

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

**Effet de la source d'azote sur les principaux groupes
bactériens du rumen de bovin – cas des cellulolytiques.**

Présenté et soutenu par : *Djouablia Hadjer*

Le : 30/06/2016

Devant le jury d'évaluation :

Président du jury : *Khelifi Douadi* (Professeur - UFM Constantine),
Encadreur : *Haddi Mohamed-Laid* (Professeur - UFM Constantine),
Examineur : *Kadem Dhaou el Djabine* (Professeur - UFM Constantine),
Examinatrice : *Benchiheub Meriem* (Maitre-Assistante A - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

*Nous remercions notre encadreur de ce mémoire monsieur **M. HADDI M.L**, Professeur à l'Université de Constantine, pour son encadrement tout au long de la réalisation de ce travail, pour sa patience et ses précieux conseils.*

*Nous remercions le Prof **Khelifi**, pour avoir accepté d'assurer la président du jury.*

*Nous remercions le Prof **Kadem DED**, et Mme **Benchiheub M** qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger notre travail.*

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A mes très chers parents Fatima et Ali qui ont toujours été là pour
moi.*

A mes sœurs Halima et Zineb.

A mes frères Nasser, Amar et Abdou.

A mes neveux Abd Elrahman, Mohamed Amine, Soheib ;

et mes petites nièces Layane et Imane.

A toutes ma famille.

Tous mes amies chacune en son nom

Hadjer

Table des matières

Introduction générale	1
------------------------------------	---

Chapitre I: Synthèse bibliographique

1. Caractéristiques physico-chimiques du milieu ruminal	2
1.1. Anaérobiose	2
1.2. Potentiel d'oxydoréduction	3
1.3. pH	3
1.4. Température	3
1.5. Pression osmotique	3
1.7. Humidité	4
2. Ecosystème microbien du rumen	4
2.1. Procaryotes	4
2.1.1. Les bactéries	5
2.1.1.1. Classification en fonction de leur localisation dans le rumen	5
2.1.1.2. Classification selon leur fonction dans le rumen	5
2.1.2. Les archeae	9
2.2. Eucaryotes	9
2.2.1. Les protozoaires	9
2.2.2. Les champignons	10
2.2.3. Les virus	10
3. Métabolisme ruminal	10
3.1. Métabolisme glucidique	10
3.1.1. Les glucides structuraux	11
3.1.2. Les glucides non structuraux	11
3.1.3. Les composées phénoliques	17
3.2. Métabolisme azoté	18
4. Les sources d'azote alternatives	22
4.1. Bicarbonate d'ammonium	22
4.2. Glutamate de sodium	22
4.3. Nitrate de potassium	22
4.4. Extrait de levure.....	24

Chapitre II : matériel et méthodes

1. Matériel	25
2. Méthodes	25
2.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'inoculum	26
2.1.1. Potentiel d'oxydoréduction	26
2.1.2. pH	26
2.1.3. Température	26
2.1.4. Matière sèche	26
2.1.5. Matière organique et matière minérale	27
2.2. Caractéristiques microbiologiques de l'inoculum	28

3. Epuisement de l'azote et de l'énergie résiduels	29
3.1. Les sources d'azote sont-elles utilisées comme source d'énergie ?	29
3.2. Effet des sources d'azote sur les principaux groupes bactériens	30
3.2. Effet des sources d'azote sur les principaux groupes bactériens	30
3.2.1. Sources d'azote.....	30
3.2.2. Sources d'énergie	30
4. Préparation des milieux d'incubation	30
4.1. Milieu d'épuisement	31
4.2. Milieu de fermentation	32
5. Incubation	32
5.1. Phase d'épuisement	32
5.2. Phase de fermentation	32
5.2.1. Utilisation des sources d'azote comme source d'énergie	32
5.2.2. Effet des sources d'azote sur les différents groupes bactériens	33
5.2.3. L'effet des sources d'azote sur les bactéries cellulolytiques	34
5.3. Mesure de l'activité métabolique	34
5.4. Expression des résultats	35
5.5. Mesure de pH finale après fermentation	35
5.5. Examen du Gram après fermentation	35

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractéristiques physico-chimiques du liquide ruminal	36
1.1. Le pH	36
1.2. Le rH	36
1.3. Matière organique, matière minérale, matière sèche	37
2. Caractéristiques microbiologiques de liquide ruminal	37
3. Epuisement de l'azote et de l'énergie résiduels	38
4. Utilisation de sources d'azotes alternatives comme sources d'énergie	39
5. Effet des sources d'azote inorganique sur les principaux groupes bactériens du rumen	42
5.1. Effet du bicarbonate d'ammonium	42
5.2. Effet du nitrate de potassium	44
6. Effet des sources d'azote organique sur les principaux groupes bactériens du rumen ...	46
6.1. Effet du glutamate de sodium	46
6.2. Effet de l'extrait de levure	48
7. Effet des quatre sources d'azote sur les bactéries cellulolytiques	50
8. Tableaux récapitulatifs des temps de latence, du volume maximum, des pentes de production de gaz et des pH finaux	52
8.1-Tableau récapitulatif des temps de latence.....	52
8.2-Tableau récapitulatif des volumes maximum.....	53
8.3 -Tableau récapitulatif des pentes de production de gaz.....	54
8.4 -Tableau récapitulatif des pH finaux	55
Conclusion générale	56
Références bibliographique.....	57

Liste des tableaux

Tableau 1 - Caractéristiques de quelques bactéries du rumen.....	8
Tableau 2 - Composition, toxicité et prix des sources d'azote alternatives	24
Tableau 3 - Procédure de coloration de Gram selon Kopeloff.....	29
Tableau 4 - Composition de milieu tamponné	31
Tableau 5 - Essai sur l'utilisation d'azote comme source d'énergie.	33
Tableau 6 - Essai de l'effet des sources d'azote sur les groupes bactériens	33
Tableau 7 - Essai sur l'effet de sources d'azote sur le groupe cellulolytiques.	34
Tableau 8 - Caractéristiques physicochimique de liquide ruminal	36
Tableau 9 - Volume maximum et minimum (en ml) de production de gaz lors des différents prélèvements,	38
Tableau 10 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'azote.	40
Tableau 11 - Variation du pH après fermentation de sources d'énergie	41
Tableau 12 - caractéristiques cinétique de la dégradation des sources d'énergie en présence de bicarbonate d'ammonium.	42
Tableau 13 - variation du pH cinétique de production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie en présence de bicarbonate d'ammonium.	43
Tableau 14 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'énergie en présence du nitrate de potassium.	44
Tableau 15 - Variation du pH après fermentation des sources d'énergie en présence du Nitrate de potassium.	45
Tableau 16 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium.	46
Tableau 17 - variation du pH après fermentation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium.	47
Tableau 18 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'énergie en présence de l'extrait de levure.	48
Tableau 19 - Variations du pH après fermentation des sources d'énergie en présence de l'extrait de levure.	50
Tableau 20 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation de cellulose en présence de des différentes sources d'énergies.	50
Tableau 21 - Variations du pH après fermentation de la cellulose en présence des différentes sources d'azote.	51
Tableau 22 - Tableau récapitulatif de temps de latence lors de la fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote (h).	52
Tableau 23 - Tableau récapitulatif du volume maximum lors de la fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote (ml de gaz).	53
Tableau 24 - Tableau récapitulatif des pentes de production de gaz lors de la fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote.	54
Tableau 25 - Tableau récapitulatif des pH finaux après fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote.	55

Liste des figures

Figure 1 - Plusieurs protozoaires ciliés du rumen appartenant au genre <i>Ostracodinium sp.</i> Fixés sur des particules alimentaires	9
Figure 2 - Dégradation et utilisation des glucides par les bactéries ruminales.....	11
Figure 3 - Digestion et absorption des glucides chez les ruminants	11
Figure 4 - Polymères des tissus végétaux	12
Figure 5 - Deux chaînes de cellulose forme de résidus glucose liés en β 1-4	13
Figure 6 - Structure de la liaison β 1-4	13
Figure 7 - Mécanisme de la dégradation de cellulose	14
Figure 8 - Structure de l'hémicellulose	15
Figure 9 - Structure de la pectine	15
Figure 10 - Structure de la liaison α 1-4	16
Figure 11 - Structure de l'amidon.....	16
Figure 12 - Mode d'action de l'amylase α , de l'amylase β et de la maltase lors de la composition de l'amidon en molécule de glucose.....	17
Figure 13 - Dégradation des composés azotés dans le rumen	19
Figure 14 - Structure tertiaire d'une protéine	20
Figure 15 - dégradation des protéines et leurs produits finaux dans le rumen	21
Figure 16 - Digestion et absorption des protéines	21
Figure 17 - Structure de l'acide glutamique	22
Figure 18 - Utilisation et dégradation de nitrate et nitrite	23
Figure 19 - Matière sèche dans le dessiccateur après séchage.	27
Figure 20 - Réduction du milieu d'épuisement sous CO_2	31
Figure 21 - Virage de couleur lors de réduction de milieu de fermentation.....	32
Figure 22 - Appareil de mesure de gaz en anaérobiose.	35
Figure 23 - Trois spots signalés lors de la fermentation.	35
Figure 24 - Observation microscopique des bactéries Gram ⁺ et Gram ⁻ du liquide ruminal tel quel	37
Figure 25 - Observation microscopique des bactéries Gram ⁺ et Gram ⁻ du liquide ruminal filtré... ..	38
Figure 26 - Courbes d'épuisement des différents essais.....	39
Figure 27 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'azote.	40
Figure 28 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie en présence de bicarbonate d'ammonium	42
Figure 29 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie en présence du nitrate de potassium.	45
Figure 30 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium.....	47
Figure 31 - Production du gaz durant la fermentation des sources d'énergie en présence de l'extrait de levure.	49
Figure 32 - Production de gaz durant la fermentation de la cellulose en présence des sources d'azote.	51

Liste des abréviations

AGV : acides gras volatils

ATP : adénosine triphosphate

CV : coefficient de variation

LR : liquide ruminal

LRF : liquide ruminal filtré

LRTQ : liquide ruminal tel quel

MF : matière fraîche

MM : matière minérale

MO : matière organique

MS : matière sèche

mOsm : molliosmole

mV: millivolt

NH₃ : ammoniac

NH₄⁺ : ion ammonium

NO₂⁻ : ion nitrite

NO₃⁻ : ion nitrate

pH : potentiel d'hydrogène

pHi : potentiel d'hydrogène initial

rH : potentiel redox

Introduction

Générale

Introduction

En Algérie, l'élevage avec toutes ses filières (Cuniculiculture, Apiculture, Oviculture, etc.) et en particulier celui des bovins (Boviculture) est appelé à combler un déficit en matière de produits carnés et de produits laitiers.

La réussite d'une telle opération, visant à répondre aux besoins alimentaires d'une population en constante augmentation, nécessite impérativement une prise en charge du cheptel bovin à savoir satisfaire ses besoins plastiques (apports azotés) et énergétiques (hydrates de carbonés).

Mais l'élevage en Algérie reste confronté en premier lieu à l'insuffisance de l'offre fourragère. En second lieu, aux aléas climatiques qui conditionnent fortement le niveau des productions et de la productivité.

Pour atteindre un bon niveau de production il faut concevoir une ration qui apporte les différentes sources d'énergies glucidique ou fibreuse et protéiques.

Dans le contexte de ce travail et pour palier à ces insuffisances nous avons recouru à une expérimentation *in vitro* faisant intervenir la flore bactérienne anaérobie du rumen et son influence sur une batterie de substituts alimentaires d'appoint azotés et glucidiques.

Ainsi des fermentations azotées ont été réalisées avec quatre sources d'azote (bicarbonate d'ammonium, glutamate de sodium, nitrate de potassium et extrait de levure), et des fermentations à base d'hydrates de carbone comme source d'énergies (cellulose, amidon, pectine, xylane et caséine).

L'objectif essentiel de notre étude consiste à évaluer l'activité métabolique de la flore microbienne du rumen et déterminer la source d'azote la mieux utilisée comme source d'énergie d'une part et quelle est la source d'azote qui stimule mieux les groupes bactériens du rumen d'autre part, dans un but de savoir si la source d'azote peu coûteuse peut stimuler l'activité métabolique du rumen.

Enfin, cette étude s'intègre dans le cadre d'une action de valorisation des produits d'appoints azotés et glucidiques en vue de sélectionner les meilleures souches.

Elle comprendra deux grandes parties, où nous exposons dans la première toute une revue bibliographique dans laquelle, il sera essentiellement traité des références ayant trait à notre thème. La seconde partie traitera de nos travaux personnels, où nous aborderons dans un premier lieu, la présentation du matériel, de la méthodologie, ce premier point sera suivi de l'exposé des résultats obtenus, lesquels seront interprétés et discutés dans une seconde partie, enfin nous terminerons notre travail par une conclusion suivie de recommandations.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les ruminants sont des mammifères herbivores possédant un estomac constitué de quatre compartiments : la caillette (abomasum), l'équivalent de l'estomac des monogastriques, du réseau (réticulum), du feuillet (omasum) et de la pance ou rumen, le réservoir proventriculaire le plus volumineux (Belbis, 2007; Mebirouk, 2014). Cet ensemble occupe environ 70% du volume totale du tube digestif qualifiant les ruminants de polygastriques (Clos, 2011; Mebirouk, 2014).

1. Caractéristiques physico-chimiques du milieu ruminal

Le milieu ruminal est un milieu relativement constant qui évoque à certains égards celui d'un réacteur en continu de microorganismes anaérobies. Il se caractérise par les conditions physico-chimiques (Thivend *et al.*, 1985).

1.1. Anaérobiose

Le rumen, principal réservoir digestif des ruminants, est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie où les apports d'oxygène sont très faibles : déglutition, l'ingestion des aliments lors de la mastication, avec l'eau de boisson et diffusion à partir des vaisseaux de la paroi ruminale (Zened, 2011).

La zone proche de l'épithélium est très vascularisée. Il s'y fixe une population microbienne facultativement aérobie qui contribue à l'élimination des traces d'oxygène, ce qui permet de maintenir l'écosystème en anaérobiose (Briki et Debar, 2009).

Le milieu ruminal est ce fait très réducteur, et le métabolisme des microorganismes qu'il héberge est de type fermentaire. Ce qui permet la libération de composés organiques (acétate, lactate, butyrate, propionate), et non pas de gaz carbonique et d'eau comme dans le cas de la respiration (Belbis, 2007).

1.2. Potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel redox (rH) d'un rumen sain et en fonctionnement est négatif lorsqu'il est mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène de -150 mV à -250 mV (Bonfont, 2008). Ces valeurs négatives traduisent le caractère hautement réducteur du rumen appauvri en oxygène (Zened, 2011).

1.3. pH

La valeur du pH du rumen est comprise dans une large gamme, entre 5.5 et 7.3 (Zened, 2011). Ce pH est la résultante d'un équilibre entre des acides faibles et des bases faibles. Les principaux acides sont les AGV et l'acide lactique, produits des fermentations microbiennes. Les principales bases sont l'ammoniac (NH_3), le bicarbonate et le phosphate. Le NH_3 est le produit de la protéolyse, il peut également diffuser à travers la paroi du rumen. Le bicarbonate et le phosphate sont principalement sécrétés par les glandes salivaires et jouent un rôle tampon (Dusart, 2014).

1.4. Température

La température ruminale est sensiblement supérieure à la température corporelle, d'au moins un degré par rapport à la température centrale, c'est-à-dire comprise entre $39,5^\circ\text{C}$ et 40°C . Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide : de 5 à 10°C pour une à deux heures. (Belbis, 2007 ; Zened, 2011).

1.5. Pression osmotique

De l'ordre de grandeur de celle du sang, la pression osmotique varie dans une plus grande gamme de 200 à 400 mOsm/l. (Belbis, 2007). Si le milieu sanguin est hyperosmotique il y a passage d'eau du secteur vasculaire au rumen. S'il est hypo-osmotique passage d'eau du rumen au secteur vasculaire.

1.6. Phase gazeuse

La composition moyenne de l'atmosphère de rumen est la suivante (Briki et Debab ,2009) :

CO ₂	60-65%
CH ₄	25-30%
N ₂	6-9%
O ₂	0,3-0,6%
H ₂	0,1-0,3%
H ₂ S.....	0,01%

1.7. Humidité

L'humidité est en moyenne de l'ordre de 85% (Zened, 2011), néanmoins cette valeur est variable en fonction des apports hydriques réalisés par les aliments, l'eau de boisson et la salive (Bonfont, 2008).

2. Ecosystème microbien du rumen

Le milieu ruminal est caractérisé par la diversité de la microflore (bactéries, champignon, protozoaire, et bactériophage) et par sa capacité à fournir l'énergie et les protéines à l'animal.

2.1. Les microorganismes procaryotes

2.1.1. Les bactéries

Le rumen héberge de 10^9 à 10^{11} bactéries par ml de jus de rumen qui représentent la moitié de la biomasse microbienne. Cette dernière joue un rôle fondamental et peut s'adapter au ratio alimentaire (Clos, 2011).

Il existe deux types de classification des bactéries :

- ✓ classification en fonction de leur localisation dans le rumen ;
- ✓ classification selon leur fonction dans le rumen.

2.1.1.1. Classification en fonction de leur localisation dans le rumen

Les bactéries ruminales sont classifiées en quatre groupes, en fonction de leur localisation dans le rumen :

- les bactéries libres, associées à la phase liquide ruminal ;
- les bactéries associées avec les particules alimentaires ;
- les bactéries associées à l'épithélium ruminal ;
- les bactéries attachées à la surface des protozoaires.

Les bactéries libres, associées à la phase liquide ruminale

C'est le cas de nombreuses espèces bactériennes fermentaires qui consomment des substrats solubles et de nombreux protozoaires qui ingèrent des particules alimentaires (Leulmi, 2011).

Les bactéries associées avec les particules alimentaires

À la surface des particules alimentaires se forme un biofilm au sein duquel cohabitent plusieurs espèces de bactéries, de protozoaires et de champignons (Amokrane, 2010).

Les bactéries associées à l'épithélium ruminal

Sont principalement des bactéries anaérobies facultatives, Gram positif, immobiles et utilisant l'oxygène qui arrive dans le rumen via la circulation sanguine (Belbis, 2007).

Les bactéries et archaebactéries attachées à la surface des protozoaires

Ces bactéries adhérentes représentent 1-10 % de la flore totale du rumen. Le nombre des bactéries fixées sur chaque protozoaire dépend de la taille de ce dernier (Leulmi, 2011).

2.1.1.2. Classification selon leur fonction dans le rumen

Les bactéries du rumen ont été classifiées généralement selon leur capacité à dégrader certains substrats et à les utiliser pour leur survie. Néanmoins, les bactéries pouvant dégrader plusieurs types de substrats, certaines espèces peuvent se retrouver dans plusieurs catégories (Dusart, 2014).

Nous verrons dans un premier temps les bactéries dégradant les glucides (cellulolytiques, hémicellulolytiques, amylolytiques, pectinolytiques), puis celles dégradant les protéines (protéolytiques) et enfin celles intervenant dans le métabolisme des lipides (lipolytiques).

Les bactéries cellulolytiques

Ces bactéries peuplent le rumen trois à quatre jours après la naissance de l'animal, leur nombre ne dépasse jamais 25% de la population bactérienne.

Deux types de bactéries cellulolytiques sont trouvés dans le rumen :

- **des bacilles**_: parmi lesquelles sont majoritairement isolées *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrisolvens*) ;
- **des coques**_: représentés par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus*) (Belbis, 2007).

Ils sont très sensibles au pH acide, leur développement lent mais bien développés avec les régimes riches en fourrage, leur métabolisme, aussi lent, ils hydrolysent la cellulose et l'hémicellulose avec production de l'acétate, du propionate, un peu de butyrate et du CO₂. Utilisent l'azote sous forme d'ammoniac (Toutain, 2008).

Certaines bactéries cellulolytiques sont également amylolytiques. Les espèces non cellulolytiques: *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophylus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinomonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium* (Belbis, 2007).

Les bactéries hémicellulolytiques

Les principales bactéries hémicellulolytiques sont *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, ainsi que les *Ruminococci* (Belbis, 2007).

Elles sont aussi sensibles au pH acide, utilisent l'azote sous forme d'ammoniac, leur développement lente bien développés avec les régimes riches en fourrage (Toutain, 2008).

Les bactéries amylolytiques

La plupart des amylolytiques sont sensibles aux antibiotiques, bien développées avec un régime riche en grain et tolèrent des pH plus acides, digèrent l'amidon et produisent plus de propionate que les cellulolytiques, du butyrate et des lactates (Toutain, 2008).

Les bactéries protéolytiques

Il n'existe pas de bactéries protéolytiques strictes, ce sont en grande partie les bactéries amylolytiques (et certaines bactéries fibrolytiques) qui exercent cette fonction. Près de la moitié des souches bactériennes du rumen possèdent ainsi une activité protéolytique (Dusart, 2014).

Les espèces ayant une activité protéolytique intense sont *R. amylophilus*, *P. ruminicola*, *B. fibrisolvans* et *S. ruminantium*, peuvent utiliser les acides aminés comme source d'énergie (Dusart, 2014; Mebirouk, 2014).

Les bactéries pectinolytiques

La digestion de la pectine est assurée par un certain nombre de bactéries, parmi lesquelles *Lachnospira multiparus*, *Butyrivibrio fibrisolvans*, *Prevotella ruminicola*.

Les souches de *Lachnospira multiparus*, se présentent sous la forme de bacilles incurvés Gram positif (Belbis, 2007).

Les bactéries lipolytiques

Un certain nombre de bactéries ruminales sont impliquées dans l'utilisation des lipides présents dans le rumen. *Anaerovibrio lipolytica* est la bactérie la mieux connue pour son activité lipasique, elle capable d'utiliser le glycérol et les triglycérides (Belbis, 2007; Mebirouk, 2014).

Les bactéries qui fermentent les sucres simples

Un grand nombre d'espèces bactériennes ruminale sont capables de dégrader les glucides simples. Lorsque l'animal est alimenté avec des aliments riches en glucides rapidement fermentescibles, le milieu devient très acide et c'est dû à la prolifération des lactobacilles en compagnie de *S. bovis* (Amokrane, 2010).

Tableau1 - Caractéristiques de quelques bactéries du rumen (Briki et Debab ,2009).

Espèce	Gram	Forme	Produits de fermentation	Type de substrat dégradé
<i>Prevatella ruminicata</i>	-	Bâtonnet	Acétate, succinate (Formate, propionate, isobutyrate, butyrate, isovolérate, lactate)	Hémicellulose, protéines
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	-	Bâtonnet	Formate, acétate, succinate (lactate)	Amidon
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	-	Bâtonnet	Acétate, succinate (formate, propionate, isovolérate)	Cellulose
<i>Setenomonas ruminantium</i>	-	Croissant	Lactate, propionate, acétate, H ₂ , CO ₂	Protéines Sucres
<i>Butyrivibrio Fibrisolvans</i>	-	Bâtonnet courbé	Formate, butyrate, acétate, H ₂ , CO ₂ (Lactate, succinate)	Répondue cellulolytique
<i>Anaerovibrio lipolytica</i>	-	Bâton	Propionate, succinate, acétate H ₂ , CO ₂ (lactate)	Lipides
<i>Vibrio (wolinella) succinogenes</i>	-	Vibrion	Succinate H ₂ , CO ₂	Baisse H ₂
<i>Succinivibrio dextinosolvans</i>	-	Vibrion	Acétate, succinate (Formiate, lactate)	Dextrines
<i>Treponema bryantii</i>	-	Hélice	Formate, acétate, succinate	Sucres
<i>Veillanella parvula</i>	-	Coque	Acétate, propionate, H ₂ (Lactate)	Lactate
<i>Sucinomonas amylolytica</i>	-	Coque ou bâton	Succinate (acétate, propionate)	Amidon
<i>Ruminococcus albus</i>	+	Coque	Acétate, éthanol, CO ₂ (formate, lactate)	Cellulose
<i>Ruminococcus flavifaciens</i>	+	Coque	Acétate, succinate, H ₂ (formiate, lactate)	Cellulose
<i>Streptococcus bovis</i>	+	Coque	Lactate, CO ₂ (Formiate, acétate, éthanol)	Amidon
<i>Lachnospira multiparus</i>	+	Bâton	Formate, acétate, lactate, H ₂ (succinate, éthanol)	Pectine
<i>Eubacterium ruminantium</i>	+	Bâton	Formate, butyrate, lactate, CO ₂ (succinate, éthanol)	Xylanes, sucres
<i>Lactobacillus ruminis</i>	+	Bâton	Lactate	Sucres
<i>Methanosarcina barkerii</i>	+	Cocci sphérique, isolés	Méthane (CH ₄)	Formiate
<i>Methanobacter ruminantium</i>	+	Bacille Ovale, Coccoide, Court	Méthane (CH ₄)	Formiate
<i>Methanobacterium formteium</i>	-	Bacille Long (Filament)	Méthane (CH ₄)	Formiate

2.1.2. Les archeae

Il s'agit de bactéries anaérobies strictes, représentent environ 4% des microorganismes ruminiaux. *Methanobrevibacter ruminantium* la plus souvent rencontrée chez les bovins (Mordjane, 2011).

2.2. Les microorganismes eucaryotes

2.2.1. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes. On distingue deux types dans le rumen : les flagellés et les ciliés (Briki et Debab, 2009). Ces derniers représentent la majorité, ils sont distribués entre les particules solides et la phase liquide et représentés par deux groupes (Les holotriches et les entodiniomorphes), tous les deux de la sous classe des *Trichostomatia*.

Ils sont soit fixés sur les particules alimentaires soit libres (figure 1). Les Holotriches utilisent essentiellement les glucides solubles, tandis que peu d'entodiniomorphes en sont capables. Les ciliés ont la capacité d'ingérer l'amidon sous forme de granules, ceci est essentiellement le fait d'*Isotricha*. Ce qui contribue à limiter la chute de pH liée à la dégradation de l'amidon (Amokrane, 2010).



Figure 1 - Plusieurs protozoaires ciliés du rumen appartenant au genre *Ostracodinium* sp. Fixés sur des particules alimentaires (Jouany, 2002).

2.2.2. Les champignons

Les champignons représentent environ 8% de la biomasse microbienne. Trois genres ont été identifiés : *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Caecomycetes*. Leur zoospores se fixent sur des tissus végétaux.

Ces champignons sécrètent de nombreuses enzymes intervenant dans la digestion des glucides pariétaux. Ils ont une activité protéolytique faible. Leur contribution à la dégradation des glucides cytoplasmiques est peu connue (Dusart, 2014).

2.2.3. Les virus

La communauté virale est constituée de bactériophages, 125 types morphologiques ont été observés dans le rumen. Leur rôle parmi la population microbienne n'est pas bien connu (Briki et Debab, 2009).

3. Métabolisme ruminal

Le rumen, principal réservoir digestif des ruminants, constitue un écosystème anaérobie stricte où la plupart des constituants des aliments sont dégradés et fermentés par une microflore et une microfaune extrêmement nombreuse et diversifiée (Les bactéries anaérobies, les protozoaires, et les champignons) (Gouet *et al.*, 1986).

Ces microflores et microfaune produisent les enzymes capables de digérer des glucides, des protéines et des lipides pour produit en générale des acides gras volatils (acétate, propionate, butyrate), méthane ,CO₂ et ammoniac (NH₃) (Toutain, 2008).

3.1. Métabolisme glucidique

La population microbienne du rumen, grâce à un extraordinaire équipement enzymatique, dégrade les constituants glucidiques (amidon, pectine, hémicellulose, cellulose), des parois végétales en oses qui sont ensuite fermentés en anaérobiose selon différentes voies (Thivend *et al.*, 1985).

La fermentation est réalisée en deux étapes consécutives : la transformation des oses simples en acide pyruvique suivie d'une transformation de l'acide pyruvique en acides gras volatils (AGV) (figure 2) qui sont absorbés à travers l'épithélium ruminal (figure 3) et constituent la principale source d'énergie pour l'animal (Zened, 2011).

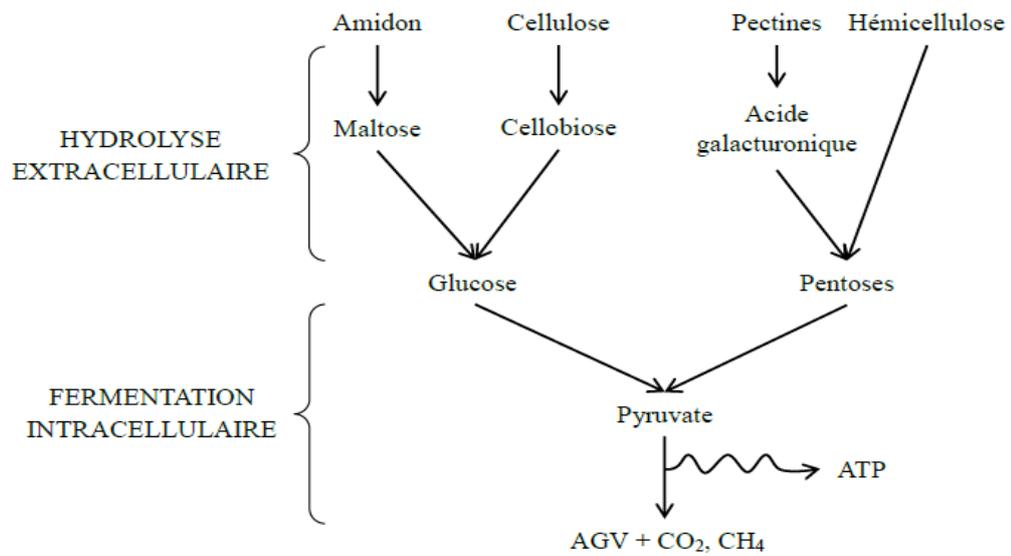


Figure 2 - Dégradation et utilisation des glucides par les bactéries ruminales (Dusart, 2014).

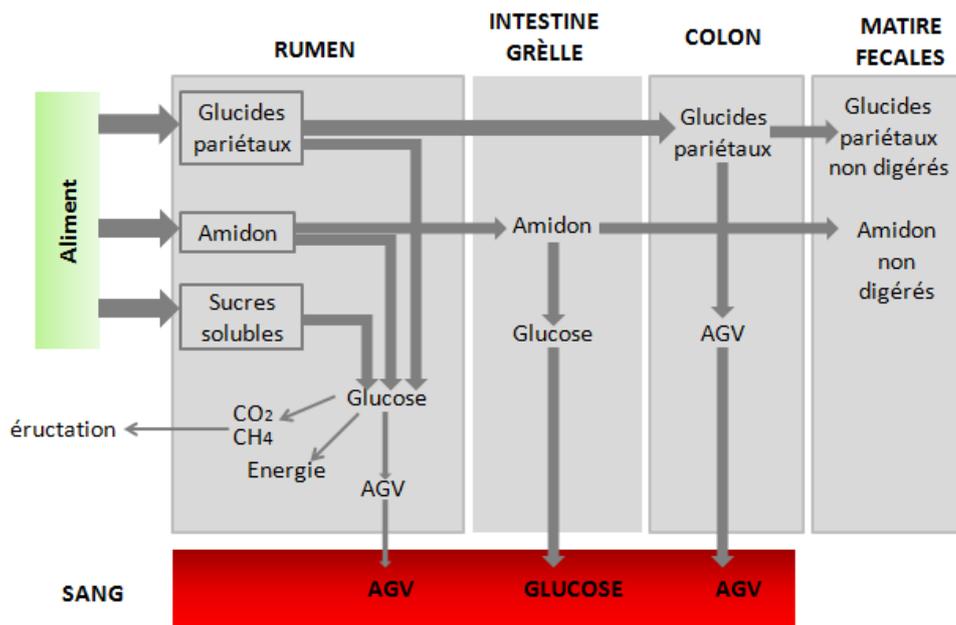


Figure 3 - Digestion et absorption des glucides chez les ruminants (Cuvelier *et al.*, 2005).

3.1.1. Les glucides structuraux

Les glucides représentent 75% de la masse du tissu végétal avec les glucides structuraux ou membranaires ou pariétaux (cellulose, hémicellulose, pectine), et les glucides non structuraux ou de réserve (amidon) et les sucres simples (Toutain, 2008).

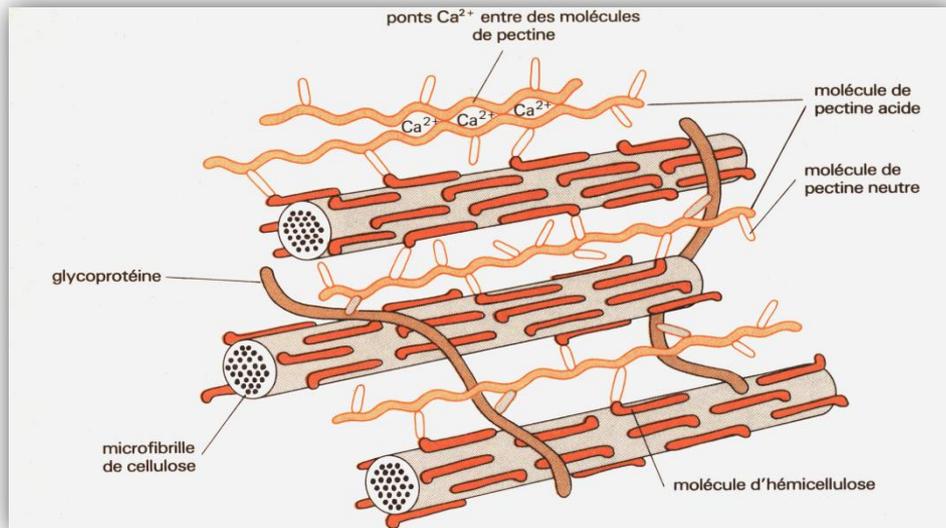


Figure 4 - Polymères des tissus végétaux (Alberts *et al.*, 1988).

La liaison des deux constituants essentiels de la paroi primaire, les fibres et la matrice : les molécules d'hémicelluloses sont liés par des liaisons hydrogène à la surface des microfibrilles de cellulose. Certaines de ces molécules d'hémicellulose sont liées à leur tour à des molécules de pectine acide par court molécules de pectine neutre.les glycoprotéines de la paroi sont probablement attachées aux molécules de pectine (Alberts *et al.*, 1988) (figure 4) .

La cellulose

La cellulose est la source d'énergie la plus abondante sur la planète, c'est une molécule organique renouvelable, Elle représente plus de la moitié de la biomasse terrestre et constitue un réservoir de carbone sous forme organique (Amokrane, 2010; Ranson-Jones *et al.*, 2012).

La structure de la cellulose est un polymère linéaire formée de 1000 à 10 000 résidus de type β -D-glucose (figure 5). Elle est uniquement formée de cellobiose (deux glucose liés en β 1-4) (figure 6). Une fibre de cellulose est typiquement formée par environ 500 000 molécules de cellulose dont les liaisons osidiques ne peuvent être rompues au cours de la digestion que par les enzymes bactériens (Mebirouk, 2014).

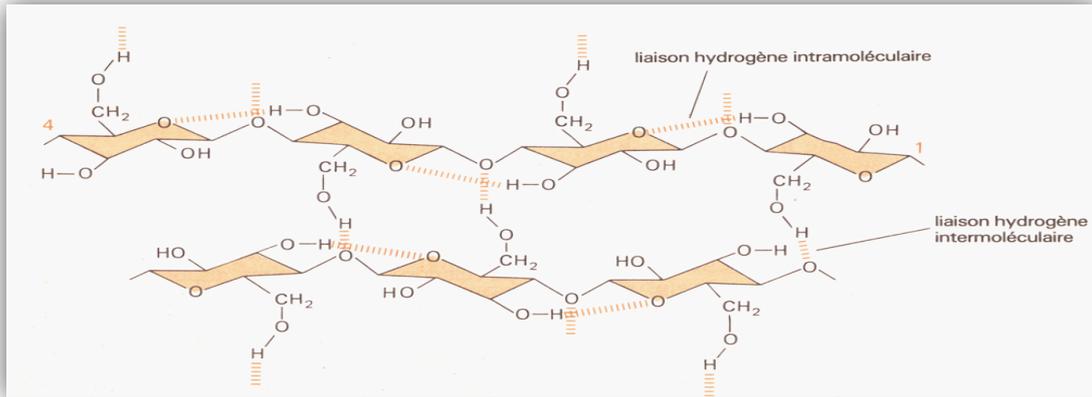


Figure 5 - Deux chaînes de cellulose forme de résidus glucose liés en β 1-4 (Albert *et al.*, 1988).

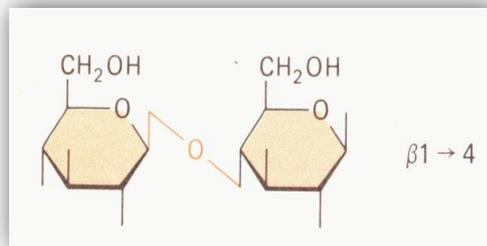


Figure 6 - Structure de la liaison β 1-4 (Alberts *et al.*, 1988).

La dégradation de la cellulose est réalisée par l'action synergique des cellulases, classées en trois groupes (Amokrane, 2010) :

- **les endoglucanases:** scindent de manière aléatoire les chaînes de cellulose en glucose et en cello-oligosaccharides.
- **les exoglucanases:** réalisent une dissociation d'unités de cellulobiose à partir de l'extrémité non réductrice de la chaîne.
- **les cellobiases** (β -glucosidases): réalisent l'hydrolyse de la cellulose en glucose (Fonty *et al.*, 1995)

F. succinogenes : La dégradation de cellulose chez *F. succinogenes* est commencé par l'attachement au substrat est atténué par les protéines et le type structures de fibro-boue de pilin de type IV fixées à la membrane externe. Des fibres de cellulose sont perturbées par les enzymes hydrate de carbone-actives et différentes chaînes de cellulose sont transportées par la membrane externe par l'intermédiaire d'un transporteur d'ABC (figure 7). Les données actuelles suggèrent que la dégradation des chaînes de cellulose se produise dans l'espace périplasmique (Ranson-Jones *et al.*, 2012).

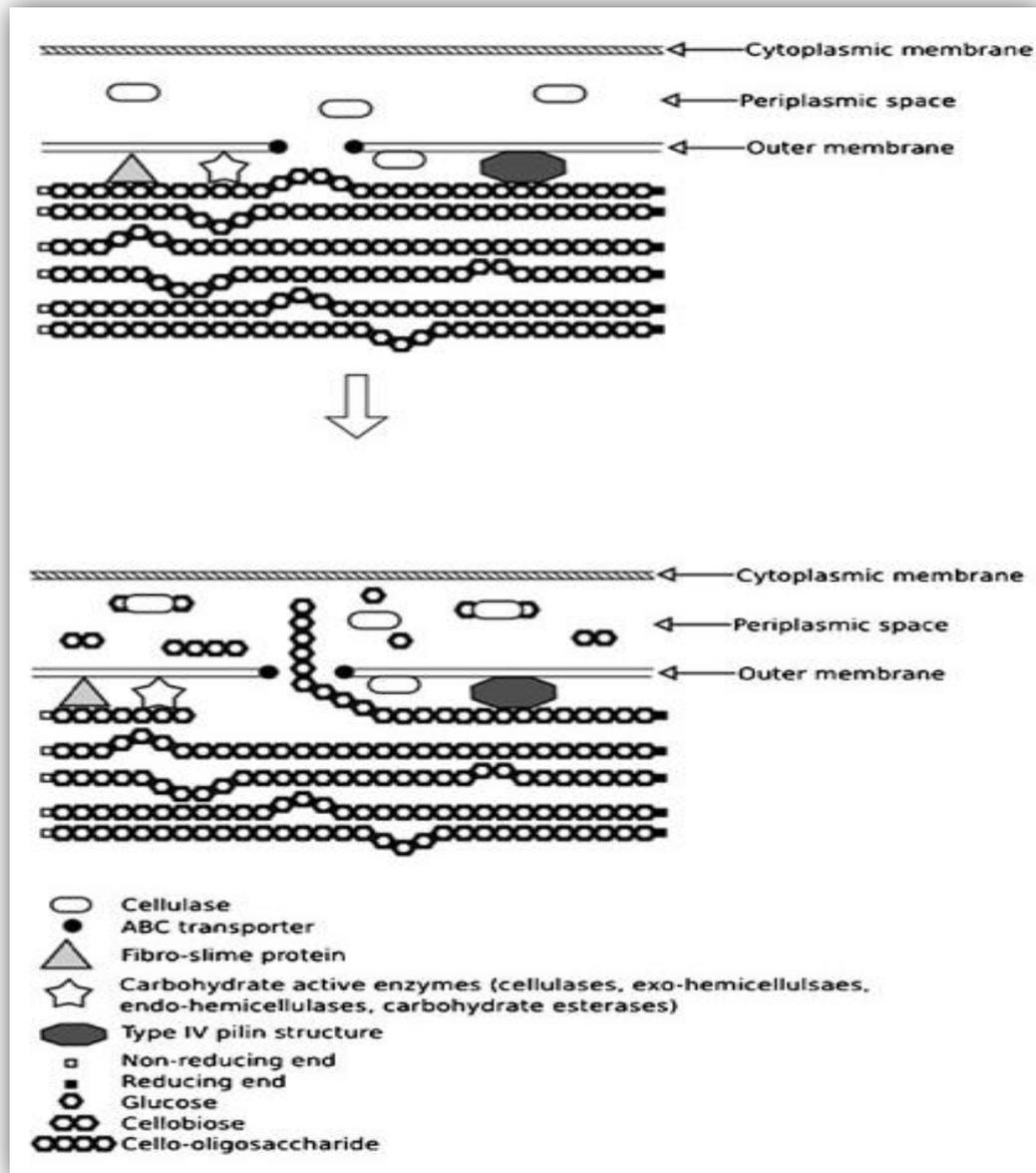


Figure 7 - Mécanisme de la dégradation de cellulose (cas de *F. succinogenes*) (Ranson-Jones *et al.*, 2012).

L'hémicellulose

L'hémicellulose est un mélange de pentose, hexose et d'acides uroniques. Le monomère le plus représentatif de l'hémicellulose est formé avec de la xylose (Mebirouk, 2014) (figure 8). Est lié et enchevêtré avec l'hémicelluloses pour constituer la base de la paroi végétale. Les hémicelluloses sont moins résistantes à l'hydrolyse que la cellulose et elles ont une composition beaucoup plus variée. Leur hydrolyse peut libérer un pentose (on parle alors par exemple de xylane) ou un hexose (mannanes, galactane). Les hémicelluloses se différencient de la cellulose par la présence simultanée de liaisons β 1-4, β 1-3 et α 1-6.

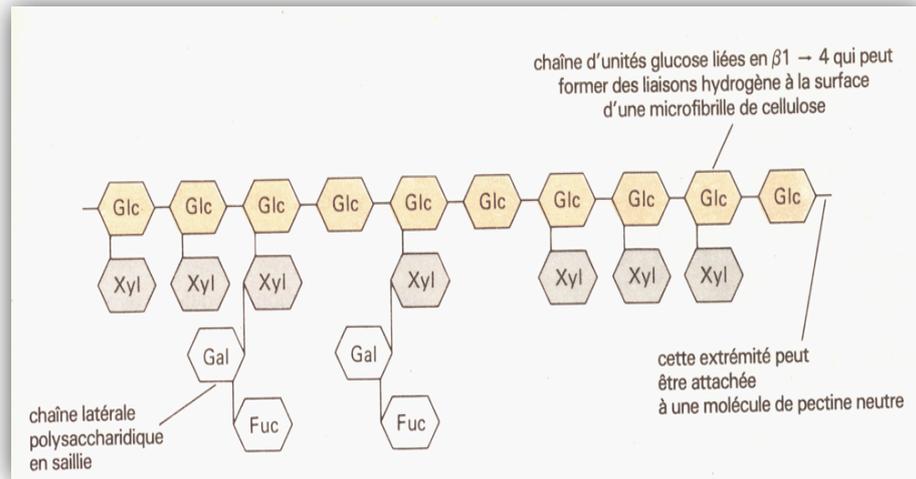


Figure 8 - Structure de l'hémicellulose (Alberts *et al.*, 1988).

La digestion de l'hémicellulose se fait grâce à certains protozoaire oligotriches et des bactéries secrétant trois groupes d'enzymes: les endoxylanases, les exoxylanases et les B-xylosidases (Forano *et al.*, 1996), les enzymes procèdent au découpage des chaines par des xylanase pour donner le xylobiose qui sera hydrolysé en xylose par des xylobiase et avec d'autre sucre simples, il sera absorbé par la bactérie (Touatin, 2008).

La pectine

Les pectines (ou substances pectiques) sont constituées par une chaine principale d'unités d'acide D-galacturonique liées en B (1-4) (figure 9). Des oses neutres sont toujours trouvés en association. La chaine linéaire peut être également interrompue de place en place par des unités L-rhamnose (pentose neutre méthylé) liées aux acides galacturoniques (Belbis, 2007).

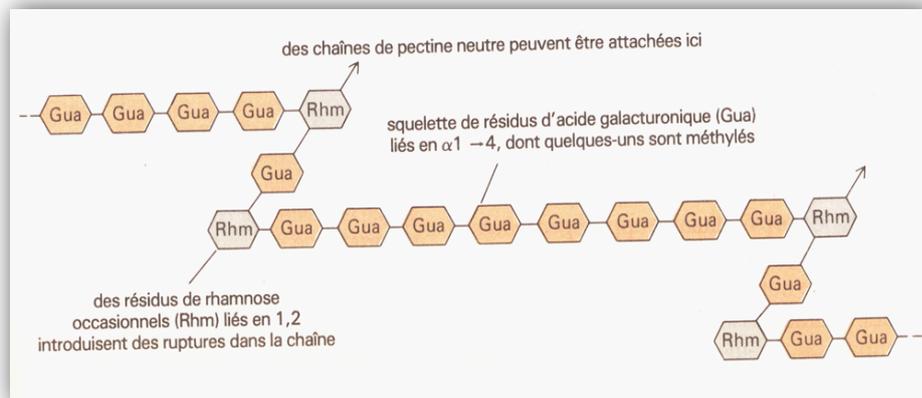


Figure 9 - Structure de la pectine (Alberts *et al.*, 1988).

La dégradation des substances pectiques nécessite des enzymes pectinolytiques qui sont divisées en deux principaux groupes:

- **Les enzymes désestérifiantes** (pectine-estérases): qui hydrolyse les liaisons esters méthyliques en libérant du méthanol ;
- **Les enzymes dépolymérisantes**: qui sont soit des hydrolases, soit des lyases (Belbis, 2007).

3.1.2. Les glucides non structuraux

L'amidon

L'amidon est la principale forme de réserve énergétique de végétaux et plus spécialement des céréales caractérisées par leur faible teneur en cellulose et en lignine. L'amidon est un polyholoside constitué de fractions variables d'amylose (polymère de glucose entre 500 et 20 000 liéés par des liaisons α 1-4) (figures 10,11) et d'amylopectine (polymère de glucose formé par des liaisons α 1-4 et α 1-6, une structure proche de celle du glycogène) (Tautatin, 2008; Mebirouk, 2014).

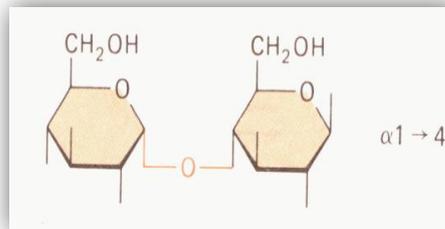


Figure 10 - Structure de la liaison α 1-4 (Alberts *et al.*, 1988).

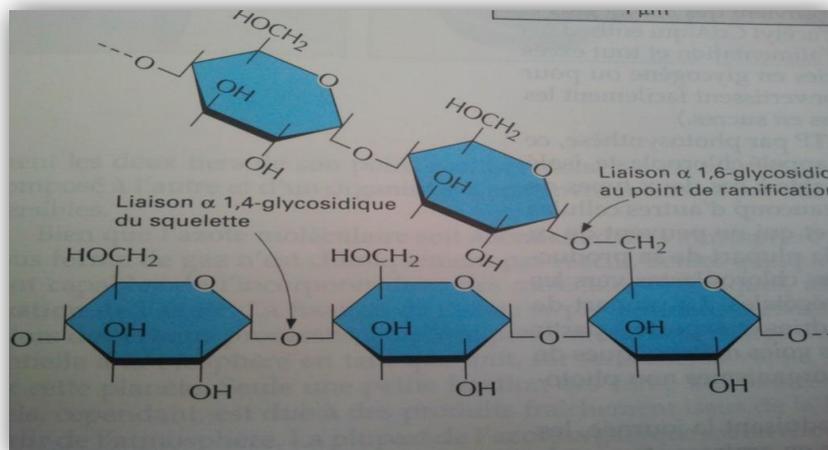


Figure 11 - Structure de l'amidon (Alberts *et al.*, 2007).

La dégradation de l'amidon n'est pas liée seulement à l'existence du rumen, comme celle de la cellulose, car elle peut s'effectuer par des enzymes propres de l'organisme. Au contraire des protozoaires, les bactéries amylolytiques sont trop petites pour ingérer les grains d'amidon. Les bactéries doivent sécréter des amylases afin d'hydrolyser l'amidon en malto-oligomères qui peuvent être transportés à l'intérieur de la cellule. L'hydrolyse de l'amidon aboutit à la formation de dextrans, maltose et glucose (Amokrane, 2010) (figure 12).

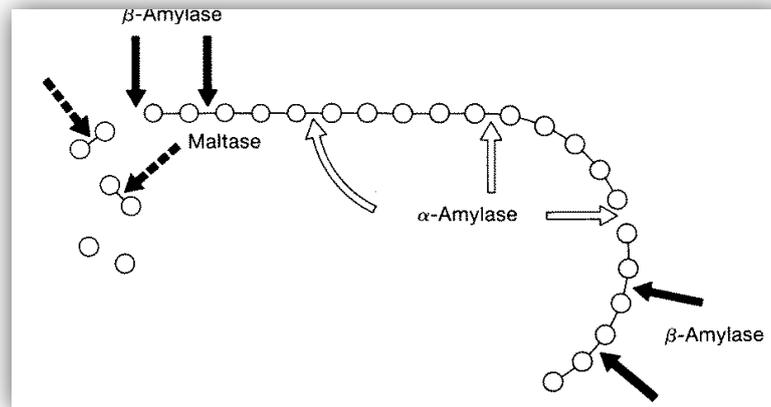


Figure 12 - Mode d'action de l'amylase α , de l'amylase β et de la maltase lors de la composition de l'amidon en molécule de glucose (les cercles indiquent les résidus glucose de la molécule d'amidon) (Alberts *et al.*, 1988).

3.1.3. Les composées phénoliques

La lignine

Après la cellulose, la lignine constitue le composé organique le plus abondant sur terre. Elle représente 20% de la biomasse terrestre et 30% du carbone organique de cette biomasse (Res *et al.*, 2006).

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

Les enzymes dépolymerisantes, sont soit des hydrolases, soit des lyases (Belbis, 2007).

3.2. Métabolisme azoté

Les aliments azotés consommés par l'animal sont dégradés au niveau du rumen par la population microbienne ruminale. Ces aliments azotés sont composés de protéines (longues chaînes d'acides aminés), de peptides, d'acides aminés et d'azote non protéique (ANP). qui comprend notamment les acides aminés, les bases azotées, les amines, l'urée et l'ammoniac (NH₃). Les protéines sont transformées en acides aminés puis fermentées jusqu'au stade d'ammoniac. L'azote non protéique est directement transformé en ammoniac. (Cuvelier *et al.*, 2015).

➤ Les protéines, les peptides, et les acides aminés

Le processus de dégradation des protéines en ammoniac et en chaîne carbonées commence par l'hydrolyse des protéines en peptides. Les peptides sont ensuite dégradés en acide aminés qui est alors désaminés en ammoniaque et en AGV (acides gras volatiles). L'activité protéolytique est essentiellement due aux bactéries, les enzymes impliquées sont localisées à la surface externe des membranes bactériennes (Jarrige *et al.*, 1995) (figure 13).

Les bactéries dégradent principalement les protéines solubles, les protozoaires contribuent plus à la dégradation des protéines insolubles incluses dans les particules (chloroplaste) ou dans les bactéries qu'ils ingèrent (Mebirouk, 2014).

Les protéines qui fermentent dans le rumen sont en grande partie perdues comme source d'acides aminés pour l'animal parce que les protéines alimentaires se décomposent et les acides aminés essentiels perdent leur fonction amine pour former de l'ammoniac et des AGV (FAO, 1991).

➤ Les acides nucléiques

Ces macromolécules provenant des fragments desquamés de la paroi du rumen ou des microbes lysés sont rapidement dégradées dans le rumen en nucléotides, nucléosides, et bases. (Mebirouk, 2014).

➤ L'urée

Synthétisé dans le foie à partir de l'ammoniac formé dans le rumen et recyclée par la salive ou à travers la paroi du rumen. De l'urée peut également être ajoutée dans la ration car elle constitue un complément azoté peu coûteux et donnant facilement de l'ammoniac (Mebirouk, 2014 ; Voet and Voet, 2005).

➤ Les peptides, les acides aminés et l'ammoniac sont des nutriments pour la croissance des bactéries ruminal, les protozoaires n'utilisent pas l'ammoniac.

Des études utilisent l'ammoniac marqué à l'azote N^{15} où de l'urée infusé dans le rumen en démontre que l'azote microbienne dérivé de l'ammoniac marqué, l'azote qui dérive de l'ammoniac marqué peut aller de 18 à 100 % (National Research Council, 2001).

La flore microbienne ruminale n'a pas besoin des acides aminés essentiels, parce qu'il y a des interactions entre différentes espèces. Mais des chercheurs ont observés que la croissance microbienne est améliorée lorsque des peptides ou des acides aminés remplacent l'ammoniac et l'urée comme seule source d'azote. Les besoins des microorganismes du rumen en azote ammoniacal ou bien aminé ou bien peptidique peuvent être affectés par la ration alimentaire (National Research Council, 2001).

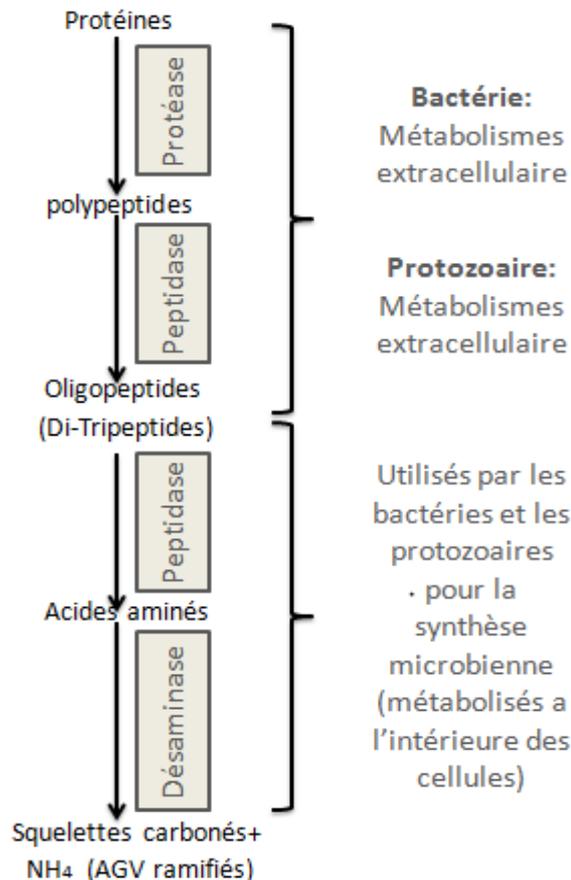


Figure 13 - Dégradation des composés azotés dans le rumen (Jouany, 1994).

Les protéines sont des macromolécules de la cellule. Elles se composent d'un enchaînement linéaire d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Cet enchaînement possède une organisation tridimensionnelle (figure 14).

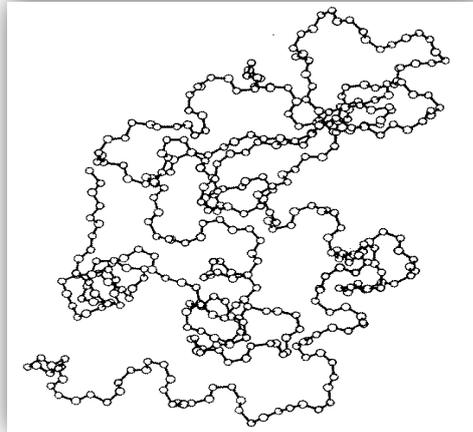


Figure 14 - Structure tertiaire d'une protéine (Alberts *et al.*, 1988).

Les protéines alimentaires séparées en deux catégories : protéines non dégradables et protéines dégradables, ces dernier dégradés dans la cellule bactérienne comme suivante : La cellule microbienne attachée à la surface des particules alimentaires, suivi par l'activité des protéases microbiennes qui donne des acides aminés et des peptides. Les acides aminés ils sont transportés dans la cellule et utilisés pour fabriquer les protéines microbiennes.

Les peptides aussi sont transportés à l'intérieur de la cellule microbienne, ils sont attaqués par des peptidases qui donnent encore des acides aminés, ces acides aminés soit activés par l'ATP et utilisé dans la synthèse des protéines microbiennes. Soit désaminés pour donner les AGV, l'ATP, CO₂ et l'ammoniac (Figure 15) qui peut utiliser par la cellule bactérienne pour fabriquer les protéines microbiennes (Bach, 2005).

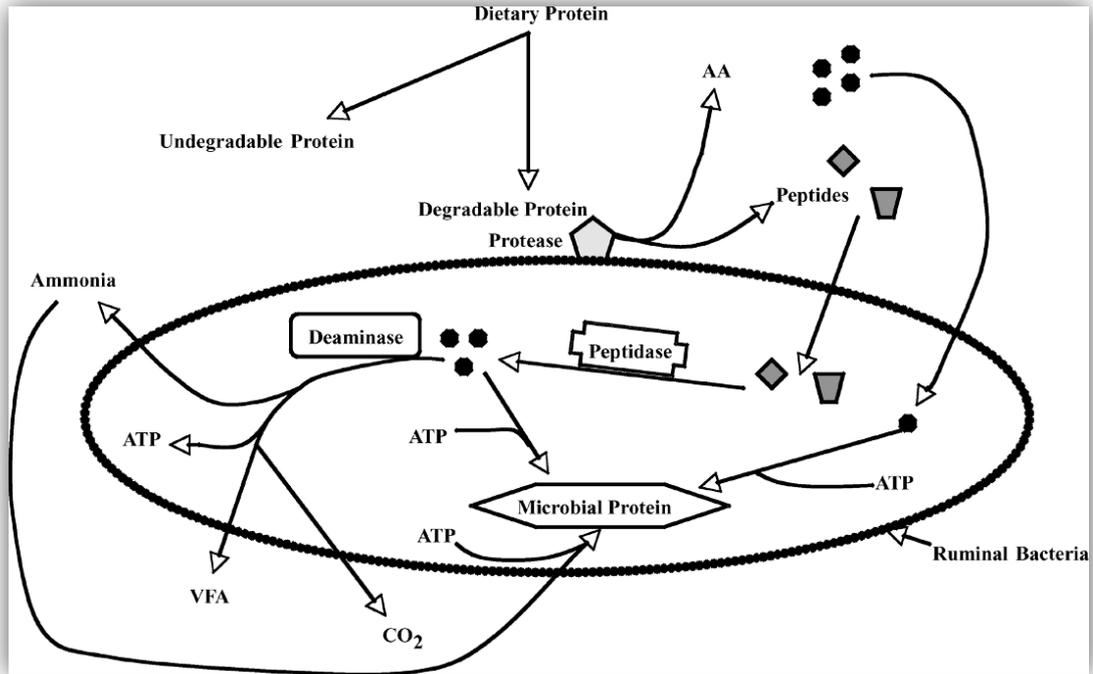


Figure 15 - Dégradation des protéines et leurs produits finaux dans le rumen. (Bach *et al.*, 2005).

Les microorganismes sont capables d'utiliser différentes sources d'azotes et convertis en acides aminés et protéines qui sont récupérés par les ruminants au niveau de l'intestin ou le pancréas sécrète des enzymes protéolytiques dans la lumière de l'intestin. Les protéines sont dégradées en acides aminés ou dipeptides et tripeptides qui sont absorbés dans les cellules intestinales (figure 16). Les acides aminés sont libérés dans le sang, ensuite ils sont absorbés par d'autres tissus (Berg, 2013).

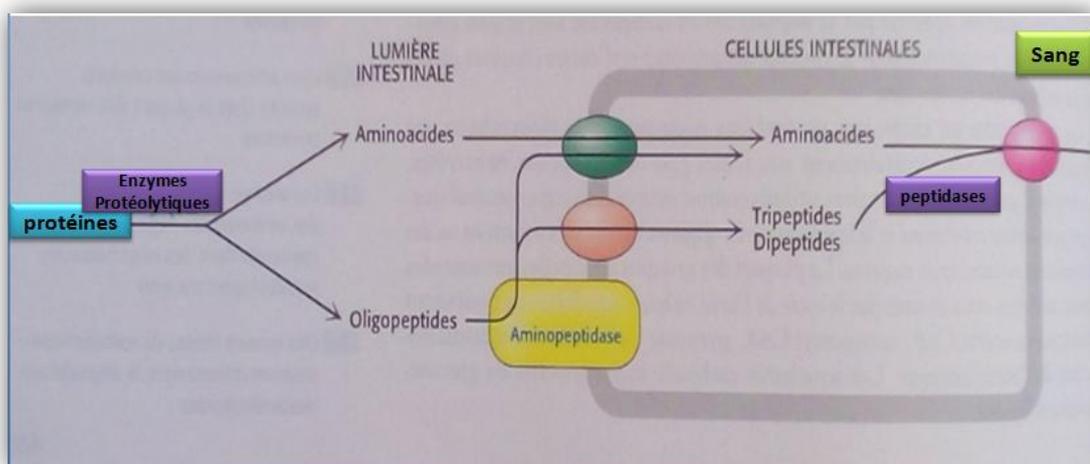


Figure 16 : Digestion et absorption des protéines (Berg, 2013).

4. Les sources d'azote alternatives

4.1. Bicarbonate d'ammonium

Le bicarbonate d'ammonium est un composé inorganique, est un sel bicarbonate de l'ammonium. N'est pas toxique pour les êtres vivants. Ce produit est une source importante de l'azote, vu que 30-50% de protéines microbiennes du rumen peut être recyclé à partir de l'ammonium (Morrison, 2000).

4.2. Glutamate de sodium

Le glutamate de sodium est un composé organique, également connu sous le nom de glutamate monosodique est le sel sodique de l'acide glutamique, l'un des acides aminés non essentiels les plus abondants dans la nature. Sa formule chimique est : $C_5H_8NO_4Na$ (figure 17). Le glutamate est un acide aminé comportent deux groupes carboxyliques (Berg, 2013).

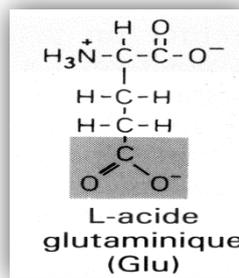


Figure 17 - Structure de l'acide glutamique (Alberts *et al.*, 1988).

4.3. Nitrate de potassium

Les nitrates sont réduits en nitrite puis en ammoniac. Lorsque il abondante dans la ration, le nitrite peu s'accumuler dans le contenu du rumen, passe dans le sang et atteindre des concentrations toxiques pour le ruminant quand un régime riche en nitrate. (Mebirouk, 2014 ; Yang *et al.*, 2016).

Les facteurs qui influent sur la toxicité du nitrite dérivé à partir de nitrate :

- * Les concentrations élevées de nitrates dans l'alimentation ;
- * Le taux de consommation d'aliments ;
- * Le taux bas de réduction du nitrite en ammoniac dans le rumen ;
- * Un faible taux de passage du rumen, ce qui entraîne plus de nitrate, ou la rétention du nitrite dans la panse (Yang *et al.*, 2016).

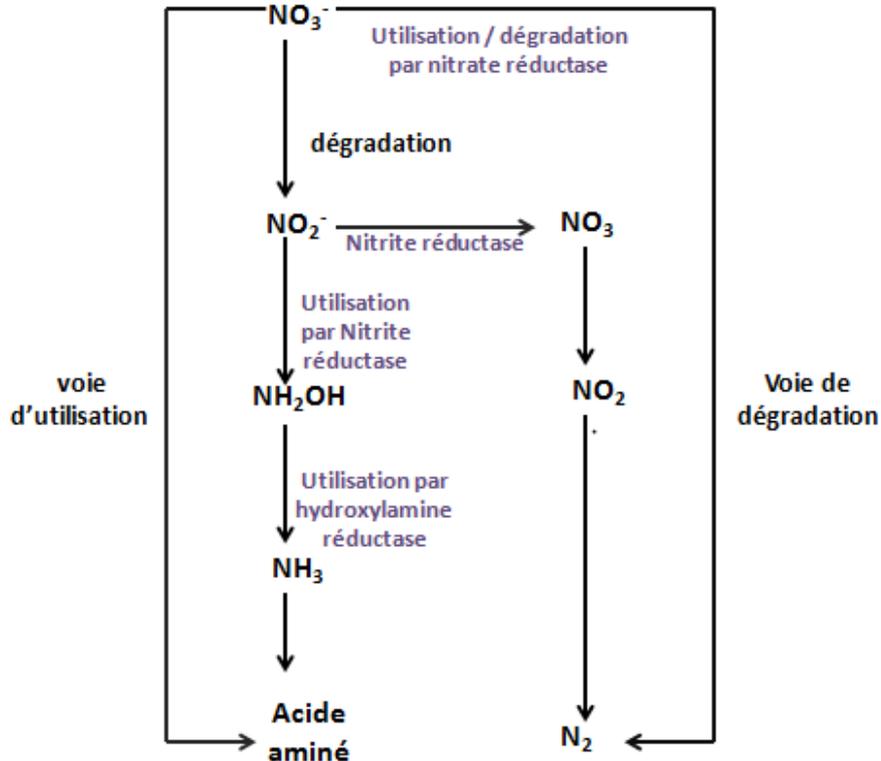


Figure 18 - Utilisation et dégradation de nitrate et nitrite (Yang *et al.*, 2016).

Les ions nitrate (NO_3^-) et nitrite (NO_2^-) sont des intermédiaires dans le cycle biologique de nitrification et la source primaire de l'azote. Le plan global du métabolisme de nitrate dans le rumen. Les deux réductions utilisation de nitrite, menant à la production d'ammoniaque, et à la réduction dégradation de nitrite ont été montrés pour se produire dans le contenu de rumen. Dans les incubations avec le digesta ruminal bovin la réduction in vitro et assimilatrice de nitrate était prédominante, et non dénitrification au N_2 , mais une certaine accumulation de N_2O , produite de l'addition de nitrite Selon l'équilibre des activités enzymatiques, l'ordre de réduction de NO_3^- à NH_4^+ résultat dans utilisation des intermédiaires comme NO_2^- ou N_2O à toute étape Normalement, la réduction de nitrite à l'ammoniaque est beaucoup plus lente que réduction de nitrate au nitrite, menant à l'utilisation de nitrite (Yang *et al.*, 2016) (Figure 18).

4.4. Extrait de levure

L'extrait de levure, forme essentiellement protéique. L'addition de levure à la ration du ruminant laitier semble, dans un certain nombre de cas, être bénéfique pour le métabolisme ruminal (Giger-Reverdin *et al.*, 2016), il est très riche en vitamine.

L'utilisation des levures vivantes comme probiotique : les levures Probiotique sont actuellement acceptée bonne et largement utilisé chez l'affouragement animal. Le but principal pour l'usage de tels additifs dans des régimes de ruminant est d'empêcher le rumen les désordres de flore et les perturbations, particulièrement ceux se sont associés avec la consommation des concentrés de haute énergie pour soutenir la productivité élevée en lait et viande intensifs.

Les différents types de produits de levure : levure sèche active et culture de levure (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2006).

Tableau 2 - Composition, toxicité et prix des sources d'azote alternatives.

Sources d'azote	Formule	Composition et pH	Toxicité
Bicarbonate d'ammonium	$(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$	N.....17,72 % H.....6,37 % C.....15,19 % O.....60,71 % pH : 8,8 _9,8	Non toxique
Glutamate de sodium	$\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4$	N.....8,28 % H.....4,77 % Na.....13,59 % O.....37,84 % pH : 7 (à 2%)	Non toxique
Nitrate de potassium	KNO_3	N.....13,86 % K.....38,62 % O.....47,52 % pH : 6,0 _8,0	Toxique
Extrait de levure		N.....11 % Protéine.....27,89 % Calcium.....0,08 % Magnésium.....0,18 % Phosphore.....0,10% Sodium.....36 % Vitamine E.....0,097 % Vitamine D.....0,014 % Vitamine C.....0,097 % Vitamine B.....0,013 % pH : 6,8_7,2 (à 2%)	Non toxique

Chapitre II :

Matériel et méthodes

Chapitre II : matériel et méthodes

Notre étude à été conduite *in vitro*, elle consiste à évaluer l'effet du bicarbonate d'ammonium, du nitrate de potassium, du glutamate de sodium et de l'extrait de levure (comme sources d'azote) sur l'activité métabolique de la dégradation de la cellulose par les bactéries cellulolytiques, de l'amidon par les amylolytiques, du xylane par les hémicellulolytiques, de la pectine par les pectinolytiques et des protéines par les protéolytiques.

L'étude à été conduite en anaérobiose à 39 °C, à pH 6.8 et dans un milieu tamponné avec du bicarbonate de sodium (10 g/litre).

Cette étude est réalisée *in vitro* bien qu'il y a des différences entre l'*in vitro* et l'*in vivo* :

- ✓ *In vivo*, l'apport de nutriments est continu, l'évacuation de milieu ruminal est continue ; l'absorption à travers la paroi ruminale est aussi continue. Donc n'il y a pas d'accumulation des produits terminaux (AGV et gaz), ils sont éliminés par éructation.
- ✓ *In vitro*, le système de fermentation est fermé, pas d'apports externes, pas d'absorption de métabolites terminaux.

Les résultats obtenus *in vitro* doivent être corroborés par des travaux *in vivo*.

1. Matériel

Inoculum et animal donneur

L'inoculum utilisé est constitué par du liquide ruminal prélevé d'un bovin sacrifié à l'abattoir municipal d'El Khroub (Constantine) et transporté immédiatement au laboratoire dans des thermos aseptisés avec de l'eau distillée stérile chaude et quelques gouttes d'eau de javel, puis rincé avec de l'eau distillée stérile pour éliminer toute trace d'eau de javel.

Le liquide ruminal est filtré sous deux couches de tissu en mousseline et le filtrat est utilisé pour l'inoculation. Cette opération a été réalisée six fois en fonction du temps.

2. Méthodes

Les méthodes ont concerné les analyses physico-chimiques et microbiologiques du liquide ruminal, et les fermentations *in vivo* en anaérobiose.

2.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'inoculum

Le liquide ruminal est caractérisé par les paramètres physico-chimiques : pH, rH, température, matières : organique et minérale et des paramètres organoleptiques : l'aspect, l'odeur, la couleur et la texture du contenu ruminal.

Dans notre travail nous avons également tenu compte du type d'animal donneur, ainsi que du type d'alimentation.

2.1.1. Potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydoréduction est une mesure du potentiel en équilibre développé à l'interface entre un métal noble et une solution aqueuse contenant une espèce redox électroactive, par rapport à une électrode standard à hydrogène (Bonfont, 2008).

Le potentiel d'oxydoréduction est mesuré par un couple d'électrodes, l'une de référence et l'autre de mesure.

2.1.2. pH

Le pH du liquide ruminal est mesuré directement dès son arrivée au laboratoire à l'aide d'un pH mètre portable à électrode en verre et sonde de température, étalonné avant l'utilisation.

Etalonnage du pH mètre

Pour l'étalonnage du pH-mètre nous avons utilisé des solutions étalon caractérisées chacune par un pH défini à 25°C, pour vérifier que le pH-mètre donne des valeurs exactes.

2.1.3. Température

La température du liquide ruminal est mesurée dès son arrivée au laboratoire à l'aide d'un thermomètre à mercure.

2.1.4. Matière sèche

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

- **Méthode** : méthode dite de la double pesée.

Une quantité (P_1) du liquide ruminal homogénéisé est placée dans des creusets en porcelaine préalablement séchés et tarés. Le tout est placé dans une étuve maintenue à 105°C pendant 24 heures jusqu'à poids constant (P_2). Après 24 h, les creusets sont mis dans un dessiccateur pendant au moins une demi-heure pour refroidir dans une atmosphère sèche.

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

$$\%MS = (MS/MF) \times 100 \text{ exprimés en g/100g MF}$$

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

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

Où :

P₁: représente le poids (g) du creuset avant séchage (tare + quantité du liquide ruminal fraîche).

P₂: représente le poids (g) du creuset après séchage (tare + résidus).

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

Le taux d'humidité est calculé à partir de la formule suivante :

$$\% \text{ d'humidité} = 100 - \%MS$$



Figure 19 - Matière sèche dans le dessiccateur après séchage.

2.1.5. Matière organique et matière minérale

L'échantillon, préalablement séché, est placé dans un four à moufle à 550°C. La matière organique se consume et la matière résiduelle constitue la matière minérale.

- **Méthode** : dite perte sèche.

Une quantité de matière sèche déjà obtenue est pesée (P_1) dans un creuset en porcelaine préalablement taré (T), celui ci est ensuite mis dans un four à moufle à 550°C pendant 24 h. Nous le laissons refroidir à l'intérieur du four avant de le mettre dans le dessiccateur pendant au moins une demi-heure. Le résidu obtenu représente les cendres qui, par différence, donne la matière organique contenue dans l'échantillon.

La matière minérale (cendres) est calculée par l'expression suivante :

$$\%MM = (MM/MS) \times 100 \text{ exprimés en g/100g MS}$$

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

MM: la matière minérale est calculée comme suit : $MM = P_3 - T$

Où :

P₂ : représente le poids (g) du creuset après dessiccation.

P₃ : représente le poids (g) du creuset après incinération (tare + cendre).

T: représente le poids (g) du creuset vide.

La teneur en matière organique représente le complément à 100 des cendres :

$$\% MO = 100 - \%MM$$

2.2. Caractéristiques microbiologiques de l'inoculum

Le rumen est un écosystème semi-ouvert dont les caractéristiques sont favorables au développement d'une biocénose anaérobie et diversifiée, ses caractéristiques varient en fonction de l'animal et de la nature de la ration (Bonfont, 2008).

La flore ruminale est analysée par un examen microscopique à l'état frais, ensuite par une réalisation de deux types de frottis :

- frottis du liquide ruminal "**Tel quel**" (frais) dès son arrivée (LRTQ) ;
- frottis du liquide ruminal filtré à travers deux couches de tissu en mousseline (LRF).

Deux lames pour chaque frottis sont étalées, elles sont par la suite soumises à la coloration de Gram des anaérobies selon Kopeloff (tableau 3).

Tableau 3 - Procédure de coloration de Gram selon Kopeloff.

Procédure de la coloration	Préparation des solutions
On fait agir la solution A du cristal violet sur la préparation et ajouter 5 gouttes de la solution B, la durée totale est de 30 secondes.	Solution A: Cristal violet alcalin. On dissout 10 g de cristal violet dans 1000 ml d'eau distillée Solution B : on dissout 50 g de NaHCO_3 dans 1000 ml d'eau distillée.
On rince à l'eau de robinet (jet réduit) pendant 2-3 secondes.	
On couvre le frottis avec la solution du mordant (KI+I) pendant 60 secondes.	Solution d'iodo-ioduré: On dissout 4g de NaOH dans 25 ml d'eau distillée, on ajoute 20 g d'iode et 1 g de KI bien dissoudre, on ajoute graduellement 975 ml d'eau distillée, en agitant correctement à chaque ajout.
On rince à l'eau de robinet (jet réduit) pendant 2-3 secondes.	
On éponge l'excès d'eau avec un papier buvard propre.	
On décolore au maximum par le mélange acétone-alcool éthylique pendant 15-20 secondes.	Solution de mélange décolorant: On mélange de 300 ml d'alcool acétone + 700 ml d'alcool éthylique 95%
On rince à l'eau immédiatement.	
On éponge l'eau en excès.	
On recouvre de la solution de contre colorant pendant 20 secondes.	Solution de contre colorant: On dissout complètement 20 g de safranine dans l'alcool à 95%, ensuite on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée.
On rince à l'eau et séchage avant l'observation microscopique.	

3. Epuisement de l'azote et de l'énergie résiduels

Après filtration de l'inoculum, des particules et des débris alimentaires (azotés et glucidiques) persistent dans le filtrat. Pour les éliminer on procède à leur épuisement en faisant incuber l'inoculum pendant 5 à 6 heures, tout en suivant la production de gaz. La fin de l'épuisement est estimée par l'apparition d'un plateau dans la courbe de production de gaz.

3.1. Les sources d'azote sont-elles utilisées comme source d'énergie ?

Pour répondre à cette question nous avons effectué une pré incubation (épuiement), suivie d'une fermentation de 24 heures avec l'ajout de chaque source d'azote (équivalent à 222,52 mg N/l).

3.2. Effet des sources d'azote sur les principaux groupes bactériens

Pour estimer l'effet de la source d'azote sur les différents groupes bactériens (cellulolytiques, amylolytiques, pectinolytiques, xylanolytique, protéolytiques) on a réalisé quatre fermentations après un épuisement, dans chaque fermentation on a utilisé une seule source d'azote combinée avec cinq sources d'énergie différentes.

On a voulu savoir qu'elle est la source d'azote qui stimule le plus les groupes bactériens.

3.2.1. Sources d'azote

Les sources d'azote alternatives utilisées dans les différents essais sont deux sources d'azote organiques et deux sources d'azotes inorganiques.

- sources d'azote organiques: extrait de levure, glutamate de sodium.
- sources d'azotes inorganiques: nitrate de potassium, bicarbonate d'ammonium.

3.2.2. Sources d'énergie

Les sources d'énergies utilisées se sont les polymères suivants : cellulose, amidon, pectine, xylane, caséine.

4. Préparation des milieux d'incubation

4.1. Milieu d'épuisement

Le milieu d'épuisement comporte le tampon bicarbonate (tableau 4), sa préparation se fait selon les étapes suivantes :

- Une quantité (2.5 g) de bicarbonate d'ammonium est pesée puis introduite dans des flacons en verre préalablement stérilisés contenant une quantité (200 ml) d'eau distillée stérile. On ajoute de la résazurine et on complète le milieu avec l'eau distillée stérile (250 ml).
- Les flacons sont placés dans l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes pour stériliser le milieu et pour chasser l'O₂. Ensuite le refroidissement du milieu se fait avec barbotage sous CO₂ jusqu'à 39°C. (La colonne de réduction contient des copeaux de cuivre). Et elle est reliée à deux bouteilles de gaz, l'hydrogène et le dioxyde de carbone (H₂, CO₂). Cette dernière est chauffée, et quand le CO₂ traverse la colonne le cuivre piège l'O₂ pour former du CuO).

- Réduit le milieu avec la solution réductrice (Na₂S) jusqu'au virage de la couleur du milieu du bleu vers l'incolore qui signifie que le rh atteint la valeur -300 mV.
- On ajuste le pH à 6,80 avec HCl 5N ou NaOH 5N.



Figure 20 - Réduction du milieu d'épuisement sous CO₂.

Tableau 4 - Composition du milieu tamponné.

Composition et concentration	Les flacons de fermentation
NaHCO ₃10 g	1 à 12
Eau distillée.....960 ml	
Résazurine.....1,24 ml	
Solution réductrice :	
NaOH8 ml	
Na ₂ S0,4 g	
Eau distillée 40 ml	
Ajustement du pH à 6,80	

Le milieu tamponné est le milieu de base pour la pré-incubation (épuisement) et l'incubation (fermentation).

4.2. Milieu de fermentation

Le milieu de fermentation comporte le milieu tamponné (tableau 4) et la source d'azote dans un premier essai (bicarbonate d'ammonium, glutamate de sodium, nitrate de potassium et extrait de levure) avec l'ajout de la source d'énergie dans les autres essais (cellulose, amidon, pectine, xylane et caséine).

Ils sont préparés selon la même démarche que le milieu d'épuisement.



Figure 21 -Virage de couleur lors de réduction de milieu de fermentation.

5. Incubation

5.1. Phase d'épuisement

Dans un bain marie réglé à 39°C sous flux continu de CO₂, les 12 flacons de 250 ml en verre stérile et saturés en CO₂ sont inoculés (15ml de liquide ruminal filtré + 15ml de milieu tamponné). A chaque fois que nous inoculons un flacon, nous le fermons hermétiquement avec un bouchon qui est lié directement à l'appareil de mesure de gaz.

On incube 5 à 6 heures à 39°C en anaérobiose.

5.2. Phase de fermentation

5.2.1. Utilisation des sources d'azote comme source d'énergie

Après épuisement, nous avons ajouté, dans les 12 flacons stérilisés sous CO₂, les quatre sources d'azote (préalablement pesées (222.52 g N/l) dans du papier aluminium stérile). Puis à l'aide d'une seringue aseptisée nous leur avons injecté 120 ml du milieu de fermentation (Tableau 5).

On incube au bain marie pendant 24 heures à 39°C en anaérobiose.

Tableau 5 - Essai sur l'utilisation des sources d'azote comme source d'énergie.

Le milieu de fermentation	Les sources d'azote		Les flacons de fermentation	code milieu
	Source d'azote utilisée	Concentration (mg/l)		
NaHCO ₃ 10g Eau distillé.....960ml Résazurine.....1,24ml Solution réductrice : NaOH8 ml Na ₂ S0,4g Eau distillé.....40ml Ajustement du pH jusqu'à 6,80	Bicarbonate d'ammonium	1256	1 et 2	A
	Glutamate de sodium	2972,81	3 et 4	B
	Nitrate de potassium	1606,10	5 et 6	C
	Extrait de levure	2022,90	7 et 8	D
	Sans source d'azote (blanc d'azote)	00,00	9 à 12	E et F

5.2.2. Effet des sources d'azote sur les différents groupes bactériens

Après épuisement, on ajoute les cinq polymères préalablement pesées (1.5g). Transfère dans les flacons de fermentation avec une seringue aseptisée 120 ml du milieu de fermentation avec une seule source d'azote sous CO₂. L'ajout de 120ml de milieu d'épuisement après les polymères est assure l'homogénéisation de ces dernier (Tableau 6). On incube au bain marie 48 heures à 39°C en anaérobiose.

Tableau 6 - Essai de l'effet des sources d'azote sur les groupes bactériens

Le milieu de fermentation	Les sources d'énergies		Les flacons de fermentation	code milieu
	Source d'énergie Utilisée	Concentration (g/l)		
NaHCO ₃ 10g Eau distillé.....960 ml Résazurine.....1,24 ml Solution réductrice : NaOH8 ml Na ₂ S0,4g Eau distillé.....40ml Ajustement du pH jusqu'à 6,80 Source d'azote équivalent de 222.52gn/l	Cellulose	10	1 et 2	A
	Amidon		3 et 4	B
	Pectine		5 et 6	C
	Xylane		7 et 8	D
	Caséine		9 et 10	E
	Sans source d'énergie (blanc d'énergie)	00,00	11 et 12	F

On a réalisé la fermentation des sources d'énergie en présence des quatre sources d'azote, chaque source d'azote est utilisée dans un essai selon l'ordre suivant :

Essai 1 : fermentation des sources d'énergie en présence du bicarbonate d'ammonium.

Essai 2 : fermentation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium.

Essai 3 : fermentation des sources d'énergie en présence du nitrate de potassium.

Essai 4 : fermentation des sources d'énergie en présence de l'extrait de levure.

5.2.3. L'effet des sources d'azote sur les bactéries cellulolytiques

Le groupe cellulolytique, c'est le groupe le plus important dans le rumen, mais il est très sensible et difficile à cultiver. Dans les essais précédant où la cellulose a été utilisée avec les autres sources d'énergie en présence de différentes sources d'azote ce groupe n'a pas bien fonctionné. Pour cette raison on a décidé de faire un essai séparé expérience pour les cellulolytiques (tableau7).

Tableau 7-Essai sur l'effet de sources d'azote sur le groupe cellulolytiques.

Le milieu de fermentation	Concentration (g/l)		Les flacons de fermentation	code milieu
	Cellulose	Sources d'azote		
NaHCO ₃10g	10	Bicarbonate d'ammonium	1et2	A
Eau distillé.....960ml		Glutamate de sodium	3et4	B
Résazurine.....1,24ml		Nitrate de potassium	5et6	C
Solution réductrice :		Extrait de levure	7et8	D
NaOH8ml		Sans source d'azote	9 et 10	E
Na ₂ S0, 4g	00	Sans source d'azote et sans sources d'énergie	11 et 12	F
Eau distillé.....40ml				
Ajustement du pH jusqu'à 6,80				

5.3. Mesure de l'activité métabolique

L'activité métabolique des différents groupes bactériens du rumen se traduit par la production de gaz. Elle est mesurée par un appareil de mesure de gaz en anaérobiose, Ce dernier accumule une quantité de 0.33 ml qu'il libère en émettant un signal lumineux (spot). Le nombre de signaux enregistrés par l'appareil est suivi durant la durée d'incubation.

5.4. Expression des résultats

La production de gaz libéré lors de la fermentation des substrats par la microflore ruminale est mesurée par un appareil de mesure de gaz en anaérobiose. Cet appareil a un problème dans la partie informatique donc nous avons placé une caméra et suivi le signal lumineux visuellement et reporté les résultats dans des tableaux Excel. A partir de ces tableaux nous avons réalisé les courbes de production de gaz et les tableaux de la pente, temps de latence et volume maximum. Les résultats exprimés en ml gaz/222g N pour la fermentation des sources d'azote et ml gaz/1.5g MS pour la fermentation des sources d'énergie.



Figure 22 - Appareil de mesure du gaz en anaérobiose.

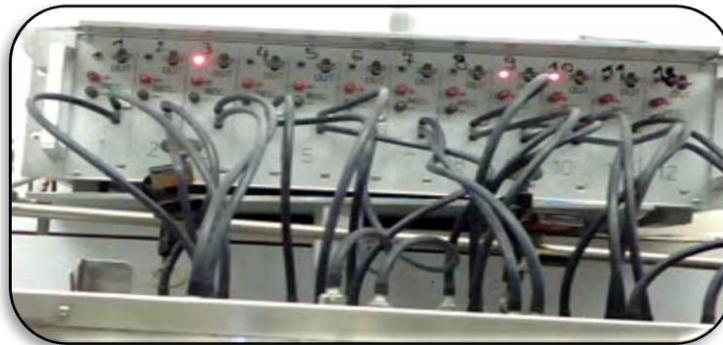


Figure 23 - Trois spots signalés lors de la fermentation.

5.5. Mesure du pH final après fermentation

Après 48 heures de fermentation des sources d'azote et d'énergie, nous avons mesuré le pH de chaque flacon pour évaluer les changements de pH avant et après la fermentation.

5.6. Examen du Gram après fermentation

Nous avons aussi réalisé le Gram de chaque flacon pour étudier l'aspect de la population bactérienne sur les différents substrats de fermentation.

Chapitre III :

Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractéristiques physico-chimiques du liquide ruminal

Les analyses physico-chimiques effectuées sur une quantité du liquide ruminal ont donné les résultats consignés dans le tableau 8.

Tableau 8 - Caractéristiques physicochimique de liquide ruminal

Dates de prélèvement	pH LRTQ	rH (mV)	Température °C	%MS	%MM	%MO
06/04/2016	5,78	-220	36,00	11,67	7,00	92,99
12/04/2016	5,22	-210	34,00	16,57	9,11	90,89
26/04/2016	5,13			19,25	10,13	89,87
04/05/2016	4,95		26,00	11,25	12,06	87,94
24/05/2016				16,30	11,06	88,94
Minimum	4,95	-220	26,00	11,25	7,00	87,94
Maximum	5,78	-210	36,00	19,25	12,06	92,99
Moyenne	5,27	-215	32,00	15,01	9,87	90,13
Ecart-type	0,36	7,07	5,29	3,44	1,94	1,94
% CV	6	3	16	22	19	2.15

1.1. Le pH

Les résultats (tableau 8) montrent que les pH mesurés durant les cinq campagnes sont légèrement acides, variant de 4.95 à 5,78 autour d'une moyenne de 5,27. Les prélèvements en fonction du temps (d'un liquide ruminal à un autre) révèlent des écarts de valeurs peu prononcées (avec un range de 0,83). Comparativement avec le pH optimal du rumen qui varie entre 6 et 7, cette diminution peut s'expliquer par : la variation de type d'alimentation, la flore abondante et les produits métaboliques.

On peut confirmer au vu du faible coefficient de variation (6%) qu'il y a là une légère stabilité du pH due à la sécrétion de salive (provoquée par la rumination) qui constitue une solution tampon pour le rumen. Cette stabilité est favorable à la vie de tous les microorganismes du rumen.

1.2. Le rH

Avec des valeurs de -210 à -220 mV et une moyenne de -215 mV, les résultats montrent que les rH mesurés varient très peu d'un prélèvement à un autre (CV= 3%). Ces valeurs reflètent le caractère réducteur du rumen et traduisent parfaitement les valeurs d'un rumen sain (Bonnefont, 2008).

1.3. Matière organique, matière minérale, matière sèche

La teneur en matière organique est très élevée durant les cinq campagnes. Elle varie entre 99,9% et 87,94% avec une moyenne de 90,15%. Ce qui est logique étant donné que toute l'alimentation du bétail est à base de produits organiques. Par contre la matière minérale, avec un taux maximum de 12,06% reste très faible. La matière sèche équivaut à 15,01% en moyenne.

2. Caractéristiques microbiologiques de liquide ruminal

L'analyse microscopique de la microflore du contenu ruminal, après coloration de Gram, révèle une dominance absolue des bactéries Gram négatifs par rapport aux bactéries Gram positifs.

Dans le cas du liquide ruminal "Tel quel", le niveau de la population bactérienne Gram négatif est supérieur à la population des bactéries Gram positif. Après filtration nous observons une diminution de la population des Gram positifs.

Les mêmes résultats sont observés dans tous les essais, la seule différence résulte dans la charge microbienne, il y a des frottis très denses en terme de charge microbienne d'autres montrent des densités moyennes voire très faibles.

Plusieurs formes de bactéries ont été identifiées avec des tailles et des taux de présence différents selon le type de Gram et selon le liquide ruminal : cocci, bacilles et vibrions, cocci isolés, diplocoques, vibrions, bacilles isolés, cocci en chainettes, bactéries, bacilles en chainettes, spirales.

Après 48h de fermentation, on observe une nette diminution des bactéries Gram négatifs, et presque une absence totale des bactéries Gram positifs et absence de débris alimentaires.

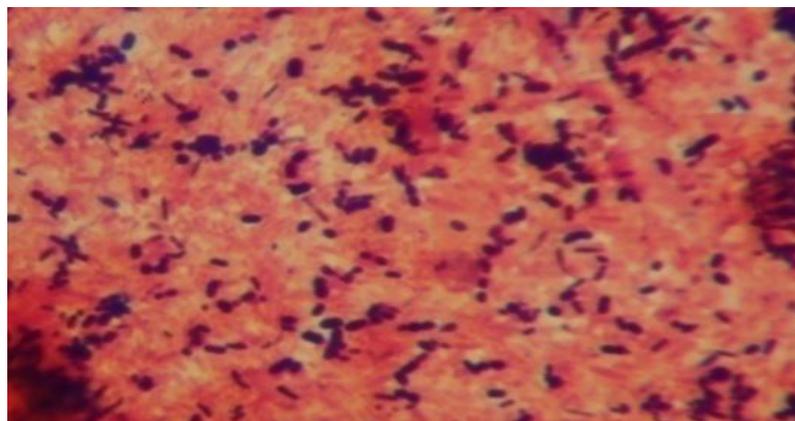


Figure 24 - Observation microscopique des bactéries Gram⁺ et Gram⁻ du liquide ruminal tel quel (grossissement X 1000).

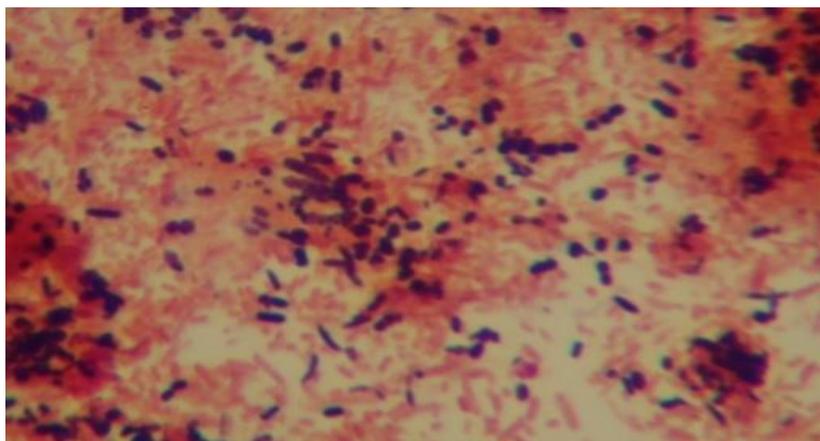


Figure 25 - Observation microscopique des bactéries Gram + et Gram- du liquide ruminal filtré (grossissement X 1000).

3. Epuisement de l'azote et de l'énergie résiduels

La production de gaz durant la phase d'épuisement est corrélée avec la charge d'énergie du liquide ruminal lui-même. Cette charge varie selon le type d'alimentation du bovin et la phase digestive des ces aliments.

La production de gaz n'est pas la même dans les différents essais. Il y a production de gaz très élevée (15.9 ml) dans le cas de liquide ruminal enrichi en amidon (présence d'une grande quantité d'énergie). Par contre dans les autres essais la production est nettement très faible (1.5 ml), c'est le cas de liquide ruminal pailleux ou riche en herbe (tableau 9).

Au bout de 5 à 6 heures le plateau de la courbe est atteint. Conséquence de l'épuisement des sources d'énergie et d'azote, identique à la fermentation dans le témoin (blanc) où il n'y a aucune source d'azote ou d'énergie,

Avec une production de gaz de 15.9ml obtenus dans un essai, nos résultats sont proches de ceux de Cone et *al.*, (2009) : (15ml) obtenus au bout de cinq heures. La différence réside dans le fait que Cone et *al.*, (2009) ajoute du sucre dans le milieu alors que notre milieu ruminal est riche en amidon. L'amidon a remplacé les sucres ajoutés par Cone et *al.*, (2009).

Tableau 9 - Volume maximum et minimum (en ml) de production de gaz lors des différents prélèvements (après 5-6h d'épuisement à 39°C).

Date de prélèvement	06/04/2016	12/04/2016	26/04/2016	04/05/2016	16/05/2016	24/05/2016
Duré d'incubation	5	6	7	5	6	6
Volume minimum	2,4	3,6	0,6	0,3	0,3	0,6
Volume maximum	5,4	15,9	1,5	1,8	1,5	1,5

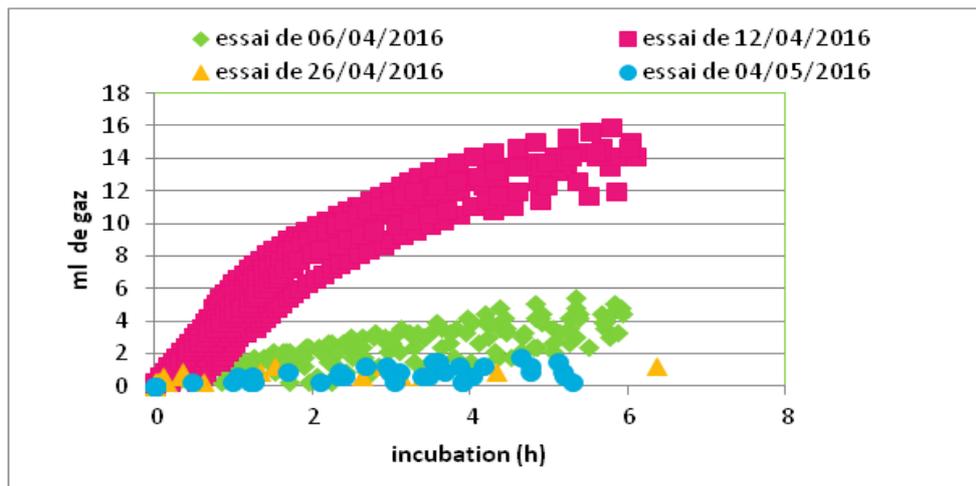


Figure 26 - Courbes d'épuisement des différents essais (15ml liquide ruminal filtré + 15ml milieu d'épuisement).

4. Utilisation des sources d'azote alternatives comme source d'énergie

Les sources d'azote alternatives peuvent-elles servir de substrats énergétiques pour les microorganismes du rumen ? C'est ce que nous avons essayé de vérifier à travers l'expérience suivante :

Soumis à une pré-incubation de 5 h, l'énergie et l'azote de l'inoculum sont épuisés. A ce milieu nous avons ajouté 4 quatre sources d'azote qui vont subir l'action des microorganismes du rumen. Il s'agit : du glutamate de sodium, de l'extrait de levure, du nitrate de potassium et du bicarbonate d'ammonium.

Après une phase de fermentation qui a duré 24 h, nous observons les résultats suivants :

- ✓ le glutamate de sodium a donné le plus grand volume de gaz (21,6 ml) de gaz. Cette production un peu lente les premières heures s'est accélérée après 15 heures de fermentation ;
- ✓ l'extrait de levure a produit environ 11,1ml, mais d'une façon régulière en fonction de temps ;
- ✓ le nitrate de potassium a produit très peu de gaz (1,8 ml) ;
- ✓ le bicarbonate d'ammonium n'a rien produit comme gaz. On peut conclure qu'il n'est pas utilisé comme source d'énergie.

Nous pouvons conclure que : l'hydrolyse du glutamate de sodium et de l'extrait de levure libèrent de l'ATP et produisent plus de gaz. De ce fait ces substances sont utilisées comme source d'azote et d'énergie. Contrairement à KNO_3 et NH_4HCO_3 qui après dissociation donnent les ions NO_3^- et NH_4^+ (respectivement) qui vont servir de sources d'azote.

Le carbone de l'anion HCO_3^- sera utilisé comme source de carbone, mais ne produit pas d'ATP nécessaire pour l'utilisation de l'azote d'où la faible production de gaz (figure 27, tableau 10).

Finalement, la flore ruminale utilise d'une façon très normale les sources d'azote organique (extrait de levure et glutamate de sodium) comme source d'énergie, par contre les sources d'azote inorganique (bicarbonate d'ammonium et nitrate de potassium) ne sont que faiblement utilisées.

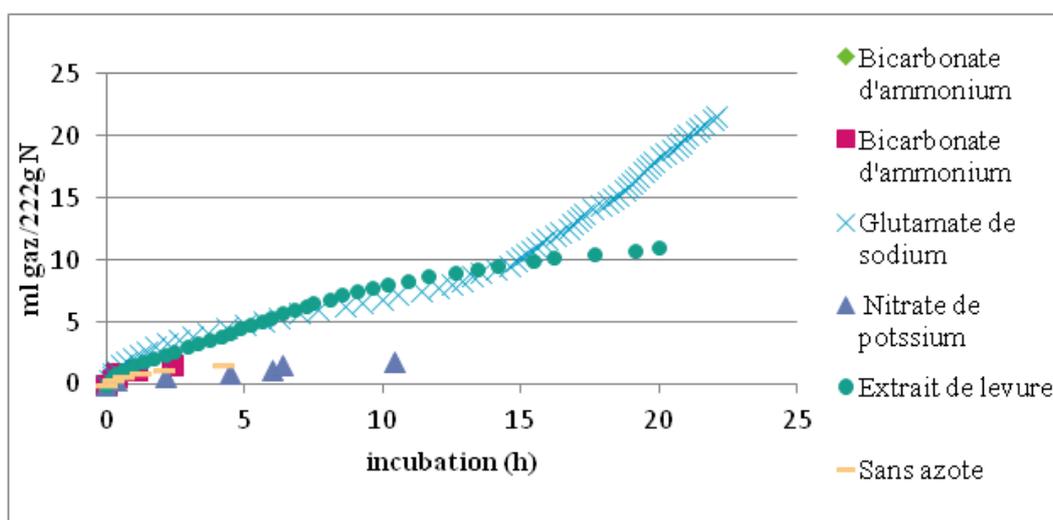


Figure 27 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'azote.

Tableau 10 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'azote.

Sources d'azote		Temps de latence (h)	Volume max de gaz (ml)	Pente
Inorganique	Bicarbonate d'ammonium	0,24	1,5	Basse
	Nitrate de potassium	0,33	1,8	Basse
Organique	Glutamate de sodium	0,10	21,6	Elevée
	Extrait levure	0,24	19,98	Elevée
Sans azote (blanc)		0,25	1,5	Basse

pH final

Après 24 h d'incubation, on observe une variation du pHi après fermentation des sources d'énergie, s'agissant de source organique ou inorganique, le pHi (6.8), a augmenté, légèrement pour glutamate de sodium ($C_5H_8NO_4Na$) (6,89) et nitrate de potassium (6,97) et de façon marquée pour l'extrait de levure (7,06), le bicarbonate d'ammonium et le blanc (7,07) (tableau 11).

Tableau 11 - Variation du pH après fermentation de sources d'énergie.

Sources d'azote		pHi	pH final	Δ pH
Inorganique	Bicarbonate d'ammonium	6,8	7,04	0,24
	Nitrate de potassium		6,97	0,17
Organique	Glutamate de sodium		6,89	0,09
	Extrait levure		7,06	0,26
Sans azote (blanc)			7,07	0,27

Le classement décroissant des substrats sur la base de leur pH après fermentation est le suivant : blanc (7,07) > extrait levure (7,06) > Bicarbonate d'ammonium (7,04) > Nitrate de potassium (6,97) > Glutamate de sodium (6,89).

On constate que les substrats riches en éléments azotés qu'ils soient organiques ou inorganiques (levure et le bicarbonate d'ammonium) sont les mieux utilisés par la microflore ruminale comme source d'énergie, leur consommation pour la lyse cellulaire est responsable de l'alcalinisation de milieu, ce résultat est confirmé par le blanc ne contenant aucune source d'azote et qui possède un pH final 7,07 similaire à celui de l'extrait de levure et du bicarbonate d'ammonium.

Ly *et al.*, 1997 explique cette augmentation du pH après fermentation, soit par la libération de CO_2 à partir du système, soit par une augmentation de la concentration d'ammonium suite à une lyse cellulaire des microorganismes qui persistent dans le mélange.

S'agissant du nitrate de potassium et du glutamate de sodium pour lesquels on devrait, logiquement observer une augmentation du pH. En effet, l'hydrolyse de ces deux substrats met en solution des ions K^+ et Na^+ générant des bases fortes (KOH et NaOH), leur dissociation totale dans le milieu libère les ions hydroxydes (OH^-) qui font augmenter le pH. Cette situation n'est pas observée et les pH de ces deux substrats sont pratiquement identiques au pHi. Ceci atteste de la présence d'un pouvoir tampon atténuant l'excès des ions hydroxydes.

5. Effet des sources d'azote inorganique sur les principaux groupes bactériens du rumen

5.1. Effet du bicarbonate d'ammonium

Suite à une coupure d'électricité qui a duré 13 heures, l'enregistrement de la fermentation a été perturbé. Nous discutons ici les données enregistrées durant les 5 heures avant la panne d'électricité

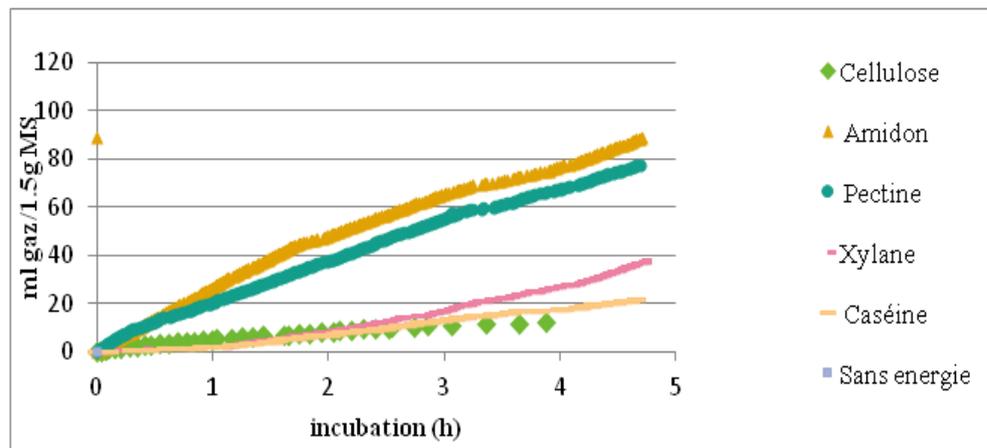


Figure 28 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie (en présence de bicarbonate d'ammonium).

La figure 28 illustre l'évolution de la production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie en présence du bicarbonate d'ammonium.

Les résultats mentionnés dans le tableau 12 montrent que le bicarbonate d'ammonium a été utilisé directement par tous les groupes bactériens du rumen, marqués par un temps de latence très court de 0,01 h à 0,24 h sauf dans le blanc où nous avons noté un temps de latence très lent suite à l'absence de source d'énergie.

Tableau 12- caractéristiques cinétique de la dégradation des sources d'énergie (en présence de bicarbonate d'ammonium).

Sources d'énergie et source d'azote	Temps de latence (h)	Volume max de gaz (ml)	Pente
Bicarbonate d'ammonium + cellulose	0,04	16,5	basse
Bicarbonate d'ammonium + amidon	0,01	88,8	Elevé
Bicarbonate d'ammonium + pectine	0,02	87,90	Elevé
Bicarbonate d'ammonium + xylane	0,24	39	Moyenne
Bicarbonate d'ammonium + caséine	0,10	21,6	basse
Bicarbonate d'ammonium sans énergie	-	0.0	-

Les bactéries amylolytiques et les pectinolytiques ont démarré plus vite avec une vitesse maximum produisant 88,8ml et 87,90ml de gaz pour les amylolytiques et les pectinolytiques respectivement (tableau 12).

Les xylanolytiques, avec une production de gaz maximale de 39ml, démarrent avec une vitesse plus faible comparativement aux deux premiers groupes. Ils sont suivi par les protéolytiques qui démarrent avec la même vitesse et le volume de gaz que les pectinolytiques. Après 3h environ la vitesse est ralentie et le volume de gaz produit diminue ne dépassant pas 21.6ml.

Enfin, les cellulolytiques se classent en dernier avec un volume ne dépassant pas 16.5ml (figure 28 ; tableau 12).

En conséquence, le bicarbonate d'ammonium stimule bien les bactéries pectinolytiques et les amylolytiques.

Le classement décroissant des groupes bactériens selon leur stimulation par le bicarbonate d'ammonium est le suivant :

Pectinolytiques > amylolytiques > xylanolytique > protéolytiques > cellulolytiques.

pH final

Après 5 h d'incubation l'activité métabolique se traduit par la variation du pH du milieu, les valeurs du pH de différents substrats sont comprises entre 7,22 (xylane) et 6,9 (caséine) (tableau 13).

Tableau 13 - variation du pH cinétique de production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie en présence de bicarbonate d'ammonium.

Sources d'énergie	pHi	pH final	ΔpH
Cellulose	6,83	7,02	0,19
Amidon		6,55	- 0,28
Pectine		6,74	- 0,09
Xylane		7,22	0,39
Caséine		6,9	0,3
Sans sucres (blanc)		7,02	0,19

On constate que le pH final de la pectine et l'amidon avec des valeurs 6,74 et 6,55 respectivement est inférieur au le pHi du milieu (6,83). Ces deux polymères sont les plus fermentés avec un maximum de production de gaz, donc cette différence peut s'expliquer par une accumulation des produits métaboliques dans le milieu. La caséine aussi après fermentation il abaissé le pHi de l'inoculum vers 6,9.

Le xylane a induit une augmentation du pH (7,22) ainsi que la cellulose et le blanc (7,02) pour les deux, cette augmentation est déjà justifier dans l'essai précédant selon Ly *et al.*, (1997).

Les valeurs de ΔpH ($pH_f - PHi$) sont négatives dans le cas de l'amidon, la pectine et la caséine ce qui signifie une acidification du milieu résultant de la forte activité métabolique bactérienne. Par contre, dans le cas de la cellulose et du blanc le ΔpH est positif témoignant d'une faible activité métabolique (tableau 13).

Le classement décroissant des substrats sur la base de leur pH après fermentation est le suivant :

Xylane (7,22) > cellulose et le blanc (7,02) > pectine (6,74) > amidon (6,55) > caséine (6,9).

5.2. Effet du nitrate de potassium

Les résultats, consignés dans le tableau 14, montrent, qu'au bout de 68 h, les pectinolytiques et les amylolytiques utilisent bien le nitrate de potassium. Leur production de gaz est presque similaire 497 et 471,7 ml de gaz mais les pectinolytiques commencent par une vitesse plus grande que les amylolytiques. L'hémicellulolytique produit un peu moins, 363 ml. La caséine encore moins que les trois premiers groupes bactériens (99 ml). Les cellulolytiques ne produisent que 24,60 ml métabolisant difficilement le nitrate de potassium (figure 29) (Tableau 14).

Tableau 14 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'énergie (en présence du nitrate de potassium).

source d'azote et Sources d'énergie	Temps de latence (h)	Volume max de gaz (ml)	Pente
Nitrate de potassium + cellulose	0,08	24,60	Basse
Nitrate de potassium + amidon	0,03	471,9	Elevée
Nitrate de potassium + pectine	0,01	497	Elevée
Nitrate de potassium + xylane	0,18	363	Elevée
Nitrate de potassium + caséine	0,01	99	Basse
Nitrate de potassium sans énergie	0,10	4.5	Basse

En conséquence, le nitrate de potassium stimule bien les bactéries pectinolytiques et amylolytiques et un peu moins les xylanolytique par contre inhibe les cellulolytiques.

Le classement décroissant des groupes bactériens selon leur stimulation par le bicarbonate d'ammonium est le suivant :

Pectinolytiques > amylolytiques > xylanolytique > protéolytiques > cellulolytiques.

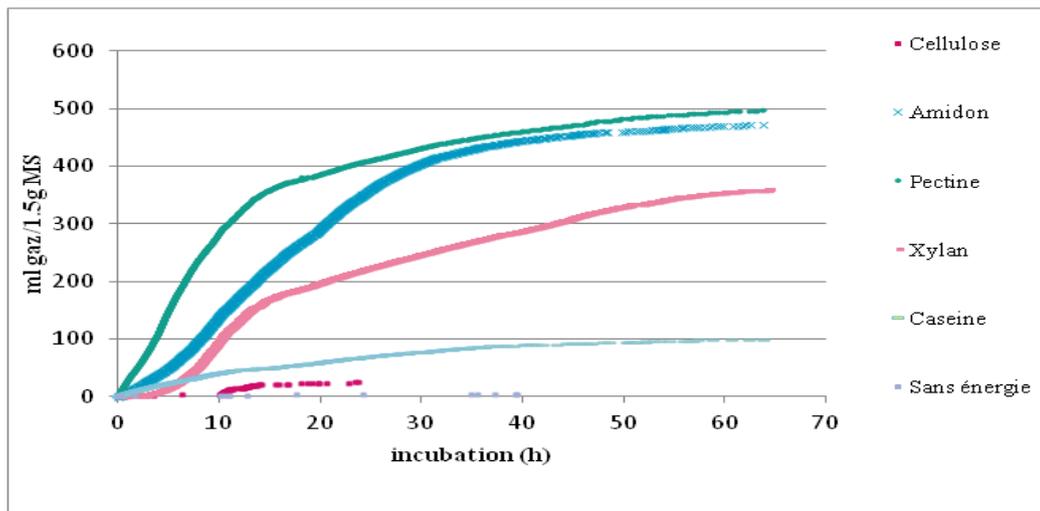


Figure 29 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie (en présence du nitrate de potassium).

pH final

Les valeurs du pH, mesurées après 68 h d'incubation, des sources d'énergie en présence nitrate de potassium varient entre 6,97 et 6,78

Tableau 15 - Variation du pH après fermentation des sources d'énergie (en présence du nitrate de potassium).

Sources d'énergie	pHi	pH final	Δ pH
cellulose	6,81	6,91	0,1
amidon		6,78	- 0,03
pectine		6,89	0,08
xylane		6,85	0,04
caséine		6,91	0,1
sans sucres (blanc)		6,97	0,16

Les données du tableau 15 montrent une augmentation des valeurs du pH dans tous les substrats excepté l'amidon dont le métabolisme donne l'acide lactique, acidifiant le milieu.

La dégradation des protéines (ici la caséine) libère de l'ammonium (NH_4^+), une base à caractère fortement basique induisant une augmentation de pH du milieu (Berg *et al*, 2013).

Le classement décroissant des substrats sur la base de leur pH après fermentation est le suivant :

Blanc (6,97) > cellulose et caséine (6,91) > pectine (6,89) > xylane (6,85) > amidon (6,78).

6. Effet des sources d'azote organique sur les principaux groupes bactériens du rumen

6.1. Effet du glutamate de sodium

Le tableau 16 ci-dessous donne les résultats cinétiques de la dégradation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium).

Tableau 16 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'énergie (en présence du glutamate de sodium).

source d'azote et Sources d'énergie	Temps de latence (h)	Volume max de gaz (ml)	Pente
Glutamate de sodium + cellulose	16,06	123,6	Elevée
Glutamate de sodium + amidon	1,27	414	Elevée
Glutamate de sodium + pectine	0,03	472,20	Elevée
Glutamate de sodium + xylane	2,20	311,1	Basse
Glutamate de sodium + caséine	0,04	219,6	Basse
Glutamate de sodium sans énergie	10,53	14,1	Très Basse

Les résultats donnés dans le tableau 16 montrent qu'au bout de 48 h de fermentation, c'est la dégradation de la pectine qui, après un temps de latence de 0.03h, produit le plus grand volume de gaz (472,20 ml) suivi de l'amidon (414 ml) au bout de 17 h, avec une vitesse moins grande que la pectine mais supérieure aux autres substrats. Le xylane et la caséine démarrent avec une pente faible, produisant 311,1 ml et 219.6 ml après un temps de latence de 2.20 h et 0.04 h respectivement. La cellulose possède un grand temps de latence (16.06 h) et pente très basse.

La faible production de gaz est produite là où il n'y a aucune source d'énergie.

En conséquence, le glutamate de sodium stimule bien les bactéries pectinolytiques, et à un moindre degré le reste des bactéries (amylolytiques, xylanolytique protéolytiques).

Le classement décroissant des groupes bactériens selon leur stimulation par glutamate de sodium est le suivant:

Pectinolytiques > amylolytiques > xylanolytique > protéolytiques > cellulolytiques.

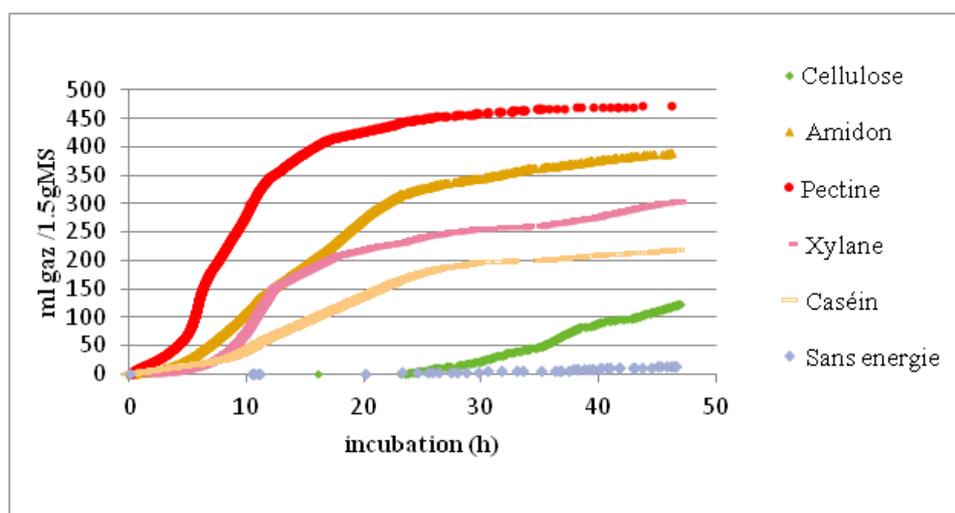


Figure 30 - Production de gaz durant la fermentation des sources d'énergie (en présence du glutamate de sodium).

pH final:

Après les 48 heures de fermentation nous avons constaté une chute dans les valeurs des pH en générale (tableau 17) surtout les pH pectine, amidon et xylane (5,34 ; 4,66 et 5,45 respectivement).

Tableau 17 - variation du pH après fermentation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium.

Sources d'énergie	pHi	pH final	Δ pH
Cellulose	6,88	5,80	- 1,08
Amidon		4,66	- 2,22
Pectine		5,34	- 1,54
Xylane		5,45	- 1,43
Caséine		6,63	- 0,25
sans sucres (blanc)		6,53	- 0,53

Cette diminution résulte de la grande activité métabolique qui produit les AGV responsables l'acidification de milieu. La caséine a montré une bonne activité métabolique mais avec une acidification moindre comparée aux autres sources. Ceci est dû à sa nature protéique, qui, lors de sa dégradation libère des acides aminés qui n'affectent le pH de milieu.

La cellulose, comparée aux trois autres polymères, induit une légère acidification (5,80) manifestation d'une faible activité métabolique.

Dans cet essai toutes les valeurs du ΔpH ($pH_f - PHi$) sont négatives conséquences d'une intense activité métabolique entraînant une forte acidification de milieu (tableau 17).

Le classement décroissant des substrats sur la base de leur pH après fermentation est le suivant :

Caséine (6,63) > blanc (6,53) > cellulose (5,80) > xylane (5,45) > pectine (5,34) > amidon (4,66).

6.2. Effet de l'extrait de levure

Les résultats de l'effet de l'extrait de levure sur la dégradation des sources d'énergie et de la production de gaz durant la fermentation sont donnés dans le tableau 18 et illustrés par les courbes de la figure 21.

Tableau 18 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation des sources d'énergie (en présence de l'extrait de levure).

source d'azote et Sources d'énergie	Temps de latence (h)	Volume max de gaz (ml)	Pente
Extrait de levure + cellulose	0,03	411,9	Basse
Extrait de levure + amidon	0,04	517,8	Très élevée
Extrait de levure + pectine	0,01	606,6	Très élevée
Extrait de levure + xylane	0,04	473,7	Moyenne
Extrait de levure + caséine	0,03	283,2	Basse
Extrait de levure sans énergie	0,49	36	Basse

Selon les résultats mentionnés dans le tableau 18 et après 72 h d'incubation, les pectinolytiques et les amylolytiques sont les mieux métabolisés en présence de l'extrait de levure. Ils produisent 606,6 et 517,8 ml de gaz après un temps de latence très courte (0.01 h et 0.04 h respectivement) et une très grande vitesse. A un moindre degré viennent les xylanolytiques mais moins que les pectinolytiques et les amylolytiques. Ils produisent 473,7 ml de gaz avec une grande vitesse et un temps de latence très court. Les protéolytiques commencent par une grande vitesse et produisent 283,2 ml. Par contre les cellulolytiques commencent par une vitesse très faible mais produisent 411,9 ml. Le blanc, sans énergie, produit une certaine quantité de gaz équivalente à 36 ml qui confirme le résultat du premier essai pour l'utilisation de l'extrait de levure (source d'azote) comme source d'énergie (figure 31) (tableau 18).

En conséquence, l'extrait de levure stimule bien les bactéries pectinolytiques, amylolytiques, xylanolytiques et aussi les cellulolytiques.

Le classement décroissant des groupes bactériennes selon leur stimulation par l'extrait de levure est le suivant :

Pectinolytiques > amylolytiques > xylanolytique > cellulolytiques > protéolytiques.

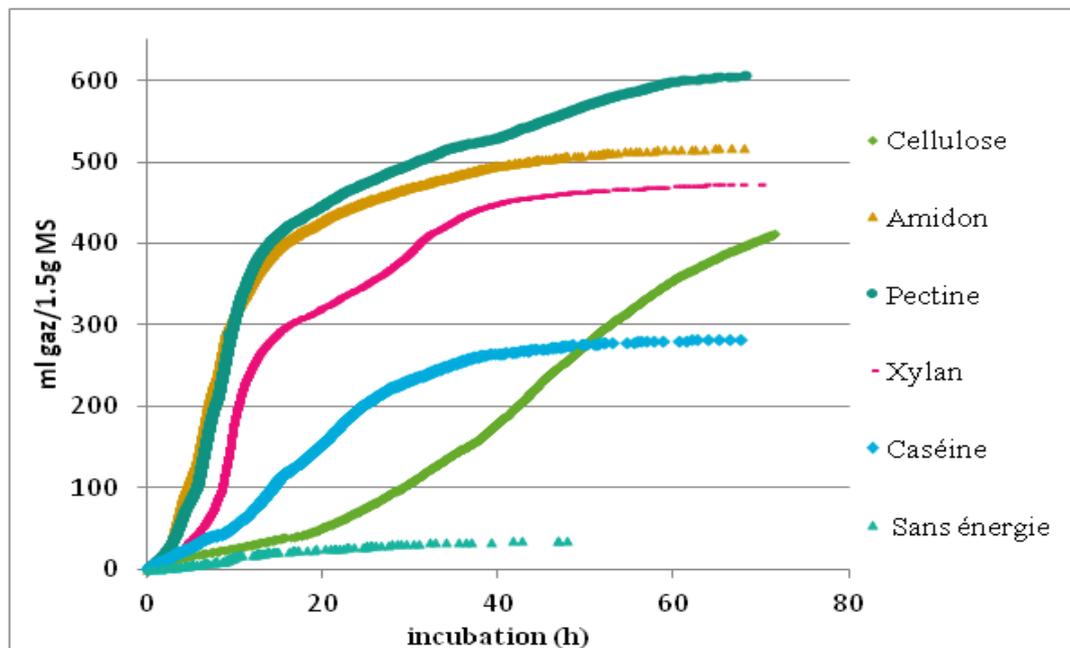


Figure 31 - Production du gaz durant la fermentation des sources d'énergie (en présence de l'extrait de levure).

pH final

Les pH mesurés après 72 h d'incubation des sources d'énergie en présence de l'extrait de levure varient entre 6,62 et 5,25. Ils ont diminué, sauf pour le blanc. (tableau 19).

Les valeurs des différences entre pH_i et pH_f sont négatives indice d'une forte activité métabolique qui provoque une acidification de milieu avec une forte acidification dans le cas de l'amidon (tableau 19).

Le classement décroissant des substrats sur la base de leur pH après fermentation est le suivant : Blanc (6,62) > caséine (6,21) > xylane (5,84) > cellulose (5,83) > pectine (7,70) > amidon (5,25).

Tableau 19 - Variations du pH après fermentation des sources d'énergie (en présence de l'extrait de levure).

Sources d'énergie	pHi	pH final	Δ pH
Cellulose	6,69	5,83	- 0,86
Amidon		5,25	- 1,44
Pectine		5,70	- 0,99
Xylane		5,84	- 0,85
Caséine		6,21	- 0,48
Sans sucres (blanc)		6,62	- 0,07

7. Effet des quatre sources d'azote sur les bactéries cellulolytiques

Au bout de 48 h, on remarque dans les courbes qu'il y a une diversité dans la production de gaz lors de la fermentation de chaque source d'azote et des temps de latence courts avec des vitesses variant d'un substrat à un autre (tableau 20).

Tableau 20 - Caractéristiques cinétiques de la dégradation de cellulose (en présence des différentes sources d'énergie).

Source d'énergie et sources d'azote		Temps de latence (h)	Volume max de gaz (ml)	Pente
Inorganique	Cellulose + bicarbonate d'ammonium	0,10	24,9	Elevée
	Cellulose + nitrate de potassium	0,03	12,3	Basse
Organique	Cellulose + glutamate de sodium	0,05	50,7	Moyenne
	Cellulose + extrait levure	0,02	190,5	Elevée
Cellulose sans azote (balance azote)		0,01	78,6	Moyenne
Sans azote et sans énergie (blanc énergie et azote)		0,05	7,5	Basse

D'après les résultats consignés dans le tableau (20), l'extrait de levure produit, après un temps de latence de 0.02 h le plus grand volume de gaz, estimée à 190,5 ml avec une vitesse plus rapide par rapport aux autres milieux. Il est suivi du glutamate de sodium (50,70 ml) produit après un temps de latence de 0.05 h, du bicarbonate d'ammonium avec un volume de 24,9 ml après un temps de latence de 0.10 h.

La faible production de gaz est enregistrée pour nitrate de potassium (12,3 ml) avec une vitesse lente et un temps de latence de 0.03 h.

La production de gaz dans le blanc ‘‘cellulose seule’’ est proche de 78.6ml est un volume important par rapport au manque de source d’azote, le blanc (énergie azote) ne produit que 7.5 ml (figure 32) (tableau 20).

Enfin l’extrait levure est la source d’azote qui stimule le mieux le groupe cellulolytique. Le glutamate de sodium et le bicarbonate d’ammonium ne stimulent pas autant que l’extrait levure. Le nitrate de potassium inhibe l’activité cellulolytique, car dans le milieu qui est composé de la cellulose uniquement, la production du gaz est plus élevée par rapport au blanc

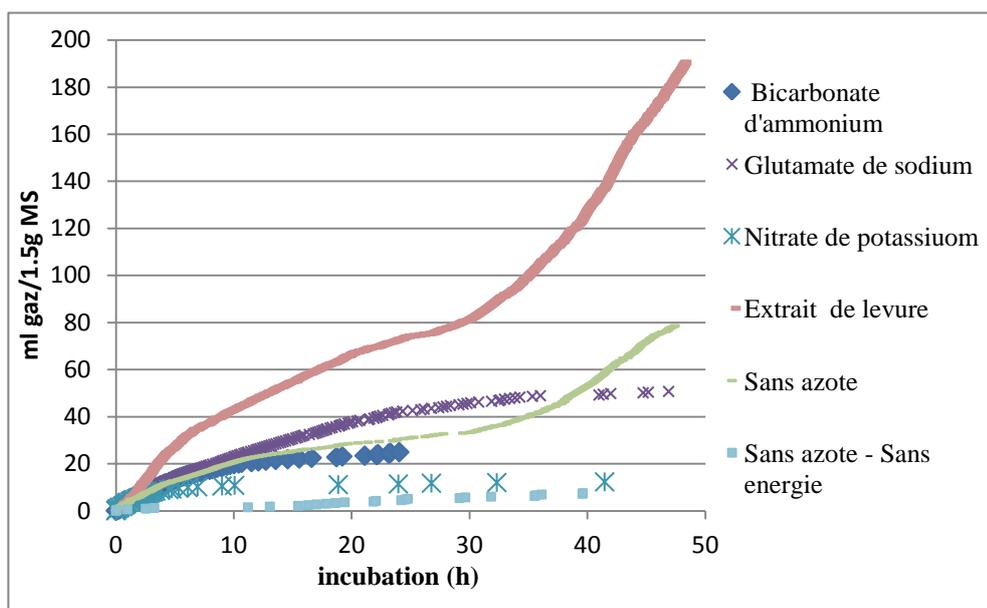


Figure 32 : Production de gaz durant la fermentation de la cellulose (en présence des sources d’azote).

pH final

Les variations du pH, après fermentation de la cellulose en présence des différentes sources d’azote sont données dans le tableau ci-dessous.

Tableau 21 - Variations du pH après fermentation de la cellulose (en présence des différentes sources d’azote).

Sources d’azote	pHi	pH final	Δ pH
Bicarbonate d’ammonium	6,74	6,98	0,24
Glutamate de sodium		6,89	0,15
Nitrate de potassium		6,96	0,22
Extrait de levure		6,70	- 0,04
Sans azote (blanc énergie)		6,73	- 0,01
Sans azote sans énergie (blanc énergie azote)		6,91	0,17

Les valeurs du pH mesurées après 48 h d'incubation de la cellulose en présence des sources d'azote alternatives varient de 6,69 à 6,98. La valeur la plus élevée est obtenue pour le bicarbonate d'ammonium (6,98) supérieure au pH initial, supériorité due à une faible activité métabolique produisant très peu de gaz. La quantité d'AGV est insuffisante pour provoquer une acidification du milieu. La plus basse valeur du pH est enregistrée pour l'extrait levure (6,70) qui métabolise bien la cellulose avec production des AGV responsables de l'acidification du milieu.

Le glutamate de sodium et nitrate de potassium alcalinisent ont tendance à alcaliniser le milieu avec des valeurs pH : 6,89 et 6,96 respectivement.

Les valeurs ΔpH ($pH_f - pHi$) sont positives et varient de 0,17 à 0,24 ce qui signifie une légère augmentation des pH des milieux.

Mais les pH finaux de l'extrait de levure et du blanc sans énergie sont restés presque inchangés, contrairement au pH final du blanc 'sans azote' et 'sans énergie azote', qui a augmenté d'un dixième d'unité pH à cause de la lyse cellulaire (tableau 21).

Le classement décroissant des substrats sur la base de leur pH après fermentation est le suivant : blanc énergie azote (6,91) > Bicarbonate d'ammonium (6,98) > Nitrate de potassium (6,96) > Glutamate de sodium (6,89) > blanc énergie (6,73) > extrait levure (6,70).

8-Tableaux récapitulatifs des temps de latence, du volume maximum, des pentes de production de gaz et des pH finaux.

8.1-Tableau récapitulatif des temps de latence

Tableau 22 - Récapitulatif des temps de latence lors de la fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote (h)

Sources d'azote		Sources d'énergie				
		Cellulose	Amidon	Pectine	Xylane	Caséine
Sources d'azote inorganique	Bicarbonate d'ammonium (5 h)	0,04	0,01	0,02	0,24	0,10
	Nitrate de potassium (68 h)	0,08	0,03	0,01	0,18	0,01
Sources d'azote organique	Glutamate de sodium (48 h)	16,06	1,27	1,27	2,20	0,04
	Extrait de levure (72 h)	0,03	0,04	0,01	0,04	0,03

Le temps de latence de production de gaz varie d'un substrat à un autre. Le temps le plus court est celui de la dégradation de la caséine en présence du nitrate de potassium (0,01 h), et le plus long est celui de la dégradation de la cellulose en présence du glutamate de sodium (16,06 h).

On constate aussi que la fermentation des sources d'énergie en présence de l'extrait de levure comme source d'azote prend des temps de latences très courts de 0,01 h à 0,04 h pour toutes les sources d'énergie (tableau 22).

8.2-Tableau récapitulatif des volumes maximum

Tableau 23 - Tableau récapitulatif des volumes maximum lors de la fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote (ml de gaz)

Sources d'azote		Sources d'énergie				
		Cellulose	Amidon	Pectine	Xylane	Caséine
Sources d'azote inorganique	Bicarbonate d'ammonium (5 h)	16,5	88,8	87,90	93	21,6
	Nitrate de potassium (68 h)	24,60	471,9	497	363	99
Sources d'azote organique	Glutamate de sodium (48 h)	123,6	414	472,20	311,1	219,6
	Extrait de levure (72 h)	411,9	517,8	606,6	473,7	283,2

Le volume de gaz produit durant la phase de fermentation traduit l'activité métabolique de la flore microbienne du rumen. Les pectinolytiques produisent la plus grande quantité de gaz, (606,6 ml) en présence de l'extrait de levure et des autres sources d'azote. Les pectinolytiques donnent dans tous les cas de figure la plus grande quantité de gaz que les autres groupes bactériens. Les cellulolytiques produisent toujours une faible quantité de gaz que les autres groupes bactériens sauf avec l'extrait de levure (411,9 ml) et même supérieur à la production des bactéries protéolytiques (tableau 23).

8.3 -Tableau récapitulatif des pentes de production de gaz

Tableau 24 - Tableau récapitulatif des pentes de production de gaz lors de la fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote.

Sources d'azote		Sources d'énergie				
		Cellulose	Amidon	Xylane	Pectine	Caséine
Sources d'azote inorganique	Bicarbonate d'ammonium (5 h)	Basse	Elevée	Moyenne	Elevée	Basse
	Nitrate de potassium (68 h)	Basse	Elevée	Elevée	Elevée	Basse
Sources d'azote organique	Glutamate de sodium (48 h)	Elevée	Elevée	Basse	Elevée	Basse
	Extrait de levure (72 h)	Basse	Très élevée	Moyenne	Très élevée	Basse

Les premières heures de la fermentation des sources d'énergie commencent par des vitesses différentes et spécifiques à chaque substrat, représenté par les pentes des courbes de la production de gaz.

Les courbes de la fermentation de l'amidon et la pectine montrent des pentes élevées et en présence de l'extrait de levure des pentes très élevée.

Les courbes de la fermentation de caséine montrent toujours des pentes basses avec toutes les sources d'azote. Le xylane possède des pentes variées. La pente de cellulose est généralement basse (tableau 24).

8.4 -Tableau récapitulatif des pH finaux

Tableau 25 - Tableau récapitulatif des pH finaux après fermentation des sources d'énergie en présence de source d'azote

Sources d'azote		Sources d'énergie				
		Cellulose	Amidon	Xylane	Pectine	Caséine
inorganique	Bicarbonate d'ammonium (5 h)	7,02	6,55	6,74	7,22	6,9
	Nitrate de potassium (68 h)	6,91	6,78	6,89	6,85	6,91
organique	Glutamate de sodium (48 h)	5,80	4,66	5,34	5,45	6,63
	Extrait de levure (72 h)	5,83	5,25	5,70	5,84	6,21

L'activité métabolique et ses produits terminaux provoquent des variations du pH du milieu. Le pH initial (6,8) est augmenté dans le cas de fermentation de la pectine et de cellulose (7,22 et 7,02) en présence de bicarbonate d'ammonium qui provoque une alcalinisation de milieu.

Par contre une forte diminution du pH après fermentation de l'amidon en présence glutamate de sodium (4,66) provoque une acidification de milieu. En générale il ya une acidification de milieu après fermentation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium et de l'extrait de levure (Tableau 25).

Conclusion

Générale

Conclusion

Ce travail a porté sur l'étude de l'effet des sources d'azote organique et inorganique sur la microflore ruminale. Les résultats obtenus pour l'analyse microbiologique ont permis de mettre en évidence la composition bactérienne de l'inoculum, qui montre une dominance des bactéries Gram⁻ par rapport aux bactéries Gram⁺. La filtration appauvrit l'inoculum en Gram⁺. Les bactéries Gram⁻ sont plus diversifiées que les Gram⁺.

Les pH obtenus après fermentation présentent une grande variation selon les substrats fermentés. La production de gaz lors de la fermentation traduit l'activité métabolique de chaque groupe de la flore ruminale.

La fermentiscibilité *in vitro* montrent que les pectinolytiques, les amylolytiques et les xylanolytiques se procurent rapidement de l'énergie qui leur permet d'utiliser les différentes sources d'azote alors que les cellulolytiques et les et protéolytiques, obtiennent plus lentement de l'énergie à cause des difficultés de la dégradation de la cellulose et de la caséine et présentent plus de difficulté à utiliser les différentes sources d'azote.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson JD. 1986.

Biologie moléculaire de la cellule. *Flammarion*. Paris. pp 114 -1103.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. 2004.

Biologie moléculaire de la cellule. *Flammarion Médecine Sciences*. Paris. p 103.

Amokrane S. 2010.

Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale. Mémoire de magister. Université de Constantine. pp 11-21.

Bach A., Calsamiglia S. and Stern M. D. 2005.

Nitrogen Metabolism in the Rumen. *American Dairy Science Association*. 88: pp 9-21.

Belbis G. 2007.

Flore du Rumen : origine, composition, évolution, conséquences physiopathologiques. Thèse doctorat vétérinaire. École nationale vétérinaire d'Alfort. pp 17- 135.

Berg G.M., Tymoczko J. L., Stryer L. and Gatto G.J. 2013.

Biochimie. *Médecine Science publications*. Lavis (Italie). pp 674-680.

Bonnefont C. 2008.

Le potentiel Redox et le milieu ruminal. Mémoire de Master. Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse. pp 7-10.

Briki K. and Debab S. 2009.

Etude microbiologique de la microflore ruminale des ovins, Méthanogènes et additifs alimentaires. Mémoire en ligne. Université Mohamed Boudiaf, Msila, Algérie.

Clos J. 2012.

Les fonctions de nutrition chez les animaux. *Ellipses*. Paris. pp 70-90.

Cone J.W., Rodrigues M.A.M., Guedes C.M. and Blok M.C. 2009.

Comparison of protein fermentation characteristics in rumen fluid determined with the gas production technique and the nylon bag technique. *Animal Feed Science and Technology*. 153 : pp 26-38.

Cuvelier C., Cabaraux J-F., Dufrasne L. and Hornick J-L. 2005.

Production, digestion et absorption des acides gras chez le ruminant. *Médecine Vétérinaire* . 149 : pp 49-59.

Dusart C. 2014.

La digestion ruminale : mise en place d'un modèle d'étude in vitro à long terme en culture batch. Thèse doctorat en Sciences Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. pp 33- 40.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1991.

25 mai 2016. <http://www.fao.org/>.

Fonty G. and Chaucheyras-Durand F. 2006.

Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia, Bratislava*. 61: pp 741-750.

Forano E., Broussolle V. and Duraud D. 1996.

Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. *Annales de Zootechnie*. 45 : pp 291-295.

Fonty G., Jouany J.P., Forano E. and Gouet P. 1995.

L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion. INRA Ed. Paris. pp 299-347.

Gouet P., Grain G., Dubourguier H. C. and Albagnac G. 1986.

Interaction entre espèces microbiennes anaérobies dans le rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 26 : pp 147-159.

Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce MH. and Jaurnet M. 1995.

Les constituants de l'appareil végétatif des plants fourragères, In : Nutrition des ruminants Domestiques : Ingestion et Digestion. *INRA Edition*. pp 25-81.

Jouany J.P.1994.

Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions animales*. <https://www6.inra.fr/productions-animales/>. pp 207-225.

Leulmi N. 2011.

La valorisation nutritionnelle des margines et de leur impact sur la réduction de la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Mémoire de magister. Université Constantine. pp 12-13.

Mebirouk L. 2014.

Nutrition animale. Edition office des publications Universitaire. Alger. pp 27-53.

Mordjane S. 2011.

Effet de l'ajout des résidus d'orange seuls ou en mélange avec les fourrages naturels fibreux, chrysanthème (*Chrysanthemum coronarium*) et cardes (*Silybum marianum*), sur la microflore ruminale de dromadaire et sa composant bactérienne. Mémoire de master. Université de Constantine. pp 5-6.

Morrison M. 2000.

The Microbial Ecology and Physiology of Ruminant Nitrogen Metabolism. In: Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. University of Nebraska. USA. pp 103.

National Research Council. 2001.

Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academies press (US). p 48.

Orskov E.R. and Ryle M. 1990.

Utilization of the energy of absorbed nutrients. *Animal Research and Development*. 54: pp 12-41.

Ransom-Jones E., David L. J., Alan J. McCarthy. and James E. McDonald. 2012.

The Fibrobacteres: an Important Phylum of Cellulose-Degrading Bacteria. *Springer Science Microb Ecol.* 63: pp 267-281.

Res D., Vian B. and Bajon C. 2006.

Le monde des fibres. *Ed. Belin.* Paris, pp 323-334.

Thivend P., Fonty G., Jouany J.P., Durand M. and Gouet P. 1985.

Le Fermenteur rumen. *Reprod. Nutr.* pp 729-753.

Toutain. PL. 2008.

Cours sur la digestion microbienne chez les ruminants. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.

Voet D. and Voet J.G. 2005.

Biochimie. *Édition de Boeck.* Bruxelles. pp 686-690.

Yang C., Rooke J. A., Cabeza I. and Wallace R. J. 2016.

Nitrate and Inhibition of Ruminal Methanogenesis: Microbial Ecology, Obstacles, and Opportunities for Lowering Methane Emissions from Ruminant Livestock. *Front. Microbiol.* 7: pp 1-132.

Zened A. 2011.

Particularités du microbiote et son activité lors de déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10. Thèse doctorat. Institut Nationale Polytechnologique de Toulouse. pp 32-34.

Résumé

Dans ce travail, nous avons étudié les caractéristiques physico-chimiques du liquide de rumen de bovin (matière sèche, matière organique, matière minérale, pH et potentiel redox) et les caractéristiques microbiologiques, ainsi que la fermentation des sources d'énergie (cellulose, amidon, pectine, xylane et caséines) en présence des sources d'azote organiques (glutamate de sodium et l'extrait de levure) et des sources d'azote inorganiques (bicarbonate d'ammonium et nitrate de potassium et). Ceci dans le but d'évaluer l'activité métabolique de la flore ruminale pour savoir quelle source d'azote stimule le mieux les groupes bactériens du rumen.

Les groupes bactériens du rumen qui dégradent rapidement les polymères végétaux tels que la pectine, l'amidon et l'hémicellulose, se procurent rapidement de l'énergie qui leur permet d'utiliser les différentes sources d'azote alors que les groupes bactériens qui dégradent la cellulose et la caséine, obtiennent plus lentement de l'énergie à cause des difficultés de la dégradation de la cellulose et de la caséine et présentent plus de difficulté à utiliser les différentes sources d'azote inorganique.

Les sources d'azote organiques stimulent plus l'activité métabolique des microorganismes du rumen que les sources inorganiques. L'extrait de levure stimule plus que le glutamate de sodium et le bicarbonate d'ammonium plus que le nitrate de potassium qui présente même une inhibition de l'activité métabolique en particulier chez le groupe cellulolytiques et protéolytiques.

Mots clés : rumen, azote organique, azote inorganique, source d'énergie, flore ruminale, bovin.

Summary

In this work, we studied the physicochemical characteristics of the cattle liquid of rumen (dry matter, organic matter, mineral matter, pH and redox potential) and microbiological characteristics and fermentation of energy sources (cellulose, starch, pectin, xylan and casein) in the presence of nitrogen sources organic (sodium glutamate and yeast extract) and nitrogen inorganic (ammonium bicarbonate and potassium nitrate). This is to evaluate the metabolic activity of microbial flora in the rumen to know which nitrogen source best stimulates ruminal bacterial groups.

The latter which rapidly degrade plant polymers such as pectin, starch and hemicellulose, rapidly provide energy that enables them to use different sources of nitrogen while the bacterial groups that degrade cellulose and casein, get more energy slowly because of the difficulties of the degradation of cellulose and casein and they show more difficulty in using various nitrogen sources.

Organic nitrogen sources stimulate more metabolic activity of ruminal microorganisms than inorganic sources do. Yeast extract stimulates more than sodium glutamate and ammonium bicarbonate which in their turn stimulate more than potassium nitrate which has the same inhibition of metabolic activity especially in the cellulolytic and proteolytic group.

Keywords: rumen, organic nitrogen source, inorganic nitrogen source, source of energy, rumen microbes, cattle.

ملخص

قمنا في هذا العمل بدراسة الخصائص الفيزيوكيميائية و الميكروبيولوجية لسائل كرش الأبقار (مادة جافة، مادة معدنية، مادة عضوية، نسبة الحموضة و القدرة الارجاعية) ، و الخصائص الميكروبيولوجية ، كذلك التخمير لمصادر الطاقة (السليولوز ، النشاء ، البكتين، الغزيلان والكازين) في ، مصادر النيتروجين العضوي (غلوتامات الصوديوم و خلاصة الخميرة) و مصادر النيتروجين اللاعضوي (بيكربونات الأمونيوم و نترات البوتاسيوم)، وذلك لتقييم النشاط الايضي لميكروفلورا كرش الأبقار لمعرفة ما هي مصادر الأزوت التي تحت افضل ميكروفلورا كرش الأبقار.

المجموعة البكتيرية التي تحلل البوليميرات النباتية من بينها البكتين، النشاء، و الهيميسيليلوز ، تحصل سريعا على الطاقة التي تمكنها من استعمال مصادر النيتروجين ، بينما المجموعة البكتيرية التي تحلل السيليلوز و الكزيين تحصل على الطاقة في مدة طويلة بسبب صعوبة تحليل السيليلوز و الكزيين والتي تطرح كثير من الصعوبات في تحليل مصادر النيتروجين.

مصادر الأزوت العضوية تحت اكثر النشاط الميتابوليضي لميكروميكروفلورا كرش الأبقار من مصادر الأزوت اللاعضوية ، مستخلص الخميرة يحت اكثر من الغلوتامات الصوديوم و بيكربونات الأمونيوم اكثر من نترات البوتاسيوم الذي يعتبر مثبت للنشاط الميتابوليضي خاصة مع المجموعة التي تحلل السيليلوز و البكتين .

كلمات المفتاح الكرش، مصادر النيتروجين العضوي ، مصادر النيتروجين اللاعضوي، مصادر الطاقة، ميكروفلورا الكرش، الأبقار.

Thème
Effet de la source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen de bovin: cas des cellulolytiques

**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en
MICROBIOLOGIE GENERALE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE DES MICROORGANISMES**

Résumé

Dans ce travail, nous avons étudié les caractéristiques physico-chimiques du liquide de rumen de bovin (matière sèche, matière organique, matière minérale, pH et potentiel redox) et les caractéristiques microbiologiques, ainsi que la fermentation des sources d'énergie (cellulose, amidon, pectine, xylane et caséines) en présence des sources d'azote organiques (glutamate de sodium et l'extrait de levure) et des sources d'azote inorganiques (bicarbonate d'ammonium et nitrate de potassium et). Ceci dans le but d'évaluer l'activité métabolique de la flore ruminale pour savoir quelle source d'azote stimule le mieux les groupes bactériens du rumen.

Les groupes bactériens du rumen qui dégradent rapidement les polymères végétaux tels que la pectine, l'amidon et l'hémicellulose, se procurent rapidement de l'énergie qui leur permet d'utiliser les différentes sources d'azote alors que les groupes bactériens qui dégradent la cellulose et la caséine, obtiennent plus lentement de l'énergie à cause des difficultés de la dégradation de la cellulose et de la caséine et présentent plus de difficulté à utiliser les différentes sources d'azote.

Les sources d'azote organiques stimulent plus l'activité métabolique des microorganismes du rumen que les sources inorganiques. L'extrait de levure stimule plus que le glutamate de sodium et le bicarbonate d'ammonium plus que le nitrate de potassium qui présente même une inhibition de l'activité métabolique en particulier chez le groupe cellulolytiques et protéolytiques.

Mots clés : rumen, azote organique, azote inorganique, source d'énergie, flore ruminale, bovin.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et des Activités Microbiennes.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Khelifi Douadi* (Professeur - UFM Constantine),
Encadreur : *Haddi Mohamed-Laid* (Professeur - UFM Constantine),
Examineur : *Kadem Dhaou el Djabine* (Professeur - UFM Constantine),
Examinatrice : *Benchiheub Meriem* (Maitre-Assistante A - UFM Constantine).

Date de soutenance : 30/06/2016