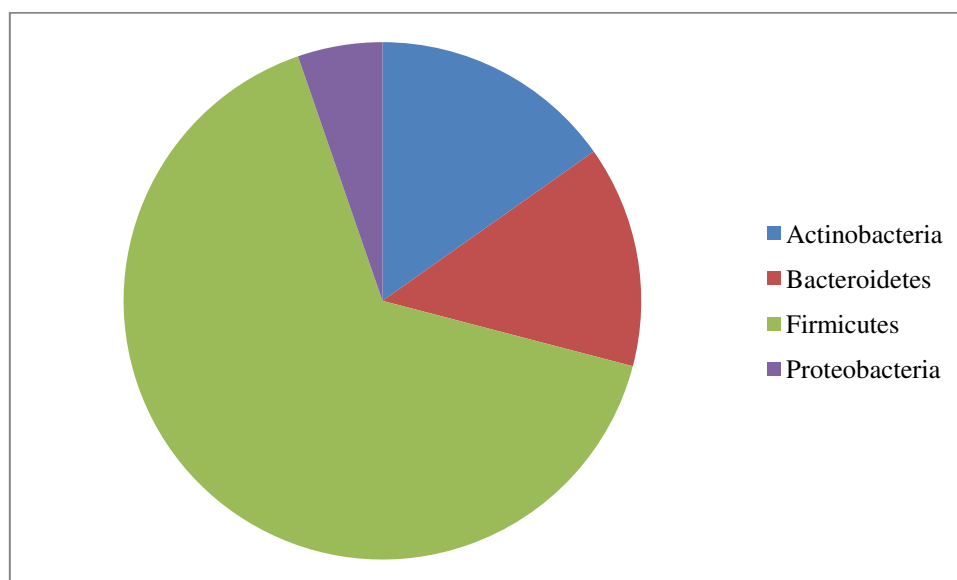
amylolytiques, la ration distribuée aux vaches dont est issu l'inoculum ne peut pas expliquer le développement du phylum. En effet, la ration est constituée de foin grossier à volonté, et la principale source d'amidon est le concentré PASSIO VL 3L, composé de 18% d'amidon. Dans l'étude de Zened *et al* (2012a), les Proteobacteria représentait uniquement 4,3% de la communauté bactérienne lorsque les vaches recevaient une ration pauvre en amidon (21,5%). Dans notre étude, l'abondance du phyla est 3 fois supérieure (12%) par rapport à l'étude de Zened *et al* (2012a), alors que la ration distribuée aux vaches est plus pauvre en amidon. Ainsi, la proportion d'amidon dans la ration distribuée aux vaches prélevées ne permet pas d'expliquer l'abondance des Proteobacteria dans l'inoculum. Une étude a montré que le phylum était abondant chez les jeunes ruminants, mais qu'il diminuait considérablement dès les premiers mois de vie jusqu'à deux ans [47]. L'âge des animaux prélevés n'est pas connu, mais il s'agissait de vaches adultes tarées, dont l'âge était supérieur à la période d'étude de Jami *et al* (2013). L'étude des genres bactériens permettra de nous éclairer sur l'abondance particulière des Proteobacteria dans l'inoculum.

Figure 34 : Proportions des 4 principaux phyla bactériens dans les milieux FF à J5



A J5, les proportions des phyla dans les milieux FF montrent une nette augmentation des Proteobacteria (25,1%), associée à une diminution de la population des Firmicutes (35,4%). Les proportions de Bacteroidetes et d'Actinobacteria restent relativement stables : elles sont respectivement de 38,7% et 0,8%.

Figure 35 : Proportions des 4 principaux phyla bactériens dans les milieux AA à J5



A J5, les proportions des 4 phyla dans les milieux AA se caractérisent par une augmentation significative des Actinobacteria (15,2%). Le phylum des Firmicutes reste majoritaire (65,6%). A contrario, les proportions de Bacteroidetes et de Proteobacteria diminuent de manière importante : elles sont respectivement de 13,9% et 5,3%.

Ainsi, à J5, les milieux FF montre une abondance relative en Bacteroidetes et Proteobacteria significativement plus importante par rapport aux milieux AA ( $p < 0,001$ ). A l'inverse, les milieux AA ont plus de Firmicutes et d'Actinobacteria par rapport aux milieux FF ( $p < 0,001$ ). Or, les milieux FF se caractérisent par une teneur en fibres plus élevée par rapport aux milieux AA (NDF de 47% de la MB pour les milieux F, et de 30% pour les milieux A), et les milieux A présentent une teneur en amidon supérieure par rapport aux milieux F (34% de la MB pour les milieux A, 6% de la MB pour les milieux F). De plus, l'évolution du pH des milieux A montre des valeurs comprises entre 4 et 5 dès le deuxième jour de culture.

**En conclusion, l'étude des proportions respectives des 4 phyla dans l'inoculum et après 5 jours de culture montre une différence significative de croissance entre les diverses populations bactériennes en fonction du milieu. Cette différence s'explique tout d'abord par les nutriments apportés dans chaque milieu de culture, qui sélectionnent les bactéries utilisatrices de ces substrats. D'autre part, dans le milieu A, les valeurs de pH extrêmement faibles ont entraîné la sélection de bactéries acido-résistantes.**

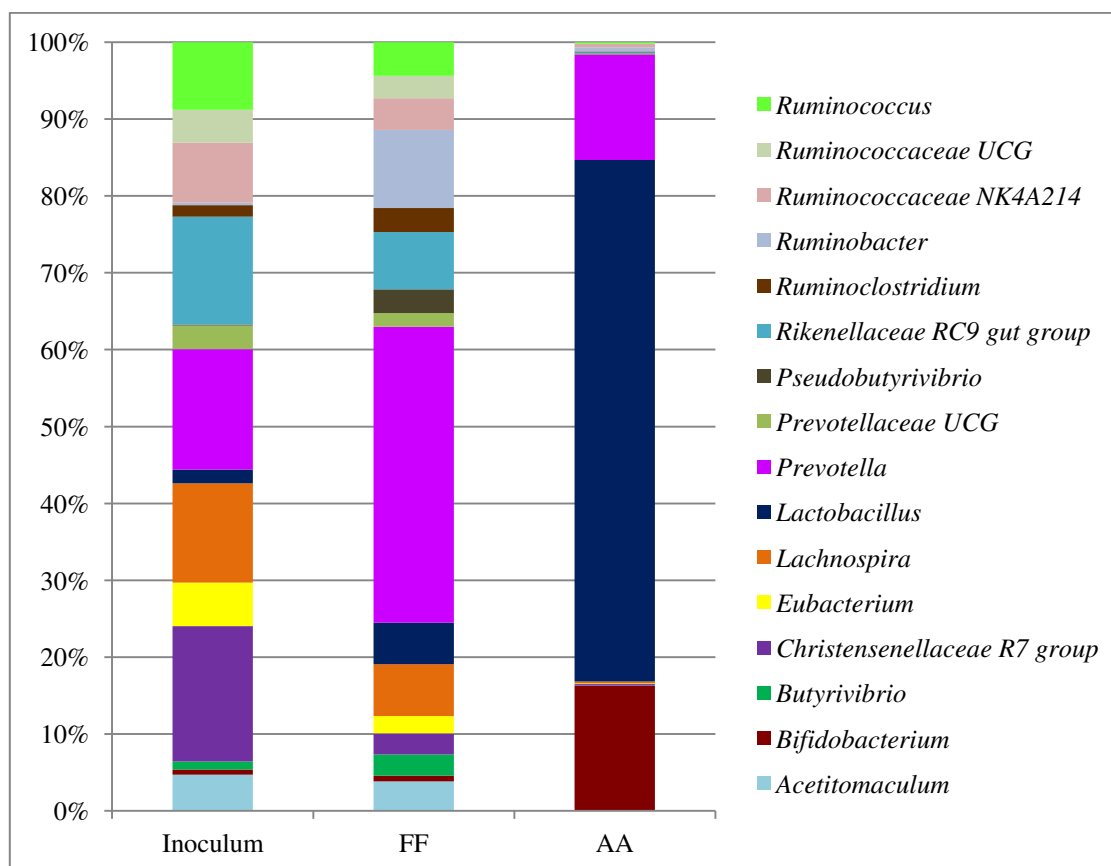
### 2.4.2. A l'échelle des genres

L'étude de Lengowski *et al* (2016) a montré que la biomasse bactérienne diminue durant les deux premiers jours d'incubation d'un fluide ruminal, en particulier le premier jour où sont enregistrés les nombres les plus bas des principales espèces bactériennes. Ainsi, nous prêterons peu d'attention à la cinétique des populations durant les premières 24 heures de culture, temps nécessaire à l'adaptation du microbiote à son nouvel environnement.

D'autre part, les données de séquençage ont permis d'identifier des bactéries non cultivables, telles que *Christensenellaceae R7 group*, *Prevotellaceae UCG*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, *Ruminococcaceae NK4A214 group* et *Ruminococcaceae UCG*. Les genres *Christensenellaceae R7 group* et *Rikenellaceae RC9 gut group* montrent une abondance relative importante dans l'inoculum, mais ils décroissent rapidement pendant la culture *in vitro*. Il existe très peu d'études sur ces genres bactériens.

La figure 36 représente la proportion des différents genres bactériens dans l'inoculum à J1, et dans les milieux FF et AA à J5.

Figure 36 : Pourcentages des différents genres bactériens dans l'inoculum à J1 et dans les milieux FF et AA à J5



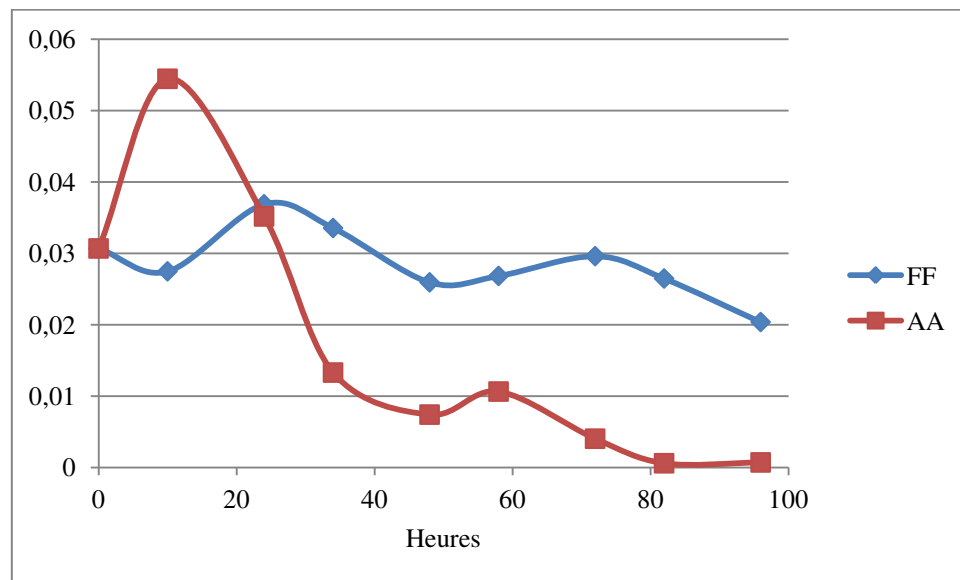
Les milieux FF se caractérisent par une croissance importante du genre *Prevotella*, atteignant 38,4% de la communauté bactérienne à J5. Le phénomène explique l'augmentation du phylum des Bacteroidetes, mis en évidence dans le paragraphe précédent (i.e. A l'échelle des phyla). D'autres genres montrent une croissance dans les milieux FF, toutefois moins marquée : *Ruminobacter*, *Ruminoclostridium*, *Pseudobutyrvibrio* et *Lactobacillus*. La diminution de l'abondance relative des Firmicutes dans les milieux FF peut s'expliquer par une diminution du genre *Ruminococcus* ainsi qu'une croissance restreinte du genre *Butyrvibrio*, au profit du genre *Prevotella*.

Les milieux AA montrent une croissance très importante du genre *Lactobacillus*. Les bactéries du genre sont capables de continuer de croître à un pH inférieur à 5. Roque (1991) a rapporté qu'à des valeurs de pH extrêmement faibles, la population bactérienne est quasiment réduite à une monoculture de lactobacilles. Le phénomène explique la présence majeure des Firmicutes dans les milieux AA, mis en évidence dans le paragraphe précédent (i.e. A l'échelle des phyla). D'autre part, le genre *Bifidobacterium* a également une croissance importante dans les milieux AA. Ceci est en accord avec l'étude de Waddington *et al* (2010) : ils ont montré que les bactéries du genre *Bifidobacterium* possèdent une acido-résistance importante, d'autant plus après une période d'adaptation à des valeurs de pH faibles et lorsque la bactérie est en phase stationnaire. Le troisième genre persistant dans les milieux AA est le genre *Prevotella*. Ainsi, à J5, la communauté bactérienne des milieux AA se restreint à trois genres : *Lactobacillus* (67,8%), *Bifidobacterium* (16,2%) et *Prevotella* (13,7%).

Par la suite, nous allons étudier l'évolution des différents genres bactériens tout au long des cultures, dans les différents milieux. Les figures 37 à 52 représentent l'évolution au cours des 5 jours de culture de l'abondance des genres bactériens ayant évolué de manière significativement différente dans les milieux FF et AA ( $p < 0,001$ ). L'ajout de c9,c12-C18:2 a un effet significatif ( $p < 0,001$ ) uniquement sur trois genres : *Butyrvibrio*, *Ruminoclostridium* et *Ruminobacter*.

- Acetitomaculum

Figure 37 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Acetitomaculum* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



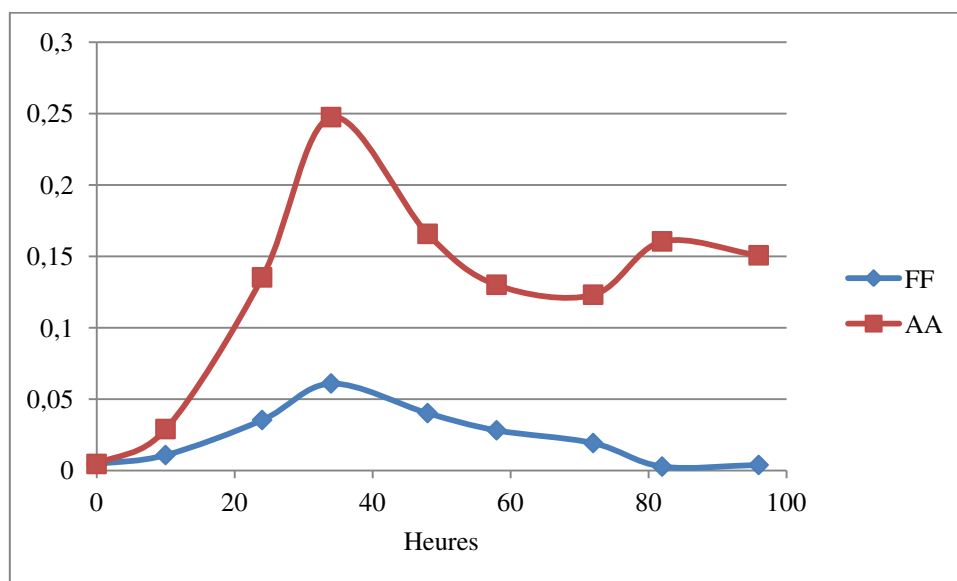
Dans les milieux FF, les bactéries du genre *Acetitomaculum* montrent un nombre relativement constant au cours des 5 jours de culture. A contrario, dans les milieux AA, la cinétique de la population se caractérise par une croissance élevée les 10 premières heures, suivie d'une chute brutale jusqu'à disparaître presque totalement.

A noter que l'abondance relative des bactéries du genre *Acetitomaculum* reste relativement faible, mais la différence de cinétique reste tout de même significative entre les deux types de milieux ( $p < 0,001$ ).

Le genre *Acetitomaculum* contient une seule espèce, *Acetitomaculum ruminis*, retrouvée parmi la population bactérienne ruminale lors de régime riche en fourrages. Elle produit essentiellement du C2 suite à la fermentation de formate, glucose ou cellobiose. Son pH de croissance est compris entre 6,4 et 7,3 [35]. Les conditions de croissance de la bactérie expliquent d'une part sa persistance dans les milieux riches en fibres (milieux FF), et d'autre part sa disparition dans les milieux AA, où le pH est bas (inférieur à 5,5) dès la dixième heure de culture.

- *Bifidobacterium*

Figure 38 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Bifidobacterium* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrat (FF et AA)



Le genre *Bifidobacterium* est en quantité très faible dans l'inoculum. L'analyse statistique montre tout de même une différence significative entre les milieux FF et AA ( $p < 0,001$ ).

Dans les milieux AA, le genre *Bifidobacterium* montre tout d'abord une croissance rapide jusqu'à 34 heures de culture. Par la suite, son nombre diminue, avant de se stabiliser.

Dans les milieux FF, sa croissance est très limitée par rapport aux milieux AA. L'abondance maximale est atteinte à 34 heures d'incubation, mais elle est 5 fois moins importante que dans les milieux AA. Pour les deux derniers prélèvements (82 et 96 heures de culture), l'abondance du genre se rapproche de la valeur initiale de l'inoculum.

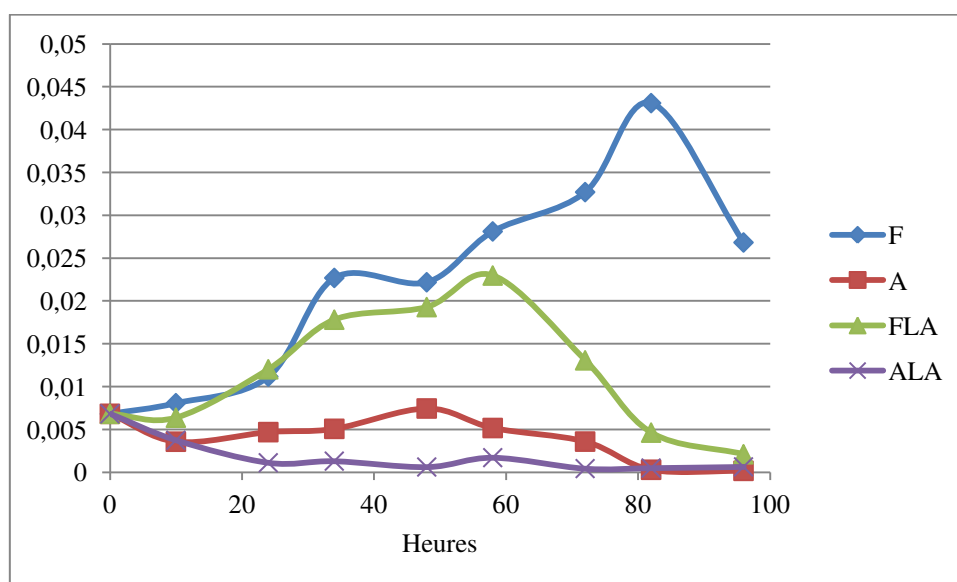
Le genre *Bifidobacterium* est retrouvé dans le rumen en nombre important lorsque les animaux reçoivent une ration riche en amidon. Il est absent ou présent en très petites quantités pour des rations riches en fourrages [127]. Les résultats de l'expérimentation sont en accord avec les observations de Trovatelli et Matteuzzi (1976) : les bactéries du genre *Bifidobacterium* sont peu abondantes dans les milieux riches en fibres (milieux FF), alors que leur croissance est favorisée dans les milieux AA riches en amidon.

D'autre part, les bactéries du genre *Bifidobacterium* présentent une acido-résistance importante, qui explique leur présence dans les milieux AA même à des pH très bas. En effet, les espèces retrouvées dans le rumen ont une croissance retardée pour des pH inférieurs à 6, mais elle ne devient nulle qu'en dessous de 4,5. Une exception concerne *B.*

*thermoacidophilum* : sa croissance est retardée, mais persiste à une valeur de pH de 4 [84]. A 34 heures d'incubation, le pH des milieux AA avoisine 4,5. Ainsi, avant le troisième prélèvement de culture, la plupart des espèces de *Bifidobacterium* sont capables de se développer, même si leur croissance est réduite, d'où l'augmentation de leur abondance dans les milieux AA. Par la suite, le pH étant inférieur à 4,5, seule l'espèce *B. thermoacidophilum* se multiplie, ce qui explique la diminution de l'abondance du genre. Enfin, le pH des milieux AA remonte légèrement au-delà de 72 heures d'incubation (4,44 à 82 heures, 4,57 à 96 heures) : les autres espèces de *Bifidobacterium* reprennent une légère croissance.

- *Butyrivibrio*

**Figure 39** : Cinétique de la population bactérienne du genre *Butyrivibrio* au cours des 5 jours de culture dans les quatre milieux (F, FLA, A et ALA)



Les bactéries du genre *Butyrivibrio* se développent de manière importante dans les milieux F, tandis que leur abondance diminue tout au long de la culture dans les milieux A, jusqu'à disparaître presque totalement. La différence d'évolution entre les deux types de milieux observée sur la figure 39 est confirmée par l'analyse statistique ( $p < 0,001$ ).

L'ajout de c9,c12-C18:2 a un effet significatif sur la croissance du genre *Butyrivibrio* ( $p = 0,01419$ ). Dans les milieux FLA, le développement des bactéries est semblable aux milieux F les 58 premières heures de culture, avant de décliner rapidement jusqu'à être quasi nul à la fin de l'expérimentation. Dans les milieux ALA, la population du genre diminue dès le début des cultures et stagne tout au long de l'incubation à une valeur proche de zéro.

A noter que l'abondance du genre *Butyrivibrio* est très faible dans l'inoculum.



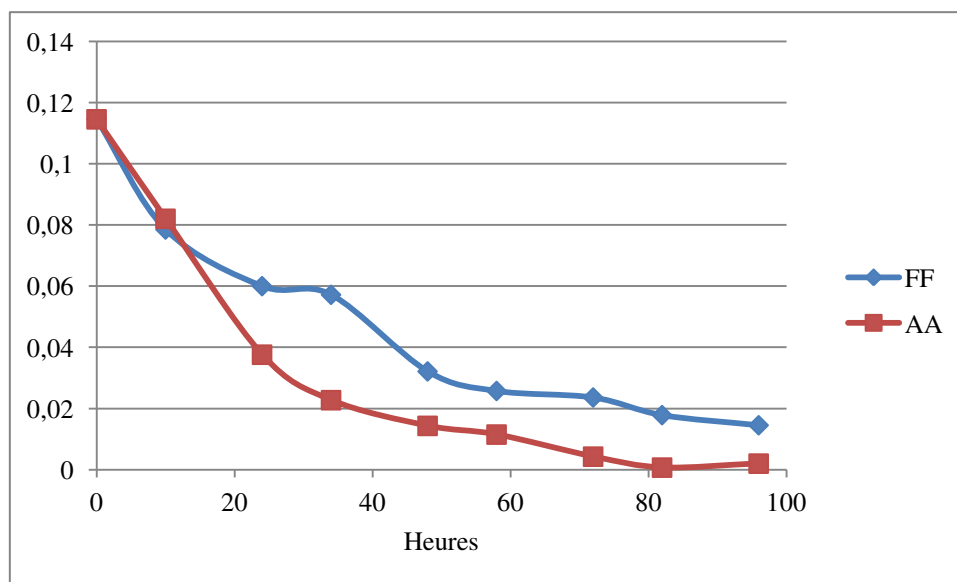
Le genre *Butyrivibrio* regroupe des bactéries fibrolytiques : leur croissance est favorisée lorsque la ration est riche en fibres, notamment en hémicellulose du son, à l'image des milieux F.

D'autre part, les bactéries du genre *Butyrivibrio* possèdent une activité amylolytique, qui reste tout de même minoritaire par rapport à l'activité fibrolytique. Ainsi, elles sont capables de se développer dans les milieux A, mais étant donné leur sensibilité à l'acidité, elles finissent par disparaître lorsque le pH est trop bas (inférieur à 5,5) [103].

Concernant l'ajout de c9,c12-C18:2, Kim *et al* (2000) ont montré que la croissance de cultures pures de *Butyrivibrio fibrisolvens* était inhibée lors de concentrations élevées en c9,c12-C18:2. Les milieux FLA et ALA se caractérisent par une accumulation du c9,c12-C18:2 (i.e. Tableaux 11 et 12). Ainsi, le déclin de la population de *Butyrivibrio* dans les milieux FLA (prématurément par rapport aux milieux F) et la croissance quasi nulle dans les milieux ALA (inférieure par rapport aux milieux A) peut s'expliquer par l'inhibition des bactéries par le c9,c12-C18:2.

- *Christensenellaceae R7 group*

**Figure 40** : Cinétique de la population bactérienne du genre *Christensenellaceae R7 group* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Le genre *Christensenellaceae R7 group* est un des plus représenté dans l'inoculum parmi les genres bactériens mis en évidence.

Tout au long de l'expérimentation, les bactéries du genre *Christensenellaceae R7 group* montrent une diminution de leur population dans les deux types de milieux, plus importante

dans les milieux AA. Cependant, l'analyse statistique met en évidence une différence significative entre les deux types de milieux ( $p < 0,001$ ).

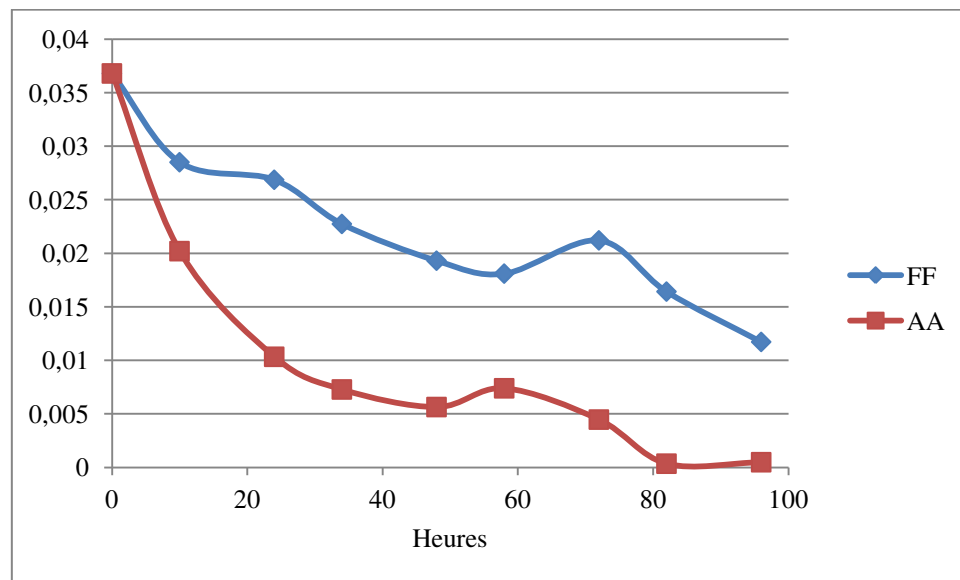
La famille *Christensenellaceae* regroupe des bactéries essentiellement liées à la phase solide du contenu ruminal [50]. Une récente étude confirme les résultats de Jewell *et al* (2015) en montrant que des bactéries de la famille des *Christensenellaceae* sont trouvées adhérentes aux fourrages après incubation dans le rumen, indiquant qu'elles peuvent jouer un rôle important dans la dégradation ruminale des fourrages [76]. Ainsi, du fait de leur présence dans la phase solide du rumen, il est possible que les bactéries du genre *Christensenellaceae R7 group* soient sensibles à la taille des particules alimentaires : la présence de fibres longues est peut être nécessaire à leur croissance, d'où le déclin de la population dans les milieux, en lien avec un broyage trop fin des substrats.

L'étude de Jewell *et al* (2015) a également mis en évidence une corrélation négative entre la famille des *Christensenellaceae* et l'efficacité alimentaire brute chez des vaches laitières. De même, une étude portant sur la flore intestinale de l'Homme montre des variations spécifiques de cette famille bactérienne à la restriction ou à la concentration énergétique de l'aliment. En effet, chez l'Homme, la proportion de *Christensenellaceae* diminue suite à l'apport d'un régime hautement énergétique [61]. Ces deux études tendent à admettre que plus le régime alimentaire montre une efficacité élevée, moins les bactéries appartenant à la famille des *Christensenellaceae* se développent. Or, le broyage a pour conséquence une augmentation du rendement de l'énergie métabolisable de l'aliment. Ainsi, il est possible que l'apport de foin et de son de blé broyés finement dans les milieux diminue le développement du genre *Christensenellaceae R7 group*.

Enfin, très peu d'études portent sur la famille *Christensenellaceae* au sein du microbiote ruminal, sans pour autant négliger leur importance dans la digestion au sein du rumen [75]. Une autre hypothèse probable pour expliquer le déclin de la population dans les deux milieux est la difficulté de maintenir en culture *in vitro* les bactéries de la famille *Christensenellaceae*.

- *Eubacterium*

Figure 41 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Eubacterium* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Le genre *Eubacterium* est présent en faible quantité dans l'inoculum. Néanmoins, la différence d'évolution entre les deux types de milieux est significative d'un point de vue statistique ( $p < 0,001$ ).

Durant la période de culture, la population diminue dans les deux types de milieux (FF et AA). Cette baisse est plus marquée dans les milieux AA : le genre a presque totalement disparu des milieux riches en amidon, alors que son nombre diminue de moitié dans les milieux FF.

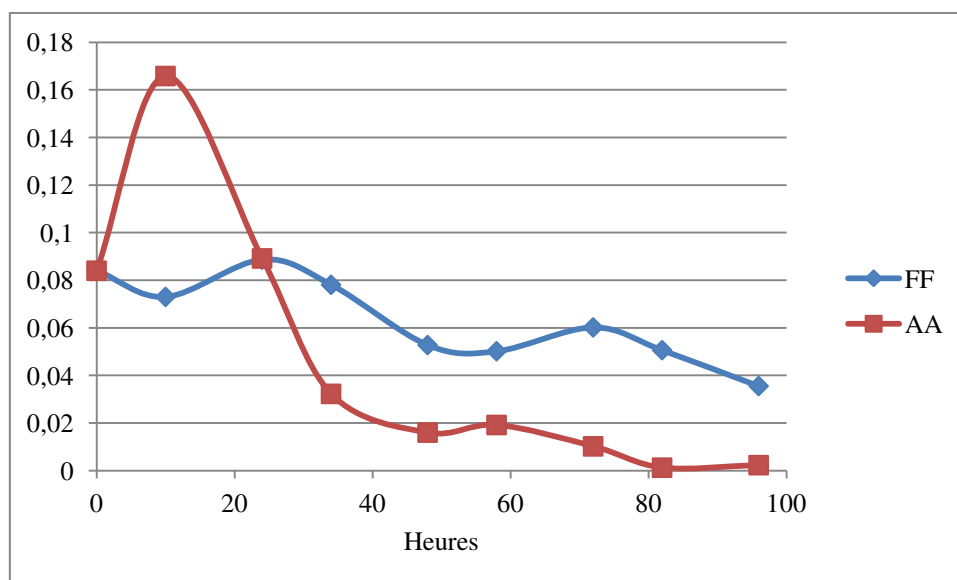
Le genre *Eubacterium* regroupe une espèce acétogène (*E. limosum*) et des bactéries cellulolytiques et hémicellulolytiques (*E. cellulosolvans* et *E. ruminantium*). L'activité fibrolytique du genre explique le fait que la population se maintient dans les milieux FF malgré sa tendance à diminuer.

Selon l'étude de Min *et al* (2006), la culture pure *in vitro* de l'espèce *E. ruminantium* s'accompagne d'une baisse de production de biofilms par la bactérie, en comparaison de sa synthèse de biofilms dans son environnement habituel, le rumen. Il est alors possible que la diminution de la population du genre *Eubacterium* dans les milieux FF soit liée à la moindre production de biofilms. Le phénomène peut dépendre également de la taille des particules. Plus ces dernières seront fines, plus la formation de biofilms sera limitée.

Dans les milieux AA, la chute de la population *Eubacterium* peut s'expliquer en grande partie par la baisse importante de pH. En effet, le genre *Eubacterium* ne présente pas d'acidorésistance. Sharak Genthner et Bryent (1982) ont montré que le pH optimum de croissance de *E. limosum* sur un milieu riche en monoxyde de carbone (CO) est compris entre 7,0 et 7,2. Cette valeur de pH est similaire à celle obtenue lors de culture sur des milieux riches en méthanol ou en H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>. La croissance bactérienne de *E. limosum* est très ralentie en dessous de 6,7 sur les milieux H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> et CO. Par contre, la bactérie est capable de croître à un pH de 5,9 sur un milieu de méthanol. Cependant, étant donné les valeurs de pH inférieures à 5 dans les milieux AA, il est peu probable que les bactéries du genre *Eubacterium* puissent se développer. D'autre part, une autre étude de Sharak Genthner *et al* (1981) a révélé que *E. limosum*, bactérie acétogène du rumen, est capable de fermenter le lactate. Cependant, le C2 est nécessaire pour la croissance de la bactérie à partir d'acide lactique. Ainsi, la diminution de la concentration en C2 dans les milieux AA (i.e. Figure 31) peut expliquer en partie le déclin du genre dans ces milieux.

- *Lachnospira*

**Figure 42** : Cinétique de la population bactérienne du genre *Lachnospira* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Dans les milieux FF, les bactéries du genre *Lachnospira* montre une tendance à diminuer progressivement, jusqu'à atteindre la moitié de leur nombre initial.

Dans les milieux AA, après une croissance rapide les 10 premières heures de culture, l'abondance relative de *Lachnospira* connaît une chute rapide, jusqu'à disparaître presque totalement de la culture.

L'analyse statistique confirme la présence d'une différence significative entre les milieux FF et AA ( $p < 0,01$ ).

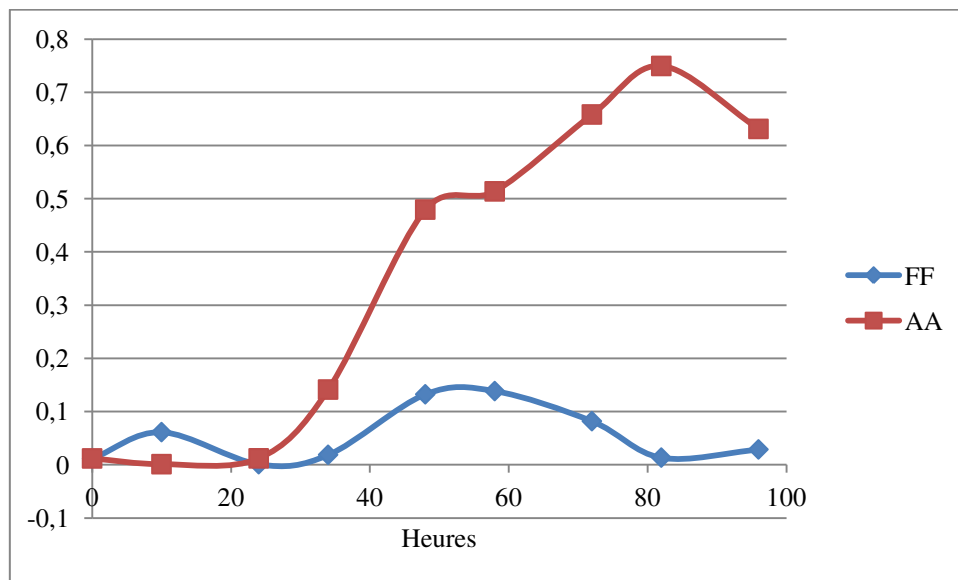
Les bactéries du genre *Lachnospira* sont fibrolytiques, *L. multiparus* étant la principale bactérie pectinolytique du rumen. Le maintien de la population dans les milieux FF s'explique par la capacité du genre *Lachnospira* à dégrader les fibres. Cependant, la diminution de la population dans les milieux FF est difficile à expliquer. Paggi *et al* (2005) ont montré que le développement de *L. multiparus* est inhibé par des concentrations élevées en AGV. En effet, une diminution de la croissance bactérienne est observée pour des concentrations de 100, 200 et 300 mmol/L en C2, et de 50, 100, 200 et 300 mmol/L en C3 et en C4. Une concentration de 50 mmol/L de C2 n'a aucun effet sur la croissance de *L. multiparus*. Cependant, dans les milieux FF, la concentration en AGV n'excède pas 20 mmol/L pour C3 et C4 et 60 mmol/L pour C2 (i.e. Figure 30). Il est alors peu probable que la concentration en AGV soit à l'origine d'une inhibition de *L. multiparus* dans les milieux FF. Par contre, l'étude de Paggi *et al* met en évidence une inhibition de l'activité pectinolytique de *L. multiparus* par le C2 dès la concentration de 50 mmol/L.

Une autre hypothèse peut expliquer la diminution de la population de *Lachnospira* dans les milieux FF : la taille des particules alimentaires dans les milieux. En effet, la famille des *Lachnospiraceae* est plus abondante dans la phase solide du contenu ruminal par rapport à la phase liquide [46]. L'augmentation de la population de *Lachnospiraceae* au sein de la phase solide du rumen, rapportée par deux autres études plus récentes [21, 69], suggère une importance de la taille des particules alimentaires pour le développement de la famille. Ainsi, il est possible que les bactéries du genre *Lachnospira* aient besoin de fibres longues sur lesquelles s'adhérer pour croître. Le broyage fin du foin grossier et du son de blé dans les milieux FF pourrait alors participer à la diminution de la population dans ces milieux.

Le déclin de la population dans les milieux AA est corrélée avec le manque de substrat à base de fibres et la baisse très importante du pH à l'origine de la disparition des bactéries fibrolytiques.

- *Lactobacillus*

Figure 43 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Lactobacillus* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Les lactobacilles sont très peu nombreux dans l'inoculum.

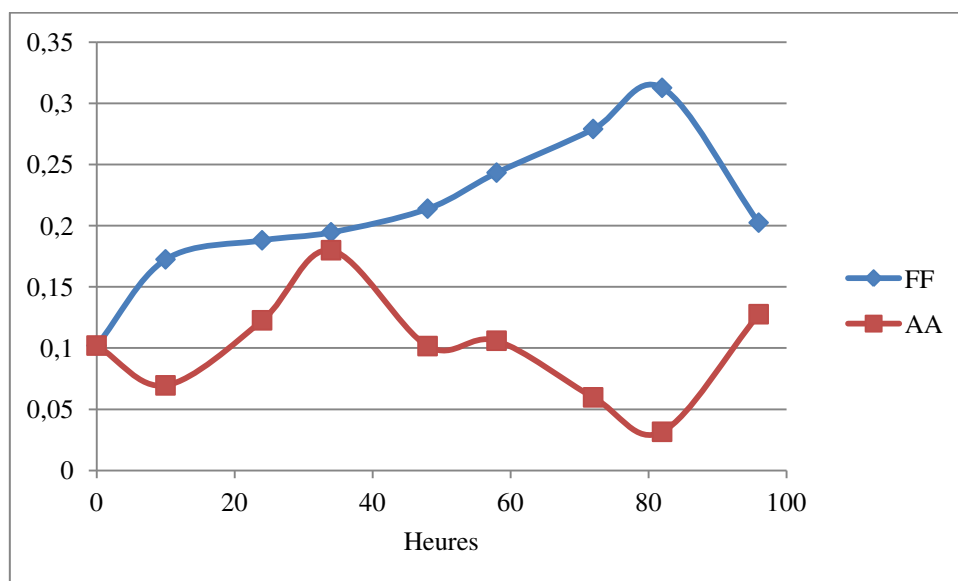
Dans les milieux FF, leur développement reste limité. A contrario, leur croissance est très élevée dans les milieux AA tout au long de l'incubation, à l'exception du dernier prélèvement révélant une légère baisse de l'abondance de lactobacilles. Les bactéries du genre *Lactobacillus* sont la population prédominante dans les milieux AA.

L'analyse statistique montre une différence significative de la croissance des lactobacilles entre les milieux FF et AA ( $p < 0,001$ ).

La croissance importante des lactobacilles dans les milieux AA est à corrélérer avec l'évolution du pH. En effet, les phénomènes qui se sont déroulés au sein des milieux AA au cours des 5 jours de culture sont semblables à une acidose lactique, tant au niveau physico-chimique que du microbiote. La baisse importante de pH a sélectionné les bactéries acido-résistantes, dont les lactobacilles. Le genre *Lactobacillus* est connu pour résister à des pH très acides : il est capable de continuer de croître à un pH inférieur à 5. Roque (1991) a rapporté qu'à des valeurs de pH extrêmement faibles, la population bactérienne est quasiment réduite à une monoculture de lactobacilles. Ainsi, les conditions physico-chimiques expliquent le développement du genre *Lactobacillus* dans les milieux AA.

- Prevotella

Figure 44 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Prevotella* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Les milieux FF ont permis la croissance du genre *Prevotella* : la population a triplé au bout de 82 heures de culture. Lors du dernier prélèvement, une baisse de 30% de l'abondance de *Prevotella* est observée.

La cinétique de la population de *Prevotella* est plus irrégulière dans les milieux AA. Après un pic de croissance à 34 heures de culture, la quantité de bactéries du genre *Prevotella* diminue. Enfin, au dernier prélèvement, la population augmente, de l'ordre de l'abondance initiale dans l'inoculum.

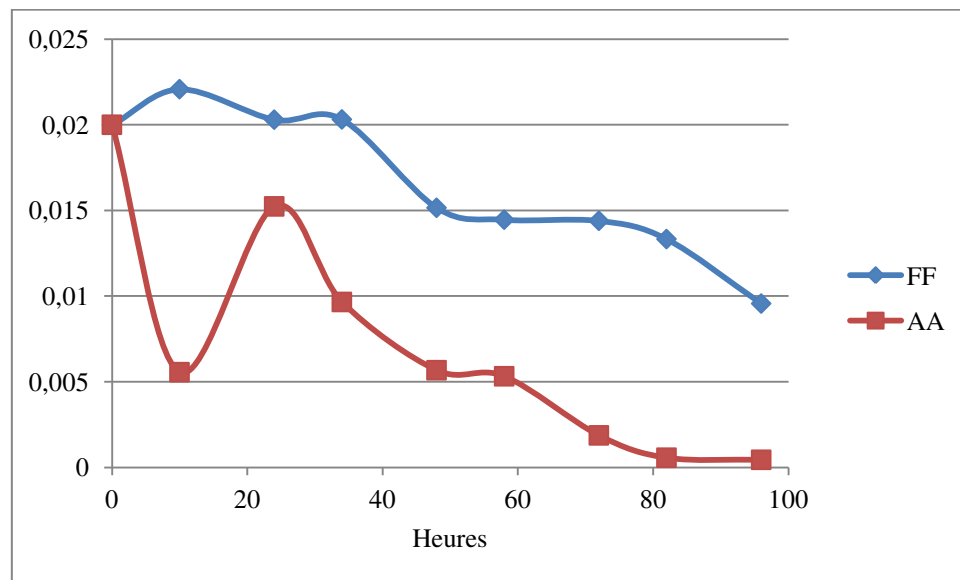
La différence de cinétique du genre *Prevotella* entre les milieux FF et AA est significative d'un point de vue statistique ( $p < 0,001$ ).

La bactérie *P. ruminicola* est une espèce particulièrement ubiquiste : elle est retrouvée en grand nombre à partir de régimes très différents. Elle se caractérise par une diversité d'activités métaboliques. En effet, elle est capable de dégrader l'amidon, son principal substrat, ainsi que l'hémicellulose, la pectine et les sucres simples. Elle joue également un rôle majeur dans le métabolisme des protéines et des peptides dans le rumen. Au final, elle comptabilise une quinzaine de substrats carbonés.

Ainsi, le genre *Prevotella* persiste dans les deux types de milieux (FF et AA) du fait de sa capacité à dégrader les divers substrats, notamment le son de blé et l'amidon. L'irrégularité de croissance dans les milieux AA peut s'expliquer par les valeurs très faibles de pH. En effet, *P. ruminicola* est capable de croître à pH bas, mais son développement est ralenti.

- Prevotellaceae UCG

Figure 45 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Prevotellaceae UCG* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Dans les deux types de milieux (FF et AA), la population du genre *Prevotellaceae UCG* diminue progressivement durant les 5 jours de culture. Cette baisse est plus marquée dans les milieux AA, où le genre tend à disparaître, alors que son abondance diminue de moitié dans les milieux FF. Cette différence est confirmée statistiquement ( $p < 0,001$ ).

A noter que le genre *Prevotellaceae UCG* est présent en faible quantité dans l'inoculum.

Très peu de données existent sur le genre *Prevotellaceae UCG*, du fait que les bactéries du genre ne soient pas cultivables, d'où la diminution dans les cultures.

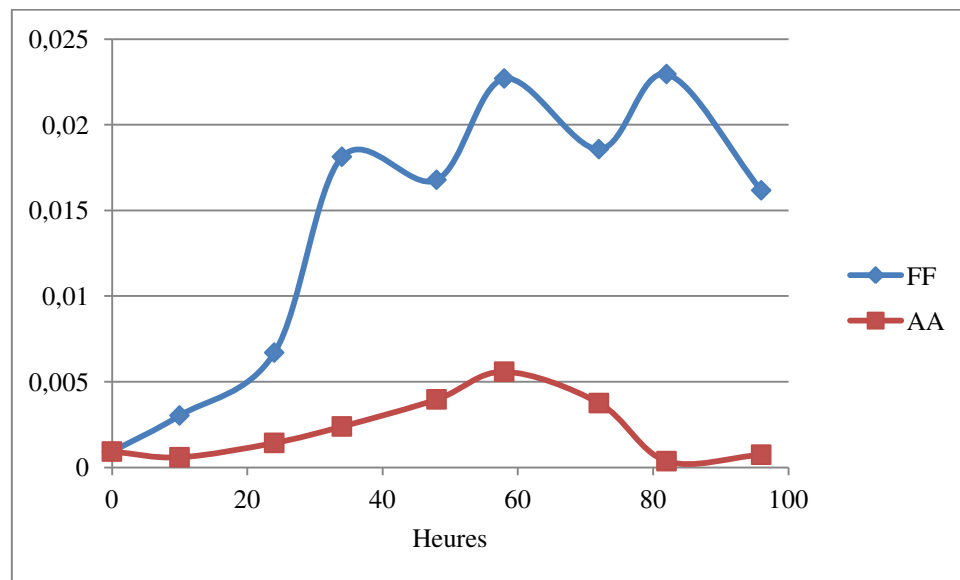
A l'image de *P. ruminicola*, il est probable que le genre *Prevotellaceae UCG* possède un panel d'activités métaboliques, notamment vis-à-vis des glucides pariétaux et de l'amidon. En effet, la persistance de la population dans les milieux FF peut indiquer une activité fibrolytique. L'étude de Liu *et al* (2016) confirme le métabolisme des glucides pariétaux par des bactéries de la famille des *Prevotellaceae*, suite à l'observation de bactéries fermement adhérentes aux fourrages après incubation dans le rumen.

D'autre part, dans les milieux AA, malgré la diminution de l'abondance de bactéries du genre, la population est toujours présente en très faible quantité durant les 60 premières heures de culture. Le phénomène peut suggérer une activité amylolytique, ainsi qu'une acido-résistance modérée.



- *Pseudobutyrvibrio*

Figure 46 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Pseudobutyrvibrio* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Le genre *Pseudobutyrvibrio* est présent en très faible quantité dans l'inoculum. Même si la population maintient une abondance faible, la cinétique est caractérisée par des modifications relativement importantes, et significativement différentes entre les deux types de milieux ( $p < 0,001$ ). En effet, alors que le genre *Pseudobutyrvibrio* est presque nul dans l'inoculum, il montre une croissance très importante dans les milieux FF : sa quantité a été multipliée par 25 en 82 heures de culture.

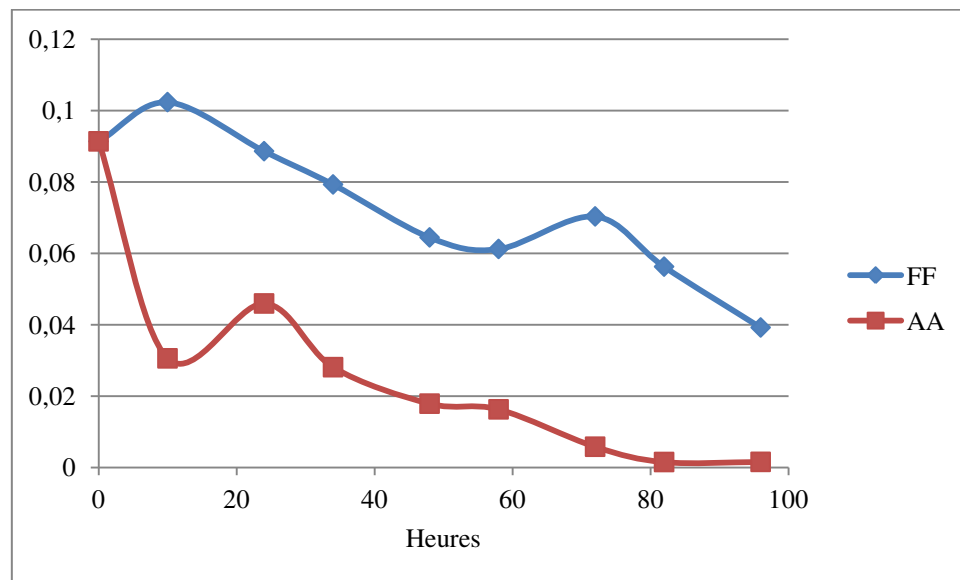
Dans les milieux AA, le genre *Pseudobutyrvibrio* manifeste un développement plus limité par rapport aux milieux FF, qui atteint son maximum à 58 heures d'incubation avant de diminuer jusqu'à l'abondance initiale.

Dans le rumen, le genre *Pseudobutyrvibrio* est essentiellement représenté par deux espèces : *P. ruminis* et *P. xylanivorans*. Dans l'étude de Van Gylswyk *et al* (1996), *P. ruminis* montre des similitudes avec *B. fibrisolvans*, tant d'un point de génétique (89,2% de similitude suite au séquençage de l'ADNr 16S), que d'un point de vue phénotypique, à la différence que *P. ruminis* ne dégrade pas le xylane ni l'amidon, et ne présente pas d'activité protéolytique.

Ainsi, le faible développement du genre *Pseudobutyrvibrio* dans les milieux AA peut s'expliquer par son incapacité à dégrader l'amidon, ainsi que le lactate d'après la même étude. D'autre part, Van Gylswyk *et al* (1996) ont montré que *P. ruminis* est capable de fermenter la cellobiose. Son activité fibrolytique peut être à l'origine de la croissance du genre dans les milieux FF.

- *Rikenellaceae RC9 gut group*

Figure 47 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Rikenellaceae RC9 gut group* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Dans les deux types de milieux (FF et AA), le genre *Rikenellaceae RC9 gut group* diminue en abondance. Cette baisse est plus marquée dans les milieux AA. En effet, la population de *Rikenellaceae RC9 gut group* se divise de moitié dans les milieux FF alors qu'elle tend à disparaître totalement dans les milieux AA.

L'analyse statistique révèle une différence significative de l'évolution du genre *Rikenellaceae RC9 gut group* entre les deux types de milieux ( $p < 0,001$ ).

Très peu de données existent sur le genre *Rikenellaceae RC9 gut group*, du fait que les bactéries du genre ne sont pas cultivables, d'où leur diminution dans les cultures.

La famille des *Rikenellaceae* est communément retrouvée dans le tractus digestif des mammifères. Concernant les Bovins, l'étude de Kong *et al* (2010) a révélé la présence de la famille bactérienne uniquement dans le tube digestif de vaches nourries avec une ration à base de triticales. Une autre étude [99] a montré une augmentation de la famille des *Rikenellaceae* suite à une simulation d'une situation d'acidose chez des génisses, alors que cette famille était jusqu'à présent retrouvée lors de régime riche en fourrages. La fonction métabolique et le rôle des *Rikenellaceae* restent encore à définir, même si l'étude de Liu *et al* (2016) suggère un rôle important dans la dégradation des fourrages dans le rumen.

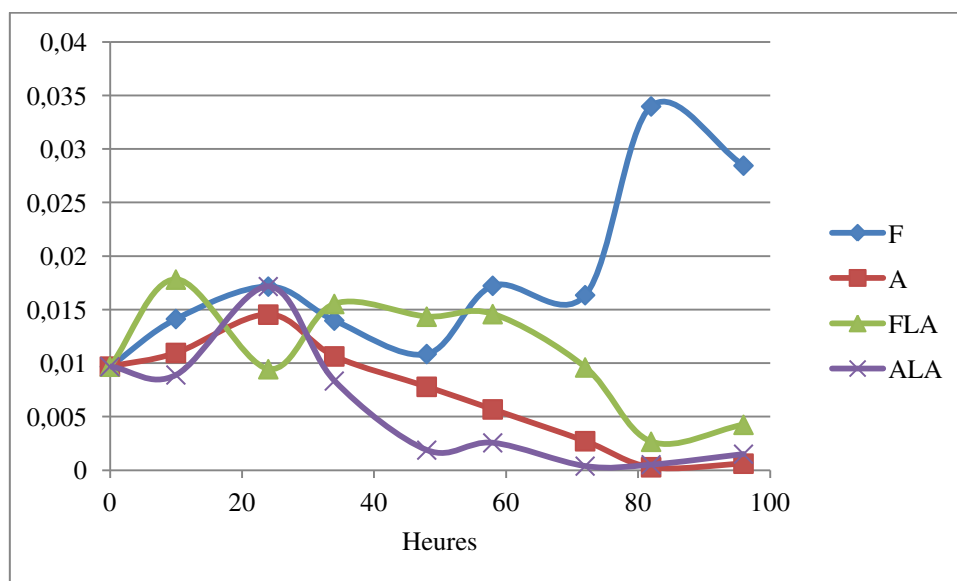
Appartenant à l'ordre des Bacteroidales, tout comme la famille des *Prevotellaceae*, il est probable que la famille des *Rikenellaceae* soit également dotée d'une polyvalence métabolique. Le maintien de la population dans les milieux FF suggère une activité

fibrolytique, en accord avec l'étude de Liu *et al* (2016). D'autre part, même si le genre *Rikenellaceae RC9 gut group* finit par disparaître dans les milieux AA, il est possible qu'il possède une activité amylolytique.

Le déclin de la population du genre *Rikenellaceae RC9 gut group* observé dans les milieux riches en amidon est en accord avec les résultats de l'étude de Zened *et al* (2012a). Il peut être dû à sa sensibilité au pH acide, même si l'étude de Zhang *et al* (2017) a montré une persistance de la famille *Rikenellaceae* à un pH de 5,5, suggérant une acido-résistance modérée. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur la sensibilité de la famille bactérienne à des valeurs de pH inférieures. Le pH des milieux AA est inférieur à 5,5 dès la dixième heure de culture, et il se maintient en dessous de 4,9 à partir de 24 heures d'incubation. Ainsi, il est probable que le genre *Rikenellaceae RC9 gut group* décroît fortement dans les milieux AA à cause d'un pH trop faible, malgré une acido-résistance modérée.

- *Ruminoclostridium*

**Figure 48** : Cinétique de la population bactérienne du genre *Ruminoclostridium* au cours des 5 jours de culture dans les quatre milieux (F, FLA, A et ALA)



Malgré des abondances très faibles, les bactéries du genre *Ruminoclostridium* montrent une cinétique intéressante. En effet, la population bactérienne augmente dans les milieux F, plus particulièrement à partir de 72 heures de culture, alors que le genre *Ruminoclostridium* connaît une décroissance rapide dans les milieux A à partir de 24 heures de culture.

La différence d'évolution entre les deux types de milieux (F et A) observée sur la figure 48 est significative ( $p < 0,001$ ).

L'ajout de c9,c12-C18:2 semble avoir peu d'effet dans les milieux ALA puisque la croissance du genre *Ruminoclostridium* est similaire dans les milieux A et ALA. Cependant, la différence d'évolution est significative entre les milieux F et FLA ( $p < 0,01$ ). Entre 58 et 82 heures de culture, le genre *Ruminoclostridium* décline dans les milieux FLA, alors qu'il connaît une croissance rapide dans les milieux F.

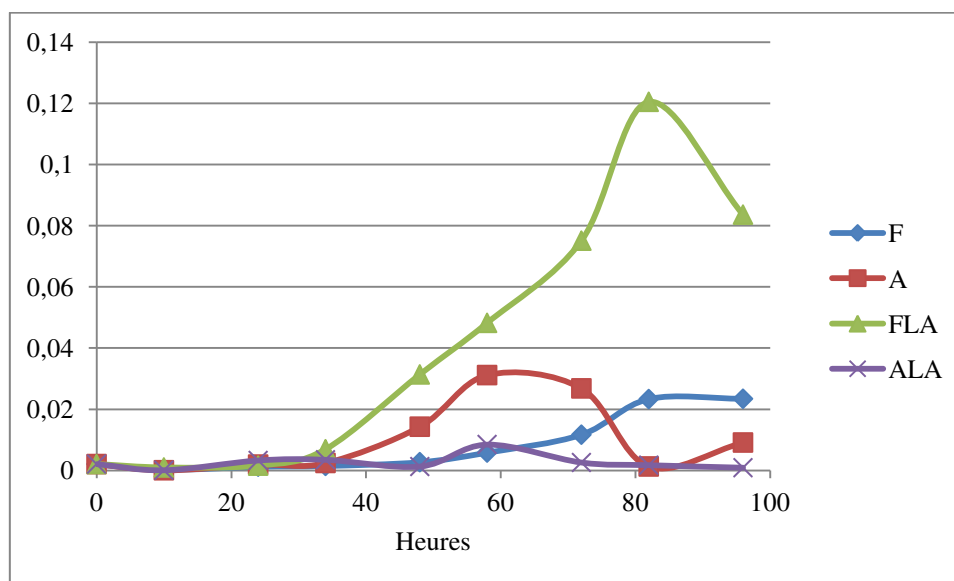
Le genre *Ruminoclostridium* regroupe des bactéries cellulolytiques, d'où leur croissance dans les milieux F. Par ailleurs, la disparition du genre dans les milieux A s'explique par l'absence de substrat à base de fibres nécessaires à leur développement, et par la chute importante du pH. En effet, les bactéries du genre *Ruminoclostridium* ne se développent plus en dessous d'un pH de 6,2 [42].

Dans les milieux FLA, la diminution de l'abondance relative du genre *Ruminoclostridium* est probablement liée à l'accumulation de c9,c12-C18:2 (i.e. Tableau 11). L'étude de Yang *et al* (2009) menée *in vivo* a montré un impact limité de l'addition d'huile dans la ration sur les bactéries fibrolytiques du rumen, malgré une diminution de leur population. Bien que le genre *Ruminoclostridium* n'a pas été étudié spécifiquement, il est possible qu'il montre une sensibilité à des concentrations élevées en c9,c12-C18:2 lors de culture *in vitro*, à l'image d'autres bactéries fibrolytiques [58, 140].

Dans les milieux ALA, la croissance du genre *Ruminoclostridium* est similaire aux milieux A, à part que la décroissance de la population est plus rapide dans les milieux supplémentés en c9,c12-C18:2. Une diminution de l'abondance relative de la famille *Ruminococcaceae* a déjà été mise en évidence dans des milieux riches en amidon et en huile de tournesol [146].

- Ruminobacter

Figure 49 : Cinétique de la population bactérienne du genre *Ruminobacter* au cours des 5 jours de culture dans les quatre milieux (F, FLA, A et ALA)



Le genre *Ruminobacter* est présent en très faible quantité dans l'inoculum. Au-delà de 34 heures de culture, la population croît dans tous les milieux.

La croissance est plus rapide dans les milieux A par rapport aux milieux F. Elle atteint un pic à 58 heures d'incubation, avant de diminuer pour atteindre une valeur proche de l'abondance initiale dans l'inoculum.

Dans les milieux F, la croissance du genre *Ruminobacter* est plus limitée par rapport aux milieux A. En effet, elle est plus étalée dans le temps et n'atteint son maximum qu'à 82 heures culture.

L'ajout de c9,c12-C18:2 entraîne un faible développement du genre *Ruminobacter* dans les milieux ALA. Par contre, il a un effet inverse dans les milieux FLA : la croissance de la population est potentialisée en présence de c9,c12-C18:2 puisqu'à 82 heures de culture, l'abondance relative du genre *Ruminobacter* est presque 60 fois supérieure à celle de l'inoculum.

En général, le genre *Ruminobacter* est présent en nombre réduit dans le rumen. Il est représenté par l'espèce *R. amylophilus*, dont le principal substrat est l'amidon ainsi que le maltose. L'étude de Chen *et al* (2011) a montré que les bactéries du genre *Ruminobacter* sont associées à l'épithélium ruminal et que l'augmentation de leur nombre résulte de l'adaptation à une ration riche en concentrés. *R. amylophilus* peut représenter jusqu'à 10% du microbiote

bactérien ruminal [5]. Le profil métabolique du genre explique son développement dans les milieux A riches en amidon. Cependant, la population de *Ruminobacter* montre une croissance très faible avant 40 heures d'incubation. Le faible développement les deux premiers jours de culture peut s'expliquer par le temps d'adaptation à un nouveau substrat, d'autant plus que le genre était très peu présent dans l'inoculum. Par ailleurs, la diminution de la population de *Ruminobacter* observée après 72 heures de culture peut s'expliquer par sa sensibilité au pH très faible, suggérée par une légère reprise de la croissance lorsque le pH des milieux A remonte à la fin de l'expérimentation. D'autre part, *R. amylophilus* est difficile à étudier et à cultiver en dehors de son environnement naturel, le rumen, et la présence de la bactérie présente une variabilité individuelle [39].

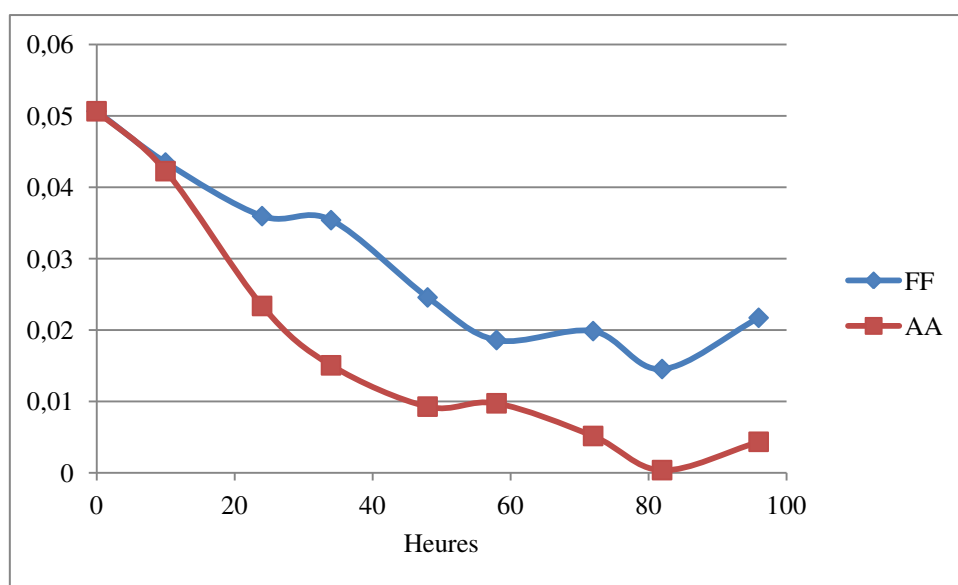
Dans les milieux F, le genre *Ruminobacter* connaît une croissance plus limitée, mais relativement stable entre les deux derniers prélèvements. Le milieu F est plutôt destiné à sélectionner les bactéries fibrolytiques. Néanmoins, il apporte de l'amidon (via le son) et il pourrait exister une interaction entre *R. amylophilus* et des bactéries fibrolytiques, à l'image de *S. ruminantium* et *F. succinogenes*. En effet, Scheifinger et Wolin (1973) ont montré que *S. ruminantium* est capable de se développer en co-culture avec *F. succinogenes* sur un milieu composé de cellulose comme unique source de carbone, alors que *S. ruminantium* est capable de dégrader uniquement l'amidon et les sucres simples. Ce résultat suggère que les produits issus de la dégradation de la cellulose sont mis à disposition pour être utilisés par *S. ruminantium*. Un phénomène similaire peut exister pour *R. amylophilus*, ce qui permettrait son développement dans des milieux riches en fibres. D'autre part, la croissance du genre *Ruminobacter* peut également s'expliquer en partie par la présence de caséine : *R. amylophilus* possède une protéase très active.

Dans les milieux FLA, le genre *Ruminobacter* connaît une croissance très rapide à partir de 34 heures de culture, alors qu'il ne se développe pas dans les milieux ALA, pourtant riches en amidon. D'après l'étude de Maia *et al* (2007), la supplémentation en c9,c12-C18:2 aurait un effet délétère sur la croissance de *R. amylophilus*. En effet, une concentration de 50 µg/mL de c9,c12-C18:2 entraîne une perte d'intégrité membranaire de plus de 72% des bactéries de l'espèce. De plus, 50% de la population de *R. amylophilus* meurt dans un milieu contenant 200 µg/mL de c9,c12-C18:2, 24% pour une concentration de 50 µg/mL. Or, à J5, les milieux ALA ont une concentration moyenne en c9,c12-C18:2 de 693 µg/mL, plus de trois fois supérieure à la concentration maximale évaluée dans l'étude de Maia *et al* (2007). Ainsi, outre une sensibilité probable au pH acide, l'absence de croissance du genre *Ruminobacter* dans les milieux ALA peut s'expliquer par la concentration très élevée en c9,c12-C18:2, due à l'accumulation de ce dernier durant l'expérimentation.

Cependant, l'ajout de c9,c12-C18:2 dans les substrats riches en fibres ne montre pas de répercussion négative sur le développement du genre *Ruminobacter*. Au contraire, sa croissance est accentuée dans les milieux FLA par rapport aux milieux F, et elle est même supérieure par rapport aux milieux A riches en amidon. A J5, la concentration moyenne en c9,c12-C18:2 dans les milieux FLA est de 315 µg/mL. Une diminution de la population du genre serait alors attendue. La discordance entre les résultats obtenus dans notre expérimentation et l'étude de Maia *et al* (2007) suggère une différence de comportement des bactéries, en culture pure et en culture avec d'autres bactéries. Des interactions entre diverses espèces bactériennes pourraient permettre au genre *Ruminobacter* de croître dans des milieux riches en c9,c12-C18:2.

- *Ruminococcaceae NK4A214*

**Figure 50** : Cinétique de la population bactérienne du genre *Ruminococcaceae NK4A214* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



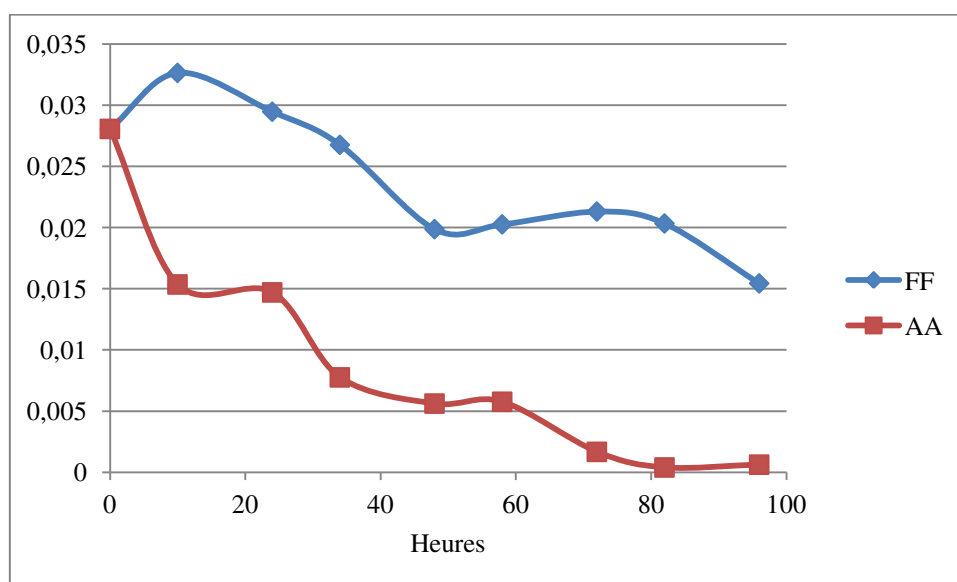
Le genre *Ruminococcaceae NK4A214* montre une cinétique semblable dans les deux types de milieux (FF et AA). En effet, la population diminue progressivement jusqu'à 82 heures de culture, avant de remonter légèrement au dernier prélèvement. La diminution de l'abondance de *Ruminococcaceae NK4A214* est plus marquée dans les milieux AA par rapport aux milieux FF. Cette différence est significative d'un point de vue statistique ( $p < 0,001$ ).

Très peu de données existent sur le genre *Ruminococcaceae NK4A214*, du fait que les bactéries du genre ne soient pas cultivables, d'où leur diminution dans les cultures.

Dans l'étude de Petri *et al* (2013), la famille des *Ruminococcaceae* est retrouvée dans le microbiote ruminal lors de ration riche en fourrages. D'autre part, Liu *et al* (2016) ont montré que des bactéries non classifiées de la famille des *Ruminococcaceae* sont trouvées fortement adhérentes aux particules issues des fourrages après incubation dans un rumen. Les deux études permettent d'expliquer la persistance de la population plus importante dans les milieux FF par rapport aux milieux AA, puisque les milieux FF sont plus riches en fibres. La diminution progressive dans les deux types de milieux peut être due à la difficulté de cultiver cette famille bactérienne.

- *Ruminococcaceae UCG*

**Figure 51** : Cinétique de la population bactérienne du genre *Ruminococcaceae UCG* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Le genre *Ruminococcaceae UCG* montre une cinétique similaire dans les deux types de milieux (FF et AA). En effet, la population diminue progressivement tout au long de la culture. Néanmoins, la diminution de l'abondance relative de *Ruminococcaceae UCG* est plus rapide dans les milieux AA par rapport aux milieux FF : la population a presque totalement disparu dans les milieux AA, alors qu'elle est divisée de moitié dans les milieux FF. L'analyse statistique confirme la différence d'évolution de la population entre les deux types de milieux ( $p < 0,001$ ).

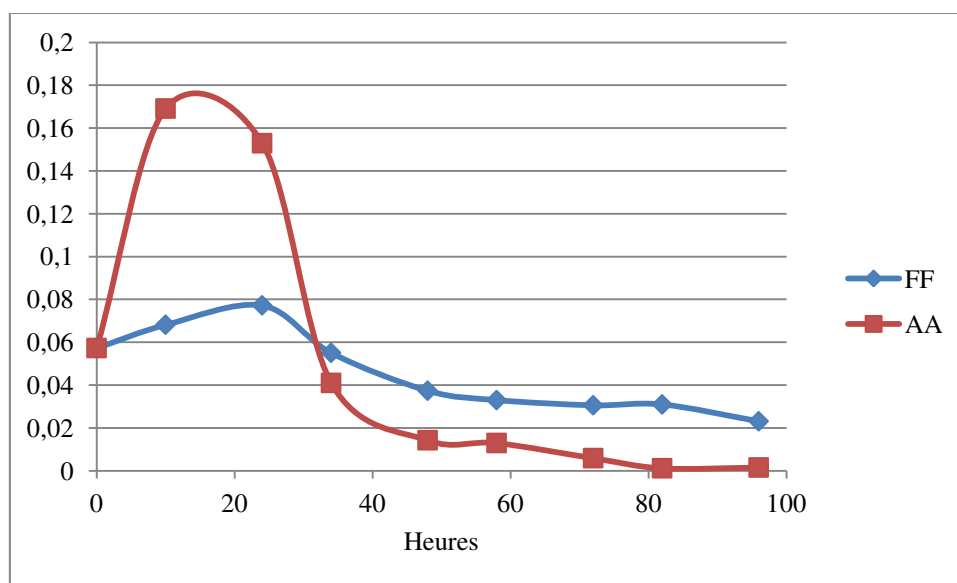
Très peu de données existent sur le genre *Ruminococcaceae UCG*, du fait que les bactéries du genre ne soient pas cultivables, d'où leur diminution dans les cultures.



La compréhension de la cinétique du genre *Ruminococcaceae UCG* est similaire au genre *Ruminococcaceae NK4A214*. En effet, les deux genres appartiennent à la même famille. Ainsi, les études de Petri *et al* (2013) et de Liu *et al* (2016) peuvent suggérer une prédilection du genre *Ruminococcaceae UCG* pour le métabolisme des glucides pariétaux, d'où son maintien prolongé dans les milieux FF par rapport aux milieux AA.

- *Ruminococcus*

**Figure 52** : Cinétique de la population bactérienne du genre *Ruminococcus* au cours des 5 jours de culture dans les deux types de substrats (FF et AA)



Dans les milieux FF, le genre *Ruminococcus* diminue progressivement.

Dans les milieux AA, la population montre une phase de croissance importante le premier jour de culture. Par la suite, le genre décroît fortement, jusqu'à disparaître à hauteur de 99% par rapport à la quantité maximale.

L'analyse statistique ne montre pas de différence significative entre les deux types de milieux ( $p=0,06449$ ), mais  $p$  est tout de même compris entre 0,05 et 0,1.

Le genre *Ruminococcus*, représenté essentiellement par deux espèces : *R. flavefaciens* et *R. albus*, est connu pour son activité fibrolytique importante. Son profil métabolique explique la persistance de la population dans les milieux FF. Cependant, nous pouvons nous attendre à une croissance du genre *Ruminococcus* dans les milieux riches en fibres, à l'image des genres *Butyrivibrio* et *Pseudobutyrvibrio*. Or, la population a tendance à diminuer. Koike et Kobayashi (2009) suggèrent que les principales espèces bactériennes fibrolytiques connues (i.e. *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* et *R. albus*) ne représentent qu'une faible proportion de

la population fibrolytique du rumen, et que les bactéries non cultivables seraient responsables de la majeure partie de la digestion ruminale des glucides pariétaux. D'autre part, la diminution du genre *Ruminococcus* dans les milieux FF peut s'expliquer par des phénomènes de compétition entre bactéries fibrolytiques. En effet, Odenyo *et al* (1994) ont étudié les compétitions entre les bactéries fibrolytiques grâce au séquençage de l'ARNr 16S. Leurs résultats ont montré que sur une culture simultanée des deux espèces de *Ruminococcus*, la croissance de *R. flavefaciens* est inhibée au profit de *R. albus* : la bactérie n'est plus détectée au-delà de 48 heures de culture. D'autre part, lors d'une tri-culture des trois principales espèces fibrolytiques, *R. flavefaciens* est inhibée, *R. albus* est dominante jusqu'à 48 heures de culture, puis *F. succinogenes* devient l'espèce la plus abondante à partir de 60 heures de culture. Cette étude suggère que malgré un milieu riche en fibres, une croissance importante des bactéries fibrolytiques n'est pas systématiquement observée du fait de phénomène de compétition entre les différentes espèces utilisant le même substrat.

Dans les milieux AA, le pic de croissance observé durant les 20 premières heures de culture suggère une activité amylolytique d'une ou plusieurs espèces du genre *Ruminococcus*. Bien qu'à notre connaissance, aucune étude n'ait mis en évidence des bactéries ruminales amylolytiques au sein du genre *Ruminococcus*, l'espèce *Ruminococcus bromii* est une des bactéries les plus efficaces pour dégrader l'amidon dans le côlon de l'Homme [143]. Il est alors probable que des espèces du genre présentes dans le rumen possèdent également une activité amylolytique.

La chute brutale de la population après le pic s'explique par les valeurs très basses du pH : le genre *Ruminococcus* est sensible au pH acide, et ne survit pas à des valeurs de pH inférieures à 5,5.

## **2.5. Corrélations**

### **2.5.1. Entre microbiote et pH**

Une corrélation positive est mise en évidence entre le pH et plusieurs genres bactériens : *Acetivomaculum*, *Bifidobacterium*, *Christensenellaceae R7 group*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Prevotellaceae UCG*, *Pseudobutyrvibrio* et *Ruminococcus*.

Les genres *Acetivomaculum*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Pseudobutyrvibrio* et *Ruminococcus* regroupent des bactéries fibrolytiques. De même, les familles *Christensenellaceae* et *Prevotellaceae* comportent des bactéries à activité fibrolytique, comme le suggère l'étude de Liu *et al* (2016). L'activité métabolique de ces bactéries explique la corrélation positive avec

le pH : elles se multiplient préférentiellement à des valeurs de pH ruminal proche de la neutralité.

Pour le genre *Bifidobacterium*, la corrélation positive avec le pH est liée à l'augmentation de l'abondance du genre lors de la hausse, même faible, du pH dans les milieux AA (i.e. Figures 28 et 38). Au sein du genre *Bifidobacterium*, seule l'espèce *B. thermoacidophilum* est capable de se développer à un pH inférieur à 4,5. Pour des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 6, les autres espèces de *Bifidobacterium* présentent une croissance, même si elle est ralentie. Ainsi, l'abondance relative des bactéries du genre varie en fonction du pH : un pH élevé est favorable à un plus grand nombre d'espèces du genre *Bifidobacterium*, et inversement.

Par contre, une corrélation négative est révélée entre le pH et le genre *Lactobacillus*.

Les lactobacilles sont des bactéries productrices de lactate. Dans le rumen, la synthèse d'acide lactique entraîne une baisse du pH, d'où la corrélation négative observée. La production de lactate peut amener à une acidose lactique ruminale lorsque ce dernier est libéré en quantité importante.

### **2.5.2. Entre microbiote et production d'acide gras volatils**

Seules les productions de C2 et de C3 seront étudiées dans cette partie, puisqu'aucune corrélation nette n'est mise en évidence entre la production de C4 et un genre bactérien. Pourtant, une légère augmentation du C4 a été observée au cours des cultures dans les milieux FF (i.e. Figure 30), probablement liée à la croissance de bactéries fibrolytiques productrices de C4, telle que *B. fibrisolvans*. L'absence de corrélation entre le genre *Butyrivibrio* et le C4 peut s'expliquer par le fait que la hausse du C4 soit trop faible pour être significative ou par le fait que le C4 soit produit par d'autres bactéries que *B. fibrisolvans*, qui n'ont pas été mises en évidence lors de l'analyse du microbiote.

- **Production de C2**

Une corrélation positive existe entre la production de C2 et les genres bactériens suivants : *Acetitomaculum*, *Butyrivibrio*, *Christensenellaceae R7 group*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Prevotellaceae UCG*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, *Ruminoclostridium*, *Ruminococcaceae UCG* et *Ruminococcus*.

Les genres *Acetitomaculum*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Ruminoclostridium* et *Ruminococcus* regroupent des bactéries fibrolytiques, ainsi que les familles

*Christensenellaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae* et *Ruminococcaceae* [76]. La dégradation des glucides pariétaux conduit essentiellement à la formation de C2, d'où la corrélation positive entre les bactéries fibrolytiques et la production de C2.

L'expérience met en évidence une corrélation négative entre la production de C2 et les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*.

Dans les milieux AA, le genre *Lactobacillus* montre une croissance très importante, alors que la concentration en C2 chute rapidement, d'où la corrélation négative entre les deux éléments. Les bactéries du genre *Bifidobacterium* synthétisent du C2 et du lactate suite à la dégradation de l'amidon. Le ratio lactate/C2 produits dépend de l'espèce bactérienne : il varie entre 1,3 et 1,5 [84]. Ainsi, les bactéries du genre produisent préférentiellement du C2. Pourtant, la corrélation entre le genre *Bifidobacterium* et la production de C2 est négative. Le phénomène est lié à l'activité amylolytique des bactéries. En effet, dans les milieux FF où le C2 est majoritairement produit, le genre *Bifidobacterium* est présent en très faible quantité. A contrario, il connaît une croissance importante dans les milieux AA riches en amidon, dans lesquels une chute de la concentration en C2 est observée. Ainsi, la corrélation négative mise en évidence ne concerne pas la production de C2 par le genre *Bifidobacterium*, mais elle indique que la croissance du genre est plus importante dans les milieux AA alors que la concentration en C2 y est plus faible. Le phénomène est dû aux conditions de culture établies par notre protocole : les milieux AA riches en amidon ne favorisent pas la production importante de C2, qui est essentiellement issu de la dégradation des glucides pariétaux. Par contre, ils permettent le développement du genre *Bifidobacterium*, de part son activité amylolytique et l'acido-résistance de certaines espèces. De ce fait, la production de C2 et la croissance du genre *Bifidobacterium* évolue en sens inverse dans les milieux AA, mais il est fortement probable qu'il n'existe pas de lien causal entre les deux phénomènes.

- Production de C3

La production de C3 est corrélée positivement avec plusieurs genres bactériens : *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Prevotellaceae* UCG, *Pseudobutyrvibrio* et *Ruminococcus*.

La majorité du C3 est synthétisée suite à l'hydrolyse de l'amidon. Plusieurs études [2, 119] ont montré que la quantité de C3 produit augmente de manière importante lorsque les vaches sont nourries avec une ration pauvre en fourrages et/ou riche en céréales.

Les genres montrant une corrélation positive avec la production de C3 sont essentiellement fibrolytiques, et de ce fait, ils produisent en majorité du C2. La corrélation vient peut être

d'une concordance entre une augmentation de la production de C3 et une croissance de ces genres dans les milieux FF, alors que tout est inhibé dans les milieux AA. Dans les milieux FF, les genres *Eubacterium* et *Lachnospira* montre un léger pic de croissance à 72 heures de culture. En parallèle, la concentration de C3 augmente légèrement au même moment. Un pic de croissance est également observé à 58 heures d'incubation dans les milieux FF pour le genre *Pseudobutyrvibrio*.

A l'image de la production de C2, une corrélation négative est révélée entre la production de C3 et les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*.

L'explication est similaire à celle de la corrélation négative des deux genres avec la production de C2. En effet, les deux genres se multiplient de manière plus notable dans les milieux AA, alors que la concentration en C3 y est plus faible par rapport aux milieux FF. Le phénomène est d'autant plus marqué que les bactéries du genre *Bifidobacterium* ne produisent pas de C3, malgré leur activité amylolytique [84]. Comme expliqué dans le paragraphe précédent (i.e. Production de C2), il est fortement probable que la corrélation négative entre les deux genres et la production de C3 soit due à une évolution inverse de la croissance bactérienne et de la synthèse de C3, en relation avec les conditions de culture établies par notre protocole, plutôt qu'à un lien causal.

### **2.5.3. Entre microbiote et biohydrogénation**

Différents points seront abordés pour étudier la corrélation entre le microbiote et la BH du c9,c12-C18:2 : le pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2, la production d'isomères t10 et la production d'isomères t11. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la production de C18:0 et un genre bactérien.

L'ensemble des corrélations entre les paramètres d'étude de la BH et les genres bactériens identifiés dans les différents milieux est rassemblé dans le tableau 13.

Tableau 13 : Corrélations entre les paramètres de la biohydrogénation et les genres bactériens

	Pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2	Production d'isomères t10	Production d'isomères t11
<i>Acetitomaculum</i>	N	-	-
<i>Bifidobacterium</i>	-	N	N
<i>Butyrivibrio</i>	N	-	-
<i>Christensenellaceae R7 group</i>	N	-	-
<i>Eubacterium</i>	-	-	-
<i>Lachnospira</i>	-	-	-
<i>Lactobacillus</i>	P	N	N
<i>Prevotella</i>	-	-	-
<i>Prevotellaceae UCG</i>	N	-	-
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	-	-	-
<i>Rikenellaceae RC9 gut group</i>	N	-	-
<i>Ruminoclostridium</i>	N	-	-
<i>Ruminobacter</i>	-	-	P
<i>Ruminococcaceae NK4A214</i>	-	-	-
<i>Ruminococcaceae UCG</i>	N	-	-
<i>Ruminococcus</i>	N	-	-

P : Positive ; N : Négative ; - : Absence de corrélation

- Pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2

Une corrélation positive existe entre le pourcentage de disparition de c9,c12-C18:2 et le genre *Lactobacillus*.

Les lactobacilles se développent de manière exponentielle dans les milieux AA tout au long des cultures, alors que dans les mêmes milieux, la disparition du c9,c12-C18:2 est nulle à J5. La prolifération du genre *Lactobacillus* entraîne une baisse excessive du pH du milieu (< 5 dès 24 heures de culture). Or, l'étude de Troegeler *et al* (2006) a montré que l'isomérisation de la BH est inhibée pour des valeurs faibles de pH, suite à une incubation de plus de 2 heures. Ainsi, la croissance des lactobacilles est associée à un arrêt de la BH du c9,c12-C18:2.

L'expérience a mis en évidence une corrélation négative entre le pourcentage de disparition du c9,c12-C18:2 et les genres bactériens suivants : *Acetitomaculum*, *Butyrivibrio*, *Christensenellaceae R7 group*, *Prevotellaceae UCG*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, *Ruminoclostridium*, *Ruminococcaceae UCG* et *Ruminococcus*.

Les genres cités ci-dessus regroupent des bactéries essentiellement fibrolytiques, dont le développement est favorisé dans les milieux FF. La quantité de c9,c12-C18:2 disparu est maintenue entre J1 (27,2%) et J5 (18,9%), malgré une diminution de l'efficacité. Ainsi, le développement des genres bactériens a permis de maintenir une BH relativement constante, et de ce fait, une consommation du c9,c12-C18:2.

- Production d'isomères t10

Aucune corrélation positive n'a été mise en évidence entre la production d'isomères t10 et un genre bactérien.

Des études *in vitro* rapportent que deux bactéries sont capables de réaliser la voie t10 de la BH du c9,c12-C18:2 : *M. elsdenii* [59] et *Propionibacterium acnes* [74]. Les deux genres n'ont pas été détectés dans nos échantillons.

D'autre part, une étude [56] a montré que le produit majoritaire de la BH du c9,c12-C18:2 par *Ruminococcus albus* est un trans-C18:1 (95%). L'espèce est très efficace pour l'isomérisation et la première réduction de la BH, mais elle ne réalise pas l'hydrogénation finale. Les proportions des deux trans-C18:1 sont variables : 30 à 70% de t10 et 30 à 70% de t11. Ainsi, *R. albus* pourraient participer à l'augmentation de la production d'isomères t10 observée dans les milieux FF entre J1 et J5. Cependant, aucune corrélation positive n'a été observée entre le genre *Ruminococcus* et la production d'isomères t10. Dans les milieux FF, la population de

*Ruminococcus* tend à diminuer, et son abondance est faible. Le genre n'est peut être pas en quantité suffisante pour expliquer l'augmentation de la production d'isomères t10 dans les milieux FF. D'autres bactéries doivent être en cause, mais elles n'ont pas été identifiées dans notre étude.

Une corrélation négative existe entre la production d'isomères t10 et les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*.

Les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* montrent une croissance importante dans les milieux AA, où la BH est très réduite à J5 par rapport à J1 (i.e. Comparaison des deux types de milieux). La production d'isomères t10 diminue fortement au cours des cultures dans les milieux AA. Ainsi, la diminution de la quantité d'isomères t10 produits est associée à la prolifération des bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, sans pour autant établir un lien causal.

Pourtant, dans une étude *in vivo* [145], le genre *Lactobacillus* est fortement corrélé ( $r = 0,8$ ) aux isomères t10. Toutefois, Zened *et al* (2011b) ne concluent pas que le genre *Lactobacillus* est responsable de la production d'isomères t10, car seulement la moitié des genres bactériens présents dans les échantillons ont été identifiés.

La forte réduction de la BH du c9,c12-C18:2 dans les milieux AA est sûrement due à un pH trop faible, à l'origine d'une inhibition des enzymes des deux voies de la BH (i.e. Comparaison des activités microbiennes sur 3 heures entre J1 et J5). Ainsi, la diminution de la production d'isomères t10 dans les milieux AA ne serait pas liée aux bactéries présentes, mais plutôt aux conditions de culture. Il est fortement probable que la corrélation négative entre les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et la production d'isomères t10 soit due à une évolution inverse des deux éléments, plutôt qu'à un lien causal.

- Production d'isomères t11

La production d'isomères t11 est corrélée positivement avec le genre *Ruminobacter*.

Le phénomène peut s'expliquer par la correspondance entre la croissance rapide du genre *Ruminobacter* dans les milieux FLA et l'augmentation de la production d'isomères t11 entre J1 et J5 dans les mêmes milieux.

Cependant, l'ajout de c9,c12-C18:2 dans un milieu serait néfaste pour *R. amylophilus*. En effet, selon l'étude de Maia *et al* (2007), 50% de la population de *R. amylophilus* meurt dans un milieu contenant 200 µg/mL de c9,c12-C18:2. Les milieux FLA atteignent une concentration de 315 µg/mL à J5, une diminution de la population du genre *Ruminobacter*



serait alors attendue. L'étude de Maia *et al* (2007) a été réalisée sur des cultures pures de *R. amylophilus*. Il est alors possible que l'espèce bactérienne montre une résistance plus élevée au c9,c12-C18:2 lorsqu'elle est mise en culture avec d'autres bactéries, présentes physiologiquement dans le rumen des vaches.

Le genre *Butyrivibrio* n'est pas corrélé de manière significative à la production d'isomères t11, alors que l'abondance du genre est multipliée par 6,3 dans les milieux F entre l'inoculum et le pic de croissance à 82 heures de culture, et qu'en parallèle, la production d'isomères t11 est multipliée par 2,3 entre J1 et J5 dans les milieux F. Cependant, dans les milieux FLA, près de 70% de la population de *Butyrivibrio* a disparu entre J1 et J5, tandis que la production d'isomères t11 est multipliée par 10,8 dans les mêmes milieux entre J1 et J5. Ainsi, il est probable que la corrélation positive attendue entre le genre *Butyrivibrio* et la production d'isomères t11 dans les milieux F soit masquée par le déclin du genre dans les milieux FLA qui est associé à une production d'isomères t11 plus importante (la quantité d'isomères t11 produits à J5 est 4,6 fois supérieure dans les milieux FLA par rapport aux milieux F).

Au même titre que la production d'isomères t10, une corrélation négative est révélée entre la production d'isomères t11 et les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*. En effet, la production d'isomères t11 est presque nulle dans les milieux AA à J5, alors que les deux genres s'y développent de manière importante. Ainsi, dans notre étude, la diminution de la quantité d'isomères t11 produits est associée à la prolifération des bactéries du genre *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, sans pour autant établir un lien causal.

Cependant, plusieurs études ont démontré la production d'isomères t11 par les bactéries appartenant aux deux genres [14, 96].

Il est fortement probable que la corrélation négative entre les genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* et la production d'isomères t11 soit la conséquence d'une évolution inverse de la croissance bactérienne et de la synthèse de ces intermédiaires, et non à un lien causal, la forte réduction de la BH du c9,c12-C18:2 observée dans les milieux AA étant plutôt amputable à une inhibition des enzymes des deux voies de la BH due à un pH trop faible.

**En conclusion, il est difficile d'identifier les bactéries intervenant dans les deux voies de la BH du c9,c12-C18:2 pour plusieurs raisons.**

**Tout d'abord, les milieux AA, initialement dédiés à sélectionner la voie t10 de la BH, ont dévié vers une acide lactique. Le phénomène a conduit à la sélection de genres bactériens possédant une acido-résistance élevée, tels que *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et**

*Prevotella*, et à la disparition de la plupart des autres genres. D'autre part, le pH très bas obtenu dans les milieux AA est probablement à l'origine d'une inhibition des enzymes de la BH du c9,c12-C18:2, d'où la réduction de l'efficacité de celle-ci. Tout de même, une inversion du ratio t10/t11 est observée dans les milieux AA, même si les proportions de chaque isomère sont très faibles, suggérant une éventuelle déviation de la voie t11 vers la voie t10. Afin d'approfondir les résultats obtenus dans les milieux riches en amidon, il serait intéressant d'utiliser une substance tampon plus efficace pour éviter une acidification du milieu trop importante, et ainsi, permettre le développement d'autres genres bactériens.

Par la suite, outre les variations individuelles de la population bactérienne, la majorité des espèces bactériennes du rumen ne sont pas identifiées. En effet, les études sur le séquençage de l'ADNr 16S suggèrent la présence de 300 à 400 espèces bactériennes dans le rumen [142]. Parmi celles-ci, seulement 2-31% ont montré une similarité phylogénétique ( $\geq 97\%$  de similarité) avec des espèces précédemment décrites [62]. Ainsi, l'étude d'un microbiote ruminal peut être difficile à interpréter, et il est fortement probable que des bactéries non identifiées dans notre étude aient un rôle important dans la BH du c9,c12-C18:2.

Enfin, les résultats obtenus dans notre expérimentation diffèrent d'autres études, réalisées *in vivo* ou en culture pure *in vitro*. Cette discordance suggère une modification du comportement des bactéries selon leur environnement. Il est probable que des interactions entre espèces bactériennes jouent un rôle dans le développement et le profil métabolique des bactéries.

#### **2.5.4. Entre les différents genres bactériens**

L'ensemble des corrélations entre les divers genres bactériens identifiés dans les milieux est rassemblé dans le tableau 14.

La première évidence est une corrélation positive entre la plupart des genres possédant une activité fibrolytique : *Acetivomaculum*, *Butyrivibrio*, *Christensenellaceae R7 group*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Prevotella*, *Prevotellaceae UCG*, *Pseudobutyrvibrio*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, *Ruminoclostridium*, *Ruminococcaceae NK4A214*, *Ruminococcaceae UCG* et *Ruminococcus*.

Le phénomène s'explique par le fait que les bactéries de ces genres ont comme principaux substrats des glucides pariétaux (cellulose, hémicellulose, pectine). Compte tenu des

similitudes de métabolisme, le développement des genres cités ci-dessus est favorisé dans les mêmes milieux, en l'occurrence les milieux FF dans notre expérimentation.

Même si l'ensemble des genres identifiés dans notre expérimentation se développe dans les milieux FF, certains connaissent une diminution de leur nombre au fur et à mesure du temps d'incubation : *Christensenellaceae R7 group*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Prevotellaceae UCG*, *Rikenellaceae RC9 gut group*, *Ruminococcaceae NK4A214*, *Ruminococcaceae UCG* et *Ruminococcus*. Des phénomènes de compétition pour le substrat entre les différentes bactéries fibrolytiques pourraient expliquer la décroissance de quelques genres. Selon Russel et Baldwin (1979), la dominance d'une espèce sur les autres dépend de ses besoins en énergie, en azote et en nutriments essentiels, de la disponibilité de ces éléments dans le milieu et du pH de l'environnement. Outre la présence des substrats, la vitesse et l'efficacité de leur utilisation sont également essentielles. Des populations bactériennes en compétition peuvent coexister tant que des substrats limitants différents sont présents dans le milieu, chacun d'eux favorisant la population qui l'utilise le plus efficacement. Une compétition entre bactéries fibrolytiques a déjà été mise en évidence auparavant. En effet, l'étude de Odenyo *et al* (1994) a montré des phénomènes compétitifs entre deux espèces fibrolytiques du rumen : *R. albus* et *R. flavefaciens* (en di-culture). D'autre part, des bactéries peuvent présenter une sensibilité à certains éléments issus des végétaux. A titre d'exemple, les acides phénoliques présents dans les fourrages, en particulier les acides féruliques et coumarique, sont toxiques pour quelques bactéries fibrolytiques. Ils inhibent entre autre la croissance de *R. albus* et *R. flavefaciens*, et réduisent leur activité cellulolytique [11]. Cependant, l'étude *in vitro* de Chesson *et al* (1982) a montré que la réduction de ces acides en acides phénylpropioniques par la flore ruminale permet de lever l'inhibition de la croissance bactérienne et de l'activité cellulolytique.

Dans notre expérimentation, il est possible que certains genres de bactéries fibrolytiques, tels que *Butyrivibrio* et *Pseudobutyrvibrio*, se soient développés au détriment d'autres, comme *Ruminococcus*. A notre connaissance, aucune étude ne porte sur une éventuelle compétition entre ces genres bactériens, mais un protocole similaire à l'étude de Odenyo *et al* (1994) peut être mis en place.

La deuxième corrélation évidente observée est la corrélation négative entre les genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*, qui montrent une croissance importante dans les milieux AA, et plusieurs genres possédant une activité fibrolytique : *Acetivomaculum*, *Christensenellaceae R7 group*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Prevotellaceae UCG*, *Pseudobutyrvibrio*, et *Ruminococcus*.

Les bactéries des genres *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* produisent de l'acide lactique à l'origine d'une baisse du pH du milieu. Ainsi, lorsque ces deux genres sont prédominants, la

croissance des bactéries fibrolytiques est altérée puisqu'elles sont sensibles à des valeurs faibles de pH, d'où l'observation d'une corrélation négative entre les bactéries productrices de lactate et les bactéries fibrolytiques. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de Therion *et al* (1982) : la sensibilité de l'espèce *F. succinogenes* au pH est suffisante pour expliquer son élimination de la population bactérienne dominante du rumen chez des animaux recevant des régimes riches en amidon.

Les analyses statistiques mettent également en évidence une corrélation positive entre le genre *Ruminobacter*, qui dégrade l'amidon, et les genres *Eubacterium*, *Lachnospira* et *Pseudobutyrvibrio*, essentiellement fibrolytiques. Ces quatre genres montrent des similitudes de croissance dans les deux types de milieux.

Dans les milieux AA, les quatre genres connaissent un pic de croissance, plus ou moins important, à 60 heures d'incubation (i.e. Figures 41, 42, 46 et 49). D'autre part, une légère augmentation de la croissance à 24 heures de culture est également observé dans les milieux FF, même si la population des genres *Eubacterium* et *Lachnospira* a tendance à diminuer. Ainsi, malgré la différence de substrat, le développement du genre *Ruminobacter* est peut être corrélé à la croissance de bactéries fibrolytiques. Une interaction entre ces genres bactériens est possible, à l'image de *S. ruminantium* et *F. succinogenes* [112].

Tableau 14 : Corrélations entre les genres bactériens

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1																
2	-															
3	P	-														
4	P	N	-													
5	P	N	-	-												
6	P	N	P	-	P											
7	N	P	-	N	N	N										
8	-	-	-	-	P	P	-									
9	P	N	P	P	P	P	N	-								
10	P	-	-	-	P	P	N	-	P							
11	P	-	P	P	P	P	-	-	P	-						
12	P	-	P	P	-	-	-	-	P	-	P					
13	-	-	-	-	P	P	-	P	-	P	-	-				
14	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
15	P	-	P	-	P	P	-	-	P	-	P	P	-	-		
16	P	N	P	P	P	P	N	-	P	-	P	P	-	-	P	

1 : *Acetitomaculum* ; 2 : *Bifidobacterium* ; 3 : *Butyrivibrio* ; 4 : *Christensenellaceae R7 group* ; 5 : *Eubacterium* ; 6 : *Lachnospira* ; 7 : *Lactobacillus* ; 8 : *Prevotella* ; 9 : *Prevotellaceae UCG* ; 10 : *Pseudobutyrvibrio* ; 11 : *Rikenellaceae RC9 gut group* ; 12 : *Ruminoclostridium* ; 13 : *Ruminobacter* ; 14 : *Ruminococcaceae NK4A214* ; 15 : *Ruminococcaceae UCG* ; 16 : *Ruminococcus*

*P* : Positive ; *N* : Négative ; - : Absence de corrélation



# CONCLUSION

Notre étude met en évidence la complexité de reproduire des milieux semblables à l'environnement ruminal afin de cultiver des bactéries issues d'un fluide ruminal.

Les milieux FF riches en fibres se caractérisent par un pH et une production d'AGV totaux relativement stables tout au long de l'expérimentation. En effet, le pH a évolué dans une gamme restreinte analogue au pH ruminal physiologique, et la production d'AGV montre une prédominance du C2, essentiellement issu de la dégradation des glucides pariétaux.

Dans les milieux FF, l'activité de BH du c9,c12-C18:2 a été conservée au cours de l'incubation, avec un maintien des voies t10 et t11. L'augmentation des concentrations des isomères t10 et t11 à J5 est sûrement due à l'accumulation des intermédiaires de la BH suite à la saturation de l'isomérisation finale en C18:0. L'ajout de c9,c12-C18:2 entraîne une hausse importante de la production des isomères t10 et t11 dans les milieux FLA, plus marquée pour les isomères t11. L'accumulation des isomères est liée à l'inhibition de la deuxième réduction de la BH par les CLA.

La richesse en fibres des milieux FF a permis de sélectionner des bactéries fibrolytiques, appartenant à la famille des *Ruminococcaceae* et des *Prevotellaceae*, et aux genres *Acetivibrio*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Pseudobutyrvibrio*, *Rikenellaceae* et *Ruminoclostridium*. Les croissances des genres *Butyrivibrio*, *Prevotella* et *Pseudobutyrvibrio* ont été les plus importantes dans les milieux FF. L'ajout de c9,c12-C18:2 dans les milieux FLA a influencé la croissance de seulement trois genres : *Butyrivibrio*, *Ruminoclostridium* et *Ruminobacter*. La population des genres *Butyrivibrio* et *Ruminoclostridium* diminue suite à la supplémentation en c9,c12-C18:2, suggérant une inhibition des bactéries en présence d'une concentration élevée en c9,c12-C18:2. Par contre, l'abondance du genre *Ruminobacter* est supérieure dans les milieux FLA. Il est possible que l'effet délétère du c9,c12-C18:2 sur la croissance du genre soit minoré grâce à des interactions entre différentes espèces bactériennes.

Les milieux AA riches en amidon ont dévié vers un processus semblable à une acidose lactique. Le pH est descendu en dessous de 5 dès 24 heures d'incubation, et n'a pas dépassé 4,5 par la suite. De telles valeurs de pH ne sont pas observables *in vivo*. En parallèle de la baisse de pH, la quantité d'AGV totaux produits a largement diminuée au cours des cultures, en lien avec un déclin important de la production de C2.

L'activité de BH du c9,c12-C18:2 dans les milieux AA a largement diminué, jusqu'à devenir presque nulle, sûrement du fait de l'inhibition de l'isomérisation du c9,c12-C18:2 par le pH trop bas. Cependant, malgré les quantités très faibles d'isomères t10 et t11 dans ces milieux, une inversion du ratio t10/t11 est observée, suggérant une déviation de la voie t11 vers la voie t10. L'ajout de c9,c12-C18:2 dans les milieux ALA ne provoque pas de modification des paramètres mesurés, étant donné que la BH est très limitée.

A J5, le microbiote des milieux AA se restreint à trois genres : *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Prevotella*. La baisse progressive du pH a entraîné la sélection de bactéries acido-résistantes et la disparition de la plupart des autres genres.

Dans les milieux FF, les voies t10 et t11 de la BH sont favorisées, en parallèle du développement de bactéries fibrolytiques. Ainsi, il est probable que ces dernières soient capables de réaliser les deux voies de la BH du c9,c12-C18:2. Il semblerait également que l'ajout de c9,c12-C18:2 favoriserait la voie t11.

Les milieux AA n'ont pas permis une sélection des populations microbiennes à l'origine de la voie t10 de la BH. Cependant, l'inversion du ratio t10/t11 suggère une déviation de la BH de la voie t11 vers la voie t10. D'un autre côté, les faibles quantités d'isomères t10 et t11 dans les milieux AA laisse supposer que les bactéries responsables de cette déviation sont très peu abondantes et/ou que les enzymes de la BH sont inhibées du fait du pH faible. Afin d'approfondir les résultats obtenus dans les milieux riches en amidon, il serait intéressant d'utiliser une substance tampon plus efficace pour éviter une acidification importante du milieu, et ainsi, permettre le développement d'autres genres bactériens.

L'étude du microbiote ruminal est loin d'être achevée. La plupart des espèces bactériennes n'ont pas encore été identifiées, et de nombreuses bactéries sont difficilement cultivables *in vitro*. L'intérêt d'étudier les bactéries ruminales garde toute son importance car un bouleversement du microbiote ruminal peut induire des effets néfastes sur la santé de l'animal, et à plus grande échelle sur la santé humaine par la consommation de produits issus des Ruminants (lait et viande).



# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



1. BARONE R. (1997). *Anatomie comparée des mammifères domestiques. Tome 3 : Splanchnologie I. Appareil digestif. Appareil respiratoire.* 3<sup>ème</sup> édition. Paris : Vigot. 853 p.
2. BAUMAN D.E., DAVIS C.L., BUCHOLTZ H.F. (1971). Propionate production in the rumen of cows fed either a control or high-grain, low-fiber diet. *Journal of Dairy Science*, **54**(9), 1282-1287.
3. BELBIS H. (2007). *Flore du rumen : origine, composition, évolution, conséquences pathologiques.* Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 140 p.
4. BENNINK M.R., TYLER T.R., WARD G.M., JOHNSON D.E. (1978). Ionic milieu of bovine and ovine rumen as affected by diet. *Journal of Dairy Science*, **61**, 315-323.
5. BLACKBURN T.H., HOBSON P.N. (1962). Further studies on the isolation of proteolytic bacteria from the sheep rumen. *Journal of General Microbiology*, **29**, 69-81.
6. BROBERG G. (1957). Measurements of the redox potential in rumen contents. III. Investigations into the effect of oxygen on the redox potential and quantitative in vitro determinations of the capacity of rumens contents to consume oxygen. *Nordisk Veterinaermedicin*, **9**, 942-950.
7. BRUGERE H. (1983a). Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bulletin GTV*, **3**, 5-22.
8. BRUGERE H. (1983b). Biochimie du rumen – Aspects pathologiques. *Bulletin GTV*, **3**, 5-22.
9. CAMPLING R.C. (1991). Processing cereal grains for cattle : a review. *Livestock Production Science*, **28**, 223-234.
10. CHENG K.J., FORSBERG C.W., MINATO H., COSTERTON J.W. (1991). Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In

*Physiological aspect of digestion and metabolism in ruminants*. Tokyo : Academic Press, p. 595-624.

11. CHESSON A., STEWART C. S., WALLACE R. J. (1982). Influence of plant phenolic acids on rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**, 597-603.
12. CHESSON A., FORSBERG C.W. (1988). Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Science Publisher, p. 251-277.
13. CHILLIARD Y., FERLAY A., MANSBRIDGE R.M., DOREAU M. (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*, **49**, 181-205.
14. COAKLEY M., ROSS R.P., NORDGREN M., FITZGERALD G., DEVERY R., STANTON C. (2003). Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 138-145.
15. COUNOTTE G.H.M., PRINS R.A. (1981). Regulation of lactate metabolism in the rumen. *Veterinary Research Communications*, **5**, 101-115.
16. CULLEN A.J., HARMON D.L., NAGARAJA T.G. (1986). In vitro fermentation of sugar, grains and by-product feeds in relation to initiation of ruminal lactate production. *Journal of Dairy Science*, **69**, 2616-2621.
17. DAWSON K.A., RASMUSSEN M.A., ALLISON M.J. (1988). Digestive disorders and nutritional toxicity. In *The rumen microbial ecosystem*. Second Edition. London : Blackie Academic and Professional, p. 633-660.
18. DEHORITY B.A. (2003). *Rumen microbiology*. Nottingham University Press. 372 p.
19. DENG M.D., GRUND A., SCHNEIDER K.J., ROSSON R. (2007). Linoleic acid isomerase from *Propionibacterium acnes* : Purification, characterization, molecular cloning and heterologous expression. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **143**, 199-211.

20. DESTAILLATS F., TROTTIER J.P., GALVEZ J.M.G., ANGERS P. (2005). Analysis of alpha-linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *Journal of Dairy Science*, **88**, 3231-3239.
21. DEUSCH S., CAMARINHA-SILVA A., CONRAD J., BEIFUSS U., RODEHUTSCORD M., SEIFERT J. (2017). A structural and functional elucidation of the rumen microbiome influenced by various diets and microenvironments. *Frontiers in Microbiology*, **8** : 1605, doi : 10.3389/fmicb.2017.01605
22. DOREAU M., DEMYER D.I., VAN NEVEL C.J. (1997). Transformations and effects of unsaturated fatty acids in the rumen. Consequences on milk fat secretion. In *Milk composition, production and biotechnology*. Oxford (UK) : CAB International, p. 73-92.
23. DOREAU M., FIEVEZ V., TROEGELER-MEYNADIER A., GLASSER F. (2012). Métabolisme ruminal et digestion des acides gras longs chez le ruminant : le point des connaissances récentes. *INRA Productions Animales*, **25**(4). 361-374.
24. DUNLOP R.H. (1972). Pathogenesis of ruminal lactic acidosis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, **16**, 259-302.
25. ENJALBERT F., TROEGELER-MEYNADIER A. (2009). Biosynthesis of trans fatty acids in ruminants. In *Trans Fatty Acids in Human Nutrition*. Second Edition. Bridgewater (UK) : Pl Barnes & Associates editor, p. 1-42.
26. ERDMAN R.A. (1988). Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow : a review. *Journal of Dairy Science*, **71**(12), 3246-3266.
27. ESPINASSE J., KUIPER R., SCHELCHER F. (1995). Physiopathologie du complexe gastrique. In *Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion des aliments*. INRA Editions, p. 805-852.
28. FENG G. D., YANG S. Z., WANG Y. H., ZHANG X. X., ZHAO G. Z., DENG M. R., ZHU H. H. (2014). Description of a Gram-negative bacterium, *Sphingomonas*

*guangdongensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**, 1697-1702

29. FONTY G., JOUANY J.P., FORANO E., GOUET P. (1995). L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In *Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion des aliments*. INRA Editions, p. 299-347.
30. FONTY G., CHAUCHEYRAS-DURAND F. (2007). *Les écosystèmes digestifs*. Paris : Lavoisier, 310 p.
31. FORSBERG C.W., LAM K. (1977). Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**, 528-537.
32. FORSBERG C.W., CHENG K.J., WHITE B.A. (1997). Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In *Gastrointestinal Microbiology*. New York : Chapman and Hall, p. 319-379.
33. GIGER-REVERDIN S., ABIJAOUDE J.A., PRADO I.N., TESSIER J., MORAND-FEHR P. (1997). Effect of diet composition on the kinetics of osmotic pressure in the rumen of dairy goats. *Options Méditerranéennes, Série A : Séminaires Méditerranéens*, **34**, 143-147.
34. GILLES R., ANCTIL M., BAGUET F., CHARMENTIER G. (2006). *Physiologie animale*. Première Edition. De Boeck Université, 675 p.
35. GREENING R.C., LEEDLE J.A. (1989). Enrichment and isolation of *Acetitomaculum ruminis*, gen. nov., sp. nov.: acetogenic bacteria from the bovine rumen. *Archives of Microbiology*, **151**(5), 399-406.
36. GREENMAN J., HOLLAND K.T., CUNLIFFE W.J. (1983). Effects of pH on biomass, maximum specific growth rate and extracellular enzyme production by three species of cutaneous propionibacteria grown in continuous culture. *Journal of General Microbiology*, **129**(5), 1301 -1307.

37. GRENET E., BESLE J.M. (1991). Microbes and fibre degradation. In *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. INRA Editions, p. 107-129.
38. GROHN Y.T., BRUSS M.L. (1990). Effect of diseases, production and season on traumatic réticulo-peritonitis and ruminal acidosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, **73**, 2355-2363.
39. HAMLIN L.J., HUNGATE R.E. (1956). Culture and physiology of a starch-digesting bacterium (*Bacteroides amylophilus* n. sp.) from the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, **72**(4), 548-554.
40. HARFOOT C.G., HAZLEWOOD G.P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In *The rumen microbial ecosystem*. Second Edition. London : Blackie Academic and Professional, p. 382-426.
41. HAZLEWOOD G., DAWSON R.M.C. (1979). Characteristics of a lipolytic and fatty acid requiring *Butyrivibrio* sp. isolated from the ovine rumen. *Journal of General Microbiology*, **112**, 15-27.
42. HE Y.L., DING Y.F., LONG Y.Q. (1991). Two cellulolytic *Clostridium* species : *Clostridium cellulosi* sp nov and *Clostridium cellulofermentans* sp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41**(2), 306-309.
43. HENDERSON C. (1971). A study of the lipase produced by *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen bacterium. *Journal of General Microbiology*, **65**, 81-89.
44. HILLAIRE M.C., JOUANY J.P., FONTY G. (1990). Wheat straw degradation in rusitec, in the presence or absence of rumen anaerobic fungi. Proceedings of the Nutrition Society, **49**(2), 127.
45. HOBSON P.N. (1965). Continuous culture of some anaerobic and facultatively anaerobic rumen bacteria. *Journal of General Microbiology*, **38**, 167-180.
46. HUNGATE R.E. (1966). The rumen bacteria. In *The rumen and its microbes*. Academic press, p. 8-90.

47. JAMI E., ISRAEL A., KOTSER A., MIZRAHI I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *ISME Journal*, **7**(6), 1069-1079
48. JENKINS T.C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, **76**, 3151-3863.
49. JENKINS T. C. (2010). Technical note : Common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples. *Journal of Dairy Science*, **93**(3), 1170-1174.
50. JEWELL K.A., McCORMICK C.A., ODT C.L., WEIMER P.J., SUEN G. (2015). Ruminant bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**(14), 4697-4710.
51. JOUANY J.P. (1994). Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions Animales*, **7**(3), 207-225.
52. JOURNET M., HUNTINGTON G., PEYRAUD J.L. (1995). Le bilan des produits terminaux de la digestion. In *Nutrition des ruminants domestiques : Ingestion et digestion des aliments*. INRA Editions, p. 671-720.
53. 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
54. JULIEN C., MARDEN J.P., BONNEFONT C., MONCOULON R., AUCLAIR E., MONTEILS V., BAYOURTHE C. (2010). Effects of varying proportions of concentrates on ruminal-reducing power and bacterial community structure in dry dairy cows fed hay-based diets. *Animal*, **4**(10), 1641-1646.
55. KAUFMAN W., HAGEMEISTER H., DURKSEN G. (1980). Adaptation to changes in dietary composition level and frequency of feeding. In *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Springer, p. 587-602.



56. KEMP P., WHITE R.W., LANDER D.J. (1975). The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *Journal of General Microbiology*, **90**, 110-114.
57. KEMP P., LANDER D.J. (1984). Hydrogenation in vitro of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Journal of General Microbiology*, **130**, 527-533
58. KIM Y.J., LIU R.H., BOND D.R., RUSSELL J.B. (2000). Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, 5226-5230
59. KIM Y.J., LIU R.H., RYCHLIK J.L., RUSSELL J.B. (2002). The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *Journal of Applied Microbiology*, **92**, 976-982.
60. KIM Y.J. (2003). Partial inhibition of biohydrogenation of linoleic acid can increase the conjugated linoleic acid production of *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 4258-4262
61. KNUDSEN C. (2014). *Stratégie de limitation de l'ingestion : Optimisation des performances zootechniques, impacts physiologiques et conséquences sur la santé digestives*. Thèse de doctorat, Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition, Institut National Polytechnique de Toulouse, 284 p.
62. KOBAYASHI Y. (2006). Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology : Need for basic and applied science. *Animal Science Journal*, **77**, 375-385.
63. KOIKE S., YOSHITANI S., KOBAYASHI Y., TANAKA K. (2003). Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **229**, 23-30.
64. KOIKE S., KOBAYASHI Y. (2009). Fibrolytic rumen bacteria : their ecology and functions. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, **22**(1), 131-138.

65. KONG Y., TEATHER R., FORSTER R. (2010). Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forage. *FEMS Microbiology Ecology*, **74**(3), 612–622.
66. KRAMER J.K.G., CRUZ-HERNANDEZ C., DENG Z., ZHOU J., JAHREIS G., DUGAN M.E.R. (2004). Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**, 1137-1145.
67. KRAUSE D.O., DENMAN S.E., MACKIE R.I., MORRISON M., RAE A.L., ATTWOOD G.T., McSWEENEY C.S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen : microbiology, ecology and genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, **27**, 663-693.
68. KRAUSE K.M., OETZEL G.R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds : a review. *Animal Feed Science and Technology*, **126**, 215-236.
69. LARUE R., YU Z., PARISI V.A., EGAN A.R., MORRISON M. (2005). Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology*, **7**, 530-543.
70. LAWLOR M.J., GIESECKE D., WALSER-KARST K. (1966). Comparative studies on the digestive physiology of sheep fed on semi-purified or roughage-concentrate diets. 1 – Food and water intake, rumen volume and rates of parotid secretion. *British Journal of Nutrition*, **20**, 373-382.
71. LEEDLE J.A., BRYANT M.P., HESPELL R.B. (1982). Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low- or high- forage diets. *Applied and Environmental Microbiology*, **44**, 402-412.
72. LENGOWSKI M.B., ZUBER K.H.R., WITZIG M., MOHRING J., BOGUHN J., RODEHUTSCORD M. (2016). Changes in rumen microbial community composition during adaption to an in vitro system and the impact of different forages. *PLoS ONE*, **11**(2), e0150115, doi:10.1371/journal.pone.0150115

73. LEROY H. (1987). *Effets physiologiques du jeûne chez les Ruminants*. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 94 p.
74. LIAVONCHANKA A., RUDOLPH M.G., TITTMANN K., HAMBERG M., FEUSSNER I. (2009). On the mechanism of a polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes*. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**(12), 8005-8012.
75. LIMA F.S., OIKONOMOU G., LIMA S.F., BICALHO M.L.S., GANDA E.K., DE OLIVEIRA FILHO J.C., LORENZO G., TROJACANEC P., BICALHO R.C. (2015). Prepartum and postpartum rumen fluid microbiomes : characterization and correlation with production traits in dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**, 1327-1337.
76. LIU J. H., ZHANG M. L., XUE C. X., ZHU W. Y., MAO S. Y. (2016). Characterization and comparison of the temporal dynamics of ruminal bacterial microbiota colonizing rice straw and alfalfa hay within ruminants. *Journal of Dairy Science*, **99**, 9668-9681.
77. LIU K., XU Q., WANG L., WANG J., ZHOU M. (2017). The impact of diet on the composition and relative abundance of rumen microbes in goat. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, **30**(4), 531-537.
78. LOESCHE W.J. (1969). Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Applied Microbiology*, **18**, 723-727.
79. MAIA M.R.G., CHAUDHARY L.C., FIGUERES L., WALLACE R.J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology*, **91**(4), 303-314.
80. MALBERT H., RUCKEBUSH Y., BUENO L., BAUMONT R., THEODOROU V. (1995). Motricité du complexe gastrique. In *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p. 223-252

81. 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. *Journal of Dairy Science*, **88**, 277-281.
82. MARTIN C., MILLET L., FONTY G., MICHALET-DOREAU B. (2001). Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community with rumen solid digesta. *Reproduction Nutrition Development*, **41**, 413-424.
83. MARX D. (2002). Les maladies métaboliques chez les ovins. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 131 p.
84. MATTARELLI P., BIAVATI B. (2017). Species in the genus *Bifidobacterium*. In *The Bifidobacteria and Related Organisms : Biology, Taxonomy, Applications*. Elsevier, p. 9-48.
85. Mc ALLISTER T.A., RODE L.R., CHENG K.J., BUCHANAN-SMITH J.G. (1989). The effect of formaldehyde on the vitro digestion of barbey starch. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, **2**, 355-356.
86. MICHALET-DOREAU B., FERNANDEZ I., PEYRON C., MILLET L. (2001). Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development*, **41**, 187-194.
87. MICHELLAND R. (2009). *Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores : approche comparée vache / lapin*. Thèse de doctorat, Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition, INPT Toulouse, 361 p.
88. MIN B.R., PINCHAK W.E., ANDERSON R.C., HUME M.E. (2006). In vitro bacterial growth and in vivo ruminal microbiota populations associated with bloat in steers grazing wheat forage. *Journal of Animal Science*, **84**(10), 2873-2882.
89. MIRON J., BEN-GHEDALIA D., MORRISON M. (2001). Invited review : adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, **84**, 1294-1309.

90. MITCHELL H.H. (1937). The importance of the relations between energy, protein and minerals in measuring the nutritive value of feeds and rations. *Journal of Animal Science*, **1937**(1), 29-42.
91. MOHAMED NOUR M.S., ABUSAMRA M.T., HAGO B.E.D. (1998). Experimentally induced lactic acidosis in Nubian goats : clinical, biochemical and pathological investigations. *Small Ruminant Research*, **31**, 7-17.
92. NELSON K.E., ZINDER S.H., HANCE I., BURR P., ODONGO D., WASAWO D., ODENYO A., BISHOP R. (2003). Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract : insights into an unexplored niche. *Environmental Microbiology*, **5**, 1212-1220.
93. NEWBOLD C.J., DE LA FUENTE G., BELANCHE A., RAMOS-MORALES E., McEWAN N.R. (2015). The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 1313.
94. ODENYO A. A., MACKIE R. I., STAHL D. A., WHITE B. A. (1994). The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria : pure-culture studies with cellulose and alkaline peroxide-treated wheat straw. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(10), 3697-3703.
95. OETZEL G.R., NORDLUND K.V., GARRET E.F. (1999). Effect of ruminal pH and stage of lactation on ruminal lactate concentrations in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, **82**, p. 38
96. OGAWA J., KISHINO S., ANDO A., SUGIMOTO S., MIHARA K., SHIMIZU S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **100**, 355-364.
97. PAGGI R.A., RODRIGUEZ C., FAY J.P. (2005). Growth and pectate-lyase activity of the ruminal bacterium *Lachnospira multiparus* in the presence of short-chain organic acids. *Letters in Applied Microbiology*, **41**(5), 434-439.
98. PARODI P.W. (1997). Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agents. *The Journal of Nutrition*, **127**, 1055-1060.

99. PETRI R.M., SCHWAIGER T., PENNER G.B., BEAUCHEMIN K.A., FORSTER R.J., Mc KINNON J.J., Mc ALISTER T. (2013). Characterization of the core tumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. *PLoS ONE*, **8**(12), e83424.
100. RADOSTITS O.M., GAY C.C., HINCHCLIFF K.W., CONSTABLE P.D. (2007). Diseases of the alimentary tract – II. In *Veterinary Medicine : A textbook of the disease of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 10<sup>th</sup> edition. Elsevier Saunders, 2156 p.
101. REMOND B., BRUGERE H., PONCET C., BAUMONT R. (1995). Le contenu du réticulo-rumen. In *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p. 253-298.
102. ROBINSON P.H., TAMMINGA S., VAN VUUREN A.M. (1986). *Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen fermentation in dairy cows*. *Livestock Production Science*, **15**, p. 175-189.
103. ROQUE J.L. (1991). *Anomalies de la digestion microbienne ruminale. Aspects pathologiques*. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale de Toulouse, 99 p.
104. ROSENBERGER G. (1979). *Examen clinique des bovins*. Editions du Point Vétérinaire, 526 p.
105. RUSSEL J. B., BALDWIN R. L. (1979). *Comparaison of substrate affinities among several rumen bacteria : a possible determinant of rumen bacterial competition*. *Applied Environmental Microbiology*, **37**, 531-536.
106. SADET S. (2008). *Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen : effet du régime alimentaire*. Thèse de doctorat universitaire, Nutrition et Sciences des Aliments, Université Blaise Pascal de Clermont Ferrand, 156 p.
107. SATGE B. (1993). *Le pH du rumen – Etude bibliographique*. Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 200 p.

108. SAUTET J. (1995). L'appareil digestif et ses adaptations. In *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p. 183-222.
109. SAUVANT D., CHAPOUTOT P., ARCHIMEDE H. (1994). *La digestion des amidons par les ruminants et ses conséquences*. INRA Productions animales, **7**(2), 115-124.
110. SAUVANT D., GRENET E., DOREAU M. (1995). Dégradation chimique des aliments dans le réticulo-rumen : cinétique et importance. In *Nutrition des ruminants domestiques*. INRA Editions, p. 383-406.
111. SAUVANT D., GIGER-REVERDIN S., MESCHY F. (2006). *Le contrôle de l'acidose ruminale*. INRA Productions Animales, **19**(2), 69-78.
112. SCHEIFINGER C. C., WOLIN M. J. (1973). *Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of Bacteroides succinogenes and Selenomonas ruminantium*. Journal of Applied Microbiology, **26**(5), 789-795.
113. SHARAK GENTHNER B.R., DAVIS C.L., BRYENT M.P. (1981). *Features of rumen and sewage sludge strains of Eubacterium limosum, a methanol- and H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-utilizing species*. Applied and Environmental Microbiology, **42**(1), 12-19.
114. SHARAK GENTHNER B.R., BRYENT M.P. (1982). *Growth of Eubacterium limosum with carbon monoxide as the energy source*. Applied and Environmental Microbiology, **43**(1), 70-74.
115. SHINGFIELD K. J., AHVENJARVI S., TOIVONEN V., AROLA A., NURMELA K. V. V., HHTANEN P., GRIINARI J. M. (2003). *Effect of fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows*. Animal Science, **77**, 165-179.
116. SLYTER L.L. (1976). *Influence of acidosis on rumen function*. Journal of Animal Science, **43**, 910-929.

117. STAPLES C.R., FERNANDO R.L., FAHEY G.C. Jr., BERGER L.L., JASTER E.H. (1984). *Effects of intake of a mixed dairy steers on digestion events*. Journal of Dairy Science, **67**(5), 995-1006.
118. STEWART C.W., FLINT H., BRYANT M.P. (1997). The rumen bacteria. In *The rumen microbial ecosystem*. 2<sup>nd</sup> Edition. London : Blackie Academic and Professional, p. 10-72.
119. SUTTON J. D., DHANOA M. S., MORANT S. V., FRANCE J., NAPPER D. J., SCHULLER E. (2003). *Rates of production of acetate, propionate, and butyrate in the rumen of lactating dairy cows given normal and low-roughage diets*. Journal of Dairy Science, **86**(11), 3620-3633.
120. TAJIMA K., AMINOV R.I., NAGAMINE T., OGATA K., NAKAMURA M., MATSUI H., BENNO Y. (1999). *Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries*. FEMS Microbiology Ecology, **29**, 159-169.
121. TAJIMA K., ARAI S., OGATA K., NAGAMINE T., MATSUI H., NAKAMURA M., AMINOV R.I., BENNO Y. (2000). *Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet*. Anaerobe, **6**, 276-284.
122. TAJIMA K., AMINOV R.I., NAGAMINE T., MATSUI H., NAKAMURA M., BENNO Y. (2001). *Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR*. Applied and Environmental Microbiology, **67**(6), 2766-2774.
123. TAMMINGA S., DOREAU M. (1991). Lipids and rumen digestion. In *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. INRA Editions, p. 151-164.
124. THERION J. J., KISTNER A., KORNELIUS J. H. (1982). *Effect of pH on growth rates of rumen amylolytic and lactilytic bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, **44**, 428-434.
125. TIRET L. (2001). *Physiologie de la digestion*. Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. 69 pages.



126. 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*. *Reproduction, Nutrition, Development*, **46**, 713-724.
127. TROVATELLI L.D., MATTEUZZI D. (1976). *Presence of Bifidobacteria in the rumen of calves fed different rations*. *Applied and Environmental Microbiology*, **32**(4), 470-473.
128. VAN GYLSWYK N.O., HIPPE H., RAINEY F.A. (1996). *Pseudobutyrvibrio ruminis gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the rumen that closely resembles Butyrvibrio fibrisolvens in phenotype*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**(2), 559-563.
129. VAN NEVEL C.J., DEMEYER D.I. (1996). *Influence of pH on lipolysis and biohydrogénation of soybean oil by rumen contents in vitro*. *Reproduction, Nutrition, Development*, **36**, 53-63.
130. VAN RANST G., FIEVEZ V., VANDEWALLE M., DE RIEK J., VAN BOCKSTAELE E. (2009). *In vitro study of red clover polyphenol oxidase activity, activation, and effect on measured lipase activity and lipolysis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 6611-6617.
131. WADDINGTON L., CYR T., HEFFORD M., TRUELSTRUP HANSEN L., KALMOKOFF M. (2010). *Understanding the acid tolerance response of bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology*, **108**(4), 1408-1420.
132. WALLACE R.J. (1985). *Synergism between different species of proteolytic rumen bacteria*. *Current Microbiology*, **12**, 59-64.
133. WALLACE R.J. (1986). *Ecology of Rumen Microorganisms : Protein Use*. In *Aspect of digestive physiology of ruminants*. Ithaca, New York (USA) : Comstock Publishing Associated, p. 99-116.

134. WALLACE R.J., Mc KAIN N., SHINGFIELD K. J., DEVILLARD E. (2007). *Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria*. *Journal of Lipid Research*, **48**, 2247–2254.
135. WANG P., QI M., BARBOZA P., LEIGH M.B., UNGERFELD E., SELINGER L.B. (2011). *Isolation of high-quality total RNA from rumen anaerobic bacteria and fungi, and subsequent detection of glycoside hydrolases*. *Canadian Journal of Microbiology*, **57**, 590-598.
136. WILLIAMS A.G., COLEMAN G.S. (1997). The rumen protozoa. In *The rumen microbial ecosystem*. London : Blackie Academic and Professional, p. 73-139.
137. WILLIAMS A.G., COLEMAN G.S. (2012). *The rumen protozoa*. New-York : Springer. 441 p.
138. WOLTER R. (1997). *Alimentation de la vache laitière*. 3<sup>ème</sup> édition. Editions France Agricole. 263 p.
139. WU L., ZHAO M., XIA C., NI H., ZHANG H. (2009). *Isolation, identification and rumen fermentation characteristics of Propionibacterium acnes*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **49**(2), 163-173.
140. YANG S.L., BU D.P., WANG J.Q., HU Z.Y., LI D., WEI H.Y., ZHOU L.Y., LOOR J.J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*, **3**(11), 1562-1569.
141. YU Z., FORSTER R.J. (2005). Nucleic acid extraction, oligonucléotide probes and PCR methods. In *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Amsterdam : Springer, p. 81-104.
142. YU Z., YU M., MORRISON M. (2006). *Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition*. *Environmental Microbiology*, **8**, 603-611.

143. ZE X., DUNCAN S.H., LOUIS P. FLINT H.J. (2012). *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *ISME Journal*, **6**(8), 1535-1543.
144. ZENED A. (2011a). *Particularités du microbiote et son activité lors de la déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10*. Thèse de doctorat universitaire, Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition, Institut National Polytechnique de Toulouse, 336 p.
145. ZENED A., COMBES S., CAUQUIL L., MARIETTE J., ROUSSEAU C., KLOPP C., TROEGELER-MEYNADIER A., ENJALBERT F. (2011b). *The ruminal level of trans-10 fatty acids of dairy cows is linked to the composition of bacterial community*. 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 26-30 Jun 2011, Geneva, Switzerland.
146. ZENED A., COMBES S., CAUQUIL L., MARIETTE J., KLOPP C., BOUCHEZ O., TROEGELER-MEYNADIER A., ENJALBERT F. (2012a). *Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets*. *FEMS Microbiology Ecology*, **83**, 504-514.
147. ZENED A., ENJALBERT F., NICOT M. C., TROEGELER-MEYNADIER A. (2012b). *In vitro study of dietary factors affecting the biohydrogénation shift from trans-11 to trans-10 fatty acids in the rumen of dairy cows*. *Animal*, **6**(3), 459-467.
148. ZHANG L., CHUNG J., JIANG Q., SUN R., ZHANG J., ZHONG Y., REN N. (2017). Characteristics of rumen microorganisms involved in anaerobic degradation of cellulose at various pH values. *Royal Society of Chemistry Advances*, **7**, 40303-40310.



# **ANNEXES**



# ANNEXE 1

## Quantité exacte d'acide linoléique introduit dans chaque milieu de la semaine 1 (g)

		Milieux FLA			Milieux ALA		
		1	2	3	1	2	3
Semaine 1	J1 Matin	0,1020	0,1011	0,1008	0,1006	0,1022	0,1018
	J1 Soir	0,1128	0,1087	0,1039	0,1068	0,1059	0,1052
	J2 Matin	0,1100	0,1052	0,1021	0,1052		0,1006
	J2 Soir	0,1103	0,1032	0,1085	0,1046		0,1020
	J3 Matin	0,1039	0,1082	0,1085	0,1083		0,1005
	J3 Soir	0,1029	0,1059	0,1005	0,1017		0,1045
	J4 Matin	0,1195	0,1093	0,1038	0,1136		0,1027
	J4 Soir	0,1002	0,1063	0,1096	0,1062		0,1038

## Quantité exacte d'acide linoléique introduit dans chaque milieu de la semaine 2 (g)

		Milieux FLA				Milieux ALA			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Semaine 2	J1 Matin	0,1020	0,1017	0,1017	0,1022	0,1007	0,1004	0,1006	0,1000
	J1 Soir	0,1093	0,1085	0,1102	0,1147	0,1130	0,1080	0,1094	0,1128
	J2 Matin	0,1001	0,1018	0,1030	0,102	0,1071	0,1084	0,1081	0,1016
	J2 Soir	0,1056	0,1103	0,1070	0,1116	0,1031	0,1011	0,1018	0,1054
	J3 Matin	0,1028	0,1020	0,1108	0,1147	0,1016	0,1033	0,1108	0,1034
	J3 Soir	0,1022	0,1055	0,1070	0,1081	0,1096	0,1108	0,1073	0,1021
	J4 Matin	0,1050	0,1033	0,1008	0,1046	0,1066	0,1042	0,1066	0,1066
	J4 Soir	0,1099	0,1090	0,1045	0,1073	0,1065	0,1029	0,1111	0,1059

## ANNEXE 2

### Appareillages scientifiques utilisés pour le dosage des acides gras

#### Petit matériel

- Verrerie de laboratoire
  - Tubes de culture en verre Pyrex 18\*100 SVL B1912X
  - Flacons ambrés Fischerbrand E3855H
  - Capsules à sertir Fischerbrand E3844B
- Micropipette « Tarnsferpettor Fix »
- Pipette à répétition HandyStep® / Combitips
- Centrifugeuse 3K15 SIGMA
- Bain thermostaté Isotemp 250 FISCHER SCIENTIFIC
- Agitateur / Culbuteur : Rotator drive STR4 STUART SCIENTIFIC
- Appareil de distribution d'eau ultra pure PUR1TE SELECT
- Agitateur Ms2 Minishaker IKA

#### Appareillage chromatographique

- Chromatographe en phase gazeuse : 6890N, AGILENT Technologies
- Injecteur automatique : 7683 Series, AGILENT Technologies
- Colonne : WCOT fused silica, CP-Sil88, 100 mètres, 0,25 mm de diamètre interne, 0,2 µm d'épaisseur en phase stationnaire

**Balance** : Sartorius, type A120S

#### Station d'acquisition et traitement du signal

- Module d'acquisition : Model 202, SRI Instruments
- Logiciel de retraitement : Peakwin (version 3.28)



## ANNEXE 3

### Réactifs et solvants utilisés pour le dosage des acides gras

<b>Réactifs ou solvants</b>	<b>Qualité</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Référence</b>
Acide nonadécanoïque	Standard pour CPG	Fluka	72332 5 g
Acétylchlorure	Analytical reagent grade	Fischer Scientific	A/0920/PB05
Dichlorométhane	Multisolvent	Scharlau	
Eau	Ultra pure	Système PUR1TE SELECT	
Hexane	HPLC grade	Fischer Scientific	H/0406/15
Hydroxyde de sodium	Qualité analytique	Fischer Scientific	S/4920/60
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Qualité analytique	Merck	104298.1000
Méthanol	HPLC grade	Fischer Scientific	M/4056/15

## ANNEXE 4

### Analyse statistique concernant le pH

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,04627	1	0,04627	1,49762	0,23600
<b>Substrat (F ou A)</b>	226,39625	1	226,39625	7327,40559	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00025	1	0,00025	0,00801	0,92962
<b>Substrat x C18:2</b>	0,04656	1	0,04656	1,50703	0,23459

# ANNEXE 5

## Analyse statistique concernant les AGV

- AGV totaux

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	1445,03814	1	1445,03814	27,80634	<b><u>0,00004</u></b>
<b>Substrat (F ou A)</b>	59022,75176	1	59022,75176	1135,75306	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	39,76478	1	39,76478	0,76518	0,39264
<b>Substrat x C18:2</b>	52,79550	1	52,79550	1,01592	0,32615

- Pourcentage de C2

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	650,15178	1	650,15178	4,97231	0,03802
<b>Substrat (F ou A)</b>	3677,30267	1	3677,30267	28,12371	<b><u>0,00004</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	146,78012	1	146,78012	1,12256	0,30265
<b>Substrat x C18:2</b>	249,01855	1	249,01855	1,90447	0,18360

- Pourcentage de C3

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	19,20869	1	19,20869	1,0171	0,32481
<b>Substrat (F ou A)</b>	2022,61027	1	2022,61027	107,58251	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	62,25320	1	62,25320	3,31124	0,08460
<b>Substrat x C18:2</b>	179,87048	1	179,87048	9,56730	<b><u>0,00599</u></b>

- Pourcentage de C4

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	138,16521	1	138,16521	3,52096	0,07604
<b>Substrat (F ou A)</b>	99,56445	1	99,56445	2,53727	0,12769
<b>Ajout de C18:2</b>	5,45228	1	5,45228	0,13894	0,71346
<b>Substrat x C18:2</b>	10,97564	1	10,97564	0,27970	0,60302

- C2/C3

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	49,21152	1	49,21152	2,24031	0,15088
<b>Substrat (F ou A)</b>	618,77331	1	618,77331	28,16911	<b><u>0,00004</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,12652	1	0,12652	0,00576	0,94030
<b>Substrat x C18:2</b>	25,93915	1	25,93915	1,18086	0,29078

## ANNEXE 6

### Analyse statistique concernant les phyla bactériens

- Actinobacteria

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00113	1	0,00113	2,21110	0,15343
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,12345	1	0,12345	241,13698	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00941	1	0,00941	18,37774	<b><u>0,00040</u></b>
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00937	1	0,00937	18,29861	<b><u>0,00041</u></b>

- Bacteroidetes

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,22810	1	0,22810	15,04461	<b><u>0,00101</u></b>
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,34211	1	0,34211	22,56457	<b><u>0,00014</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,06256	1	0,06256	4,12623	0,05645
<b>Substrat x C18:2</b>	0,01466	1	0,01466	0,96671	0,33786

- Firmicutes

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,01282	1	0,01282	1,50983	0,23417
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,57465	1	0,57465	67,66839	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,08117	1	0,08117	9,55880	<b><u>0,00600</u></b>
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00055	1	0,00055	0,06480	0,80179

- Proteobacteria

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,12167	1	0,12167	3,55996	0,07457
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,21906	1	0,21906	6,40956	0,02033
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00377	1	0,00377	0,11038	0,74335
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00016	1	0,00377	0,00461	0,94658

# ANNEXE 7

## Analyse statistique concernant les genres bactériens

- *Acetitomaculum*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00001	1	0,00001	0,01994	0,88920
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,00762	1	0,00762	28,20499	<b>0,00004</b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,0021	1	0,00762	0,78241	0,38746
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00008	1	0,00008	0,28707	0,59832

- *Bifidobacterium*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00429	1	0,00429	0,24242	0,62811
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,66355	1	0,66355	37,52827	<b>0,00001</b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00766	1	0,00766	0,43340	0,51822
<b>Substrat x C18:2</b>	0,13730	1	0,13730	7,76520	<b>0,01176</b>

- *Butyrivibrio*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00018	1	0,00018	0,59372	0,45046
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,01201	1	0,01201	38,87716	<b>0,00001</b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00225	1	0,00225	7,28900	<b>0,01419</b>
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00110	1	0,00110	3,56043	0,07455

- *Christeusenellaceae R7 group*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00157	1	0,00157	1,97521	0,17604
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,01356	1	0,00157	17,00141	<b>0,00058</b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00064	1	0,00064	0,80301	0,38141
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00160	1	0,00064	2,00489	0,17298

- *Eubacterium*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00004	1	0,00004	0,15764	0,69604
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,00886	1	0,00886	31,87260	<b>0,00002</b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00007	1	0,00007	0,24287	0,62779
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00182	1	0,00182	6,53427	0,01930

- *Lachnospira*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00390	1	0,00390	3,04318	0,09723
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,01754	1	0,01754	13,69517	<b>0,00152</b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00000	1	0,00000	0,00269	0,95920
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00410	1	0,00410	3,20456	0,08938



- *Lactobacillus*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00503	1	0,00503	0,06181	0,80633
<b>Substrat (F ou A)</b>	5,51042	1	5,51042	67,74445	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,02230	1	0,02230	0,27412	0,60664
<b>Substrat x C18:2</b>	0,26190	1	0,26190	3,21979	0,08868

- *Prevotella*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,02351	1	0,02351	1,57187	0,22514
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,76196	1	0,76196	50,94984	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,02506	1	0,02506	1,67568	0,21101
<b>Substrat x C18:2</b>	0,10339	1	0,10339	6,91336	0,01652

- *Prevotellaceae UCG*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00000	1	0,00000	0,00029	0,98648
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,00545	1	0,00545	54,91744	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00002	1	0,00002	0,20197	0,65822
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00189	1	0,00189	0,63262	0,43622

- *Pseudobutyrvibrio*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00004	1	0,00189	0,21691	0,64670
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,00846	1	0,00846	44,10433	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00000	1	0,00846	0,00490	0,94491
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00025	1	0,00025	1,30409	0,26766

- *Rikenellaceae RC9 gut group*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00470	1	0,00470	1,53994	0,22973
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,12860	1	0,00470	42,17601	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00766	1	0,00766	2,51355	0,12937
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00000	1	0,00000	0,00130	0,97162

- *Ruminoclostridium*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00031	1	0,00031	4,25740	0,05301
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,00399	1	0,00399	54,91666	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00086	1	0,00086	11,90263	<b><u>0,00268</u></b>
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00051	1	0,00051	6,95911	0,01621

- *Ruminobacter*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00150	1		1,07763	0,31226
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,02033	1		14,58676	<b><u>0,00116</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,01124	1		8,06521	<b><u>0,01047</u></b>
<b>Substrat x C18:2</b>	0,02479	1		17,78313	<b><u>0,00047</u></b>

- *Ruminococcaceae NK4A214 group*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00008	1	0,00008	0,18951	0,66823
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,00819	1	0,00819	18,40691	<b><u>0,00039</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00021	1	0,00021	0,48264	0,49564
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00412	1	0,00412	9,25411	<b><u>0,00671</u></b>

- *Ruminococcaceae UCG*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,00008	1	0,00008	0,31282	0,58249
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,01351	1	0,01351	50,21299	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00074	1	0,00074	2,75288	0,11350
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00000	1	0,00074	0,01409	0,90677

- *Ruminococcus*

Variable	SS	df	MS'	F	p
<b>Semaine</b>	0,01640	1	0,01640	44,77441	<b><u>0,00000</u></b>
<b>Substrat (F ou A)</b>	0,00141	1	0,01640	3,85231	0,06449
<b>Ajout de C18:2</b>	0,00168	1	0,00168	4,57499	0,04564
<b>Substrat x C18:2</b>	0,00010	1	0,00010	0,28267	0,60112



**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

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

Je soussignée, **Annabelle MEYNADIER**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **CHAUMETON Justine** intitulée «**Mise au point de milieux de culture sélectifs pour l'étude de la biohydrogénation ruminale** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 20 mars 2018  
Docteur **Annabelle MEYNADIER**  
Maître de Conférences  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :  
La Directrice de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
**Isabelle CHMITELIN**



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur **Thierry LEVADE**



Mlle **CHAUMETON Justine**  
a été admis(e) sur concours en : 2015  
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 09/07/2015  
a validé son année d'approfondissement le : 03/11/2016  
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

Vu et autorisation de l'impression :  
Président de l'Université  
**Paul Sabatier**  
Monsieur **Jean-Pierre VINEL**

Le Président de l'Université Paul Sabatier  
par délégation,  
La Vice-Présidente de la CEVU



Régine **ANDRE-OBRECHT**

Toulouse, 2018

**NOM** : CHAUMETON

**Prénom** : Justine

**TITRE** : MISE AU POINT DE MILIEUX DE CULTURE SELECTIFS POUR L'ETUDE DE LA BIOHYDROGENATION RUMINALE

**RESUME**

L'objectif de notre étude est de mettre au point différents milieux de culture de contenu ruminal afin de trouver les conditions nécessaires pour sélectionner les populations microbiennes à l'origine de la voie t11, de la voie t10 et de l'isomérisation finale en acide stéarique de la biohydrogénation de l'acide linoléique. Divers paramètres ont été évalués pendant 96 heures : pH, acides gras volatils, activités microbiennes, microbiote. Les milieux riches en fibres ont permis la sélection de bactéries fibrolytiques. Les deux voies de la BH ont été favorisées, avec une accumulation des isomères t11 plus marquée. L'ajout de c9,c12-C18:2 semblerait privilégié la voie t11. Les milieux riches en amidon ont déviés vers une acidose lactique. Le microbiote est restreint aux genres *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* et *Prevotella*. Les activités microbiennes sont quasi nulles, mais un inversement du ratio t10/t11 est néanmoins observé, suggérant une déviation de la voie t11 vers la voie t10.

**MOTS CLES** : Biohydrogénation, rumen, acide linoléique, voie trans 11, voie trans 10, alimentation

---

**TITLE** : DEVELOPMENT OF SELECTIVE CULTURE MEDIA TO STUDY RUMINAL BIOHYDROGENATION

**ABSTRACT**

Our study aims to devise various culture media of ruminal contents to find necessary conditions to select microbial populations behind the t11 pathway, the t10 pathway and the final isomerization in stearic acid of biohydrogenation of linoleic acid. Various parameters are evaluated during 96 hours: pH, volatile fatty acids, microbial activities, microorganisms. High-fiber environment enabled the selection of fibrolytic bacteria. Both pathway of BH were favoured, with a higher accumulation of t11 isomers. Addition of c9,c12-C18:2 would seem favouring the t11 pathway. High-starch environment diverted lactic acidosis. Microbial population is restricted to genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Prevotella*. Microbial activities are almost zero, but an inversion of ratio t10/t11 is nevertheless observed, suggesting a shift from t11 to t10 pathway.

**KEYWORDS** : Biohydrogenation, rumen, linoleic acid, t11 pathway, t10 pathway, diet