



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE  
ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث 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 الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie.

قسم : الميكروبيولوجيا

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 l'activité métabolique  
des principaux groupes bactériens du rumen de bovin :  
cas du glutamate de sodium et de l'extrait de levure**

---

Présenté par : LASSAKEUR Souheila    Le 30 juin 2016  
MEZIANI Assia

Devant le Jury d'évaluation :

**Président du jury :** *M. KHELIFI Douadi* (Professeur- UFM Constantine).

**Encadreur :** *M. HADDI Mohamed-Laid* (Professeur- UFM Constantine).

**Co-encadreur:** *Mme. BENCHIHEUB Meriem* (M.A.A. - UFM Constantine).

**Examineur :** *M. KADEM Dhaou El Djabine* (Professeur- UFM Constantine).

*Année universitaire 2015 - 2016*

# *Remerciement*

Au terme de ce travail, nous tiens particulièrement à exprimer nos profonde gratitude à Mon encadreur, Monsieur HADDI Mohamed-Laid, pour nous avoir donné l'occasion d'intégrer l'équipe du Laboratoire de Mycologie et Biotechnologie et de l'activité microbienne de Biotechnologie; Université des frères Mentouri Constantine 1, en nous proposant ce thème et en assurant son encadrement.

J'exprime également nos remerciements à Madame BENCHIHEUB Meriem pour son co-encadrement, pour son aide, ses conseils, son encouragement et sa disponibilité lors de la réalisation de ce travail.

J'exprime mes respectueux dévouements à Mr. KHELILFI Douadi, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider la commission d'examen de ce travail.

Je voudrais exprimer également nos sincères remerciements à Monsieur Kadem Dhaou-El Djabin Professeur de l'université Constantine 1, qui nous fait l'honneur d'accepter d'examiner notre travail.

Un très grand merci, à l'ensemble du personnel du Laboratoire de Mycologie et Biotechnologie et de l'activité microbienne en particulier Maroua, Radja et Leila.

# *Dédicaces*

*Ce travail est dédiée à :*

*Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde gratitude pour leur amour, leur encourage et leur soutien tout au long de mes études, que DIEU les bénisse.*

*Mes chers grands parents*

*Mon frère : Hadj Abdallah*

*Mes sœurs : Sara et Salsabil*

*Toutes mes amies : Assia, Mounia, Souheila, Faiza, Hasiba, Hadjer*

*Egalement à tout le groupe de Master 2 de microbiologie générale*

*A tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom*

*Souheila*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde pour moi:*

*Mes très chers parents qui m'ont toujours soutenu et qui ont sacrifié leur vie  
afin de faire de moi ce que je suis. J'espère pouvoir les satisfaire.*

*Que Dieu les garde Pour moi.*

*Mes frères et mes sœurs.*

*A mes chères et inoubliables amies de la promotion en particulier :*

*Ahlem, Madjda, Sara, Lamis, Souheila, Faiza, Hasiba, Hadjer.*

*Egalement à tout le groupe de Master 2 de microbiologie générale*

*A tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.*

**Assia**

## TABLE DES MATIERES

Introduction .....	1
--------------------	---

### Chapitre 1 : Revue bibliographique

<b>1 .Le milieu ruminal</b> .....	2
Paramètres physico-chimiques.....	2
<b>2. La flore ruminale</b> .....	4
2.1. Les bactéries.....	4
2.2. Les champignons.....	7
2.3. Les protozoaires.....	8
2.4. Facteurs de variation du microbiote ruminal.....	8
2.4.1. Variation spatiale.....	8
2.4.2. Variation liée à l'alimentation.....	8
<b>3. Le métabolisme ruminal</b> .....	9
3.1. Le métabolisme énergétique.....	9
3.1.1. Le métabolisme des polysides pariétaux.....	9
-La cellulose.....	10
-L' hémicellulose.....	11
-La pectine.....	14
3.1.2. Le métabolisme des constituants pariétaux non polysaccharidique.....	15
-Les protéines de structure.....	15
-Les composés phénoliques.....	15
3.1.3. Le métabolisme des constituants cytoplasmiques.....	16
-Les glucides.....	16
3.2. Le métabolisme azoté.....	20
3.2.1. Les constituants azotés protéiques.....	20
3.2.2. Les constituants azotés non protéiques.....	21
<b>4. Les sources azotées alternatives</b> .....	24
4.1. Le bicarbonate d'ammonium.....	24
4.2. Le Glutamate de sodium.....	24
4.3. Le nitrate de potassium.....	25
4.4. L'extrait de levure.....	27
<b>5. Méthodes d'étude de l'activité métabolique des microorganismes du rumen</b> .....	28

### Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Introduction.....	29
2. Epuisement de l'azote et de l'énergie résiduels.....	29
3. Les sources d'azote sont-elles utilisées comme source d'énergie.....	29
4. Effet de la source d'azote sur les principaux groupes bactériens dans le rumen.....	29
5. Inoculum et animal donneur.....	30
6. Analyses des caractéristiques de l'inoculum.....	30
6.1. Les caractéristiques physicochimiques.....	30
-Le pH.....	30
-Le potentiel d'oxydoréduction.....	30
-La température.....	30
-Détermination de la matière sèche.....	30
-Détermination de la matière organique et de la matière minérale.....	31
6.2. Les caractéristiques microbiologiques.....	31

- Coloration de Gram.....	32
7. Les sources d'azote alternatives.....	33
8. Les sources d'énergie.....	33
9. Composition des milieux de fermentation.....	33
10. Préparation des milieux.....	35
a. Préparation du milieu d'épuisement.....	35
b. Préparation du milieu de fermentation.....	36
11. Incubation des milieux.....	36
11.1. Milieu d'épuisement.....	36
11.2. Milieu de fermentation.....	37
12. Mesure de l'activité métabolique de la flore ruminale.....	37
13. Expression et élaboration des données.....	38

### **Chapitre 3: Résultats et discussion**

1. Analyse des caractéristiques de l'inoculum.....	39
1.1. Analyse des caractéristiques générales.....	39
1.2. Analyse des caractéristiques physico-chimiques.....	39
2. Analyse des caractéristiques microbiologiques de l'inoculum.....	41
3. L'épuisement de la source d'azote et de l'énergie résiduels.....	44
4. La source d'azote comme source d'énergie.....	45
5. Effet des sources d'azote inorganique sur les principaux groupes bactériens du rumen.....	47
5.1. Effet du bicarbonate d'ammonium.....	47
5.2. Effet du glutamate de sodium.....	50
6. Effet des sources d'azote organique sur les principaux groupes bactériens du rumen.....	52
6.1. Effet du nitrate de potassium.....	52
6.2. Effet de l'extrait levure.....	55
7. Effet des sources d'azote sur la dégradation de la cellulose.....	57
Conclusion .....	63
Références bibliographiques.....	67

## LISTE DES ABREVIATIONS

### **A P**

ABC :ATP-binding cassettepH : Potentiel hydrogène

AGV :Acides gras volatils PRP : Protéines riches en proline

AGCC : Acides gras à courtes chaines ppm : Parties par million

ANP: Azote non protéique

AOAC: Association of Official Analytical Chemists

ATP: Adénosine triphosphate

### **C**

C<sub>2</sub>: Acide acétique

C<sub>3</sub> : Acide propionique

C<sub>4</sub> : Acide butyrique

C<sub>5</sub>: Acide valérique

C<sub>6</sub> : Acide caproïque

CH<sub>4</sub> : Le méthane

CuO : Oxyde de cuivre

### **G**

GRH :Protéines riches en hydroxy proline

### **M**

MAT : Matières azotés totales

mV: milliVolts

### **N**

NH<sub>3</sub>: Ammoniac

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: Ion d'ammonium

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> :Ion de Nitrite

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : Ion de Nitrate

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Quelques caractéristiques des bactéries rencontrées dans le rumen.....	7
<b>Tableau 2:</b> Principales équations steochiométriques simplifiées des fermentations dans le rumen.....	20
<b>Tableau 3:</b> Niveau du nitrate de fourrage (base de matière sèche) et l'effet potentiel sur les animaux.....	26
<b>Tableau 4 :</b> Comparaison entre le milieu ruminal <i>in vivo</i> et le milieu de fermentation <i>in vitro</i> .....	28
<b>Tableau 5:</b> Procédure de la coloration de Gram selon Kopeloff.....	32
<b>Tableau 6:</b> Composition de milieu d'épuisement.....	33
<b>Tableau 7:</b> Composition du milieu de fermentation des différentes sources d'azote.....	34
<b>Tableau 8:</b> Composition de milieu de fermentation des différentes sources d'énergie avec les différentes sources d'azote.....	34
<b>Tableau 9:</b> Composition du milieu de fermentation de la cellulose avec des différentes sources d'azote.....	35
<b>Tableau 10:</b> Caractéristiques générales du contenu du rumen.....	39
<b>Tableau 11:</b> Caractéristiques physico-chimiques de l'inoculum.....	40
<b>Tableau 12:</b> Tableau récapitulatif des durées d'épuisement et des productions minimales et maximales de gaz des différents essais.....	45
<b>Tableau 13:</b> Caractéristiques cinétique de l'utilisation des sources d'azote comme sources d'énergie.....	46
<b>Tableau 14:</b> pH initial et final du contenu fermenté de différentes sources d'azote.....	46
<b>Tableau 15:</b> Caractéristiques cinétique de la fermentation des sources d'énergie en présence de $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .....	48
<b>Tableau 16:</b> Valeurs du pH initial et final du contenu fermenté des sources d'énergie en présence de $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .....	49
<b>Tableau 17:</b> Caractéristiques cinétique de la fermentation des sources d'énergie en présence de $\text{KON}_3$ .....	50
<b>Tableau 18:</b> Valeurs du pH initial et final de contenu fermenté des différentes sources d'énergie en présence de $\text{KNO}_3$ .....	51
<b>Tableau 19:</b> Caractéristique cinétique de la fermentation des sources d'énergie en présence de Na-Glutamate.....	53



<b>Tableau 20:</b> Valeurs du pH initial et final de contenu fermenté de différentes sources d'énergie en présence de Na-Glutamate.....	54
<b>Tableau 21:</b> Caractéristiques cinétique de la fermentation des différentes sources d'énergie en présence de l'extrait levure.....	55
<b>Tableau 22:</b> Valeurs du pH initial et final du contenu fermenté des différentes sources d'énergie en présence de l'extrait levure.....	56
<b>Tableau 23:</b> Caractéristiques cinétique de la dégradation de cellulose en présence des différentes sources d'azote.....	58
<b>Tableau 24:</b> Valeurs du pH initial et final du contenu fermenté de cellulose en présences des différentes sources d'azote.....	58
<b>Tableau 25:</b> Tableau récapitulatif des volumes maximum en présences des sources d'énergie et des sources d'azote.....	59
<b>Tableau 26:</b> Tableau récapitulatif des temps de latence mis par les différents groupes bactériens du rumen pour fermenter les différentes sources d'énergie en présence des différentes sources d'azote.....	60
<b>Tableau 27:</b> Tableau récapitulatif de la pente de production de gaz en présences des sources d'énergie et des sources d'azote.....	61
<b>Tableau 28:</b> Tableau récapitulatif du pH final en présences des sources d'énergie et des sources d'azote.....	62

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Arrangement cristallin des chaînes d'une microfibrille de cellulose.....	10
<b>Figure 2:</b> La liaison $\beta$ (1-4) glucosidique .....	11
<b>Figure 3 :</b> Caractères distinctifs des cellules végétales.....	11
<b>Figure 4</b> Structure de l'hémicellulose .....	12
<b>Figure 5:</b> Mécanisme de dégradation de cellulose par <i>F. succinogenes</i> .....	13
<b>Figure 6:</b> Structure chimique de la pectine.....	14
<b>Figure 7:</b> Structure de la pectine.....	15
<b>Figure 8:</b> Structure de l'amidon.....	17
<b>Figure 9:</b> Mécanisme de dégradation de l'amidon.....	18
<b>Figure 10:</b> Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidique.....	19
<b>Figure 11:</b> Mécanisme de dégradation des protéines et des acides aminés.....	21
<b>Figure 12:</b> Structure tertiaire de protéine.....	22
<b>Figure 13 :</b> Digestion et absorption des protéines.....	23
<b>Figure 14:</b> Structure de l'acide glutamique.....	24
<b>Figure 15:</b> Processus d'amination et la synthèse des acides aminés.....	25
<b>Figure 16:</b> Métabolisme du nitrite et du nitrate.....	26
<b>Figure 17 :</b> Virage de couleur du milieu d'épuisement.....	35
<b>Figure 18:</b> Appareil de mesure du gaz produit par la fermentation.....	38
<b>Figure 19:</b> Résultats de la coloration de Gram.....	43
<b>Figure 20:</b> Courbes d'épuisement des différents essais.....	44
<b>Figure 21:</b> Courbes d'utilisation des sources d'azote comme source d'énergie.....	45
<b>Figure 22:</b> Effet du $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.....	48
<b>Figure 23:</b> Effet du $\text{KNO}_3$ comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.....	50

<b>Figure 24:</b> Effet du Na-Glutamate comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.....	52
<b>Figure 25:</b> Effet du l'extrait levure comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.....	55
<b>Figure 26:</b> Dégradation de la cellulose en présence des différentes sources d'azote.....	57

# *INTRODUCTION*

Les ruminants occupent une place importante dans la chaîne alimentaire avec une production mondiale de viande de 76 millions de tonnes (82% bovins, 11% ovins, 7% caprins), soit un quart de la production mondiale de viande et une production laitière de 626 millions de tonnes (95,7% vaches, 1,6% brebis et 2,7% chèvres) en 2010 (FAO, 2012).

Cette production est liée à l'alimentation des animaux et de sa qualité. En effet, avec un faible potentiel fourrager, l'animal éprouve de grandes difficultés à produire suffisamment de protéines animales de haute qualité pour la population humaine, ceci entraîne un recours massif aux importations de produits animaux à l'instar des produits laitiers et carnés.

En Algérie, l'alimentation des ruminants est sujette à de nombreuses questions de la part des consommateurs. Les ruminants se nourrissent de 80% de fourrage, de 18% d'aliments concentrés et de 2% de minéraux et de vitamines. En effet, cette alimentation se caractérise par une offre insuffisante en ressources fourragères, ce qui se traduit par un déficit fourrager estimé à 34% (la-Viande.fr, 2007).

Cette insuffisance est due au climat caractérisé par une grande irrégularité spatio-temporelle (faible pluviométrie, amplitudes thermiques, sécheresses persistantes), c'est pourquoi, la priorité des chercheurs est de trouver des sources d'énergie et d'azote qui puissent remplir trois conditions essentielles : abondance, prix bas, haute valeur nutritive.

Cette alimentation est influencée par la microflore ruminale constituée de différents types de microorganismes entre autre des bactéries cellulolytiques, hémicellulolytiques, amylolytiques, pectinolytiques et protéolytiques qui peuvent dégrader les différents substrats glucidiques et azotés.

Les microorganismes du rumen ont une particularité de pouvoir d'utilisées différentes sources d'azote pour synthétiser les acides aminés et les peptides, et n'ont donc pas besoin d'avoir directement des acides aminés pour synthétiser leurs protéines.

Dans ce travail nous avons étudié l'effet de différentes sources d'azote organique (glutamate de sodium, extrait levure), et inorganique (nitrate de potassium, bicarbonate d'ammonium), sur l'activité métabolique de principaux groupes bactériens fonctionnel de bovin. En effet la source d'azote est un élément plus couteux dans la nutrition des ruminants, et le but de travail est de savoir si des sources d'azote alternatives peu couteuses peuvent stimuler l'activité métabolique des microorganismes du rumen.

# Chapitre 1

## REVUE

## BIBLIOGRAPHIQUE

## **1. Le milieu ruminal**

L'estomac des ruminants occupe les 4/5 du tractus digestif soit environ 70 % du volume total du tube digestif. Il est constitué de deux parties :

l'estomac antérieur comprend trois compartiments : Le rumen ou panse est le plus volumineux, il est constitué de 70 à 75 % du volume total de l'estomac et occupe 50 à 60% du volume réservoirs pré-gastriques. Il est divisé en sac dorsal et en sac ventral. Le réseau (le réticulum) représente 5% du volume total, il a un rôle dans le déplacement des particules alimentaires, le feuillet (omasum) qui représente 10% du volume total. Ce dernier est constitué d'une muqueuse formée d'une centaine de replis lamellaires recouverte d'un épithélium kératinisé (Clos, 2011).

l'estomac postérieur appelé aussi caillette est le véritable estomac et le réservoir sécrétoire des ruminants. Sa cavité est tapissée par une surface glandulaire analogue à celle des monogastriques (Thivend *et al.*, 1985).

### **Les paramètres physico-chimiques**

Il s'agit des conditions physico-chimiques du rumen qui règnent dans le rumen et influencent la faune et la flore microbienne hébergées par l'hôte.

- **L'anaérobiose**

Le milieu ruminal est généralement anaérobie. Les apports d'oxygène sont faibles la plupart du temps et les souches bactériennes sont strictement anaérobies (Belbis, 2007).

- **La température**

La température ruminale elle est de 39 à 40 °C au dessus de la température corporelle (Belbis, 2007).

- **Le pH**

Il est généralement compris entre 6 et 7 et il est tamponné par une grande quantité de bicarbonate et de phosphate contenus dans la salive (Thivend *et al.*, 1985).il joue un role important dans la sélection des microorganismes du remen (Belbis.,2007).

- **La pression osmotique**

Elle est de l'ordre de celle du sang, elle varie dans un grand intervalle de -200 à 400 mosm/l (Belbis, 2007).

- **Potentiel d'oxydo-réduction**

Le rumen est un écosystème fortement anaérobie, son potentiel d'oxydoréduction moyen est de -200 à-350 millivolts (mV). La zone proche de l'épithélium est très vascularisée. Il s'y fixe une population microbienne facultativement aérobie qui contribue à l'élimination des traces d'oxygène ce qui permet de maintenir l'écosystème en anaérobiose (Fonty *et al.*1994).

- **L'humidité**

L'humidité du milieu ruminal est de l'ordre de 85%. Ces apports hydriques sont assurés à partir de nutriments et d'eau fournis à la fois par l'ingestion des aliments et par la salive au cours de la rumination (Brugere, 1983).

- **La production du gaz**

Une relative constance de l'atmosphère gazeuse est située au niveau du sac dorsal. Cette atmosphère gazeuse est constituée de CO<sub>2</sub> (60-70 %) et CH<sub>4</sub> (30-40 %).

Le rumen est un milieu favorable au développement et au maintien des populations microbiennes anaérobies, dont les principaux constituants sont les bactéries et les protozoaires (Thivend *et al.*, 1985).



## **2. La flore microbienne**

Le rumen est un écosystème microbien complexe composé de plusieurs catégories de population microbienne (les bactéries, les archaea, les protozoaires, les virus, les champignons etc) Mais les plus dominants sont les bactéries, les protozoaires et les champignons (Thivend *et al.*, 1985).

### **2.1. Les bactéries**

Le nombre d'espèces bactériennes colonisant le rumen est important, et présente des activités enzymatiques variées. Leur concentration peut atteindre  $10^{10}$  à  $10^{11}$  cellules bactériennes par millilitre (Patterson, 1992). Les bactéries anaérobies strictes non sporulées représentent environ 50% de la biomasse microbienne (Belbis, 2007).

Les bactéries du rumen ont été classées selon certains tests de coloration de leur paroi en espèces de type Gram-négatif et Gram-positif et aussi selon leur localisation dans le biotope ruminal en quatre groupes (Molettea, 2008).

- **Bactéries libres dans le liquide ruminal**

Ce sont des espèces bactériennes fermentaires entourées par une structure très complexe fibreuse polyholosidique (glycocalyx) et qui consomment des substrats solubles, et de nombreux protozoaires qui ingèrent des particules alimentaires (Fonty et Forano, 1999).

- **Bactéries attachées aux particules alimentaires**

Elles représentent jusqu'à 75% de la population microbienne (Koike *et al.*, 2003). C'est généralement le groupe le plus important dans la dégradation des amidons et des fibres qui se fixent et adhèrent aux particules végétales (Thivend *et al.*, 1985, Belbis, 2007).

- **Bactéries adhérentes à la paroi du rumen**

Ce sont majoritairement des bactéries Gram<sup>+</sup> anaérobies facultatives. Elles se fixent sur l'épithélium squameux stratifié par l'intermédiaire d'un glycocalyx polyholosidique. Les principales fonctions de ces bactéries sont l'hydrolyse de l'urée qui diffuse à travers la paroi du rumen et la dégradation des cellules épithéliales fortement kératinisées provenant de la

desquamation de la muqueuse du rumen mais aussi l'élimination d'oxygène qui diffuse à travers la paroi du rumen depuis la voie sanguine (Thivend *et al.*, 1985).

- **Bactéries adhérentes aux protozoaires**

Ces bactéries représentent environ 1 à 10% de la flore totale du rumen. Elles sont attachées à la surface des protozoaires. Selon la taille des flagelles et des ciliées, les espèces identifiées sont *Streptococcus bovis*, *Ruminococcus albus* et des bactéries méthanogènes (Allison *et al.*, 2007).

Les bactéries ont été aussi classées selon leur aptitude à dégrader et à fermenter les différents substrats en :

- **Bactéries fibrolytiques**

Parmi les bactéries qui dégradent les différents substrats fibreux :

- **Bactéries cellulolytiques**

Les bactéries cellulolytiques apparaissent dans le rumen trois à quatre jours après la naissance de l'animal et leur nombre varie de  $10^2$  à  $10^7$  bactéries/ml. Le rôle essentiel de ces dernières est la dégradation de la cellulose et ces produits d'hydrolyse (Fonty *et al.*, 1988). Il existe deux types de bactéries cellulolytiques : des bacilles qui sont majoritairement : *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrosolvans* et des coques : *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* (Belbis, 2007 ; Graham et Malcolm, 1979).

- **Bactéries hémicellulolytiques**

Les principales bactéries hémicellulolytiques sont *Butyrivibrio fibrisolvans*, *Prevotella ruminicola*, ainsi que les Ruminococci qui dégradent l'hémicellulose, la structure la plus complexe dans la paroi de la plante, elle représente environ 37- 48 % avec le xylane, présent comme l'un des principaux polymères.

Les xylanases présentent une répartition plus large que les cellulases parmi les bactéries ruminales. Les microorganismes qui produisent généralement la xylanase sont: *R.albus*, *R.favefaciens*, *B.fibrisolvans* et *P.ruminicola* (Belbis, 2007).

- **Bactéries pectinolytiques**

Un certain nombre de bactéries assure la digestion de la pectine. Parmi lesquelles *Lachnospira multiparus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Succinivibrio dextrinosolvans* et *Streptococcus bovis* (Tiret, 2001).

- **Bactéries dégradant les glucides cytoplasmiques**

Un certain nombre de bactéries cellulolytiques ruminales sont également amylolytiques comme *F. succinogenes*, et la plupart des souches de *B. fibrisolvens*. D'autres espèces spécialisées: *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium*, elles produisent des quantités de succinate, l'acétate et le formiate plus élevées et prolifèrent à des pH inférieurs à 6 (Hungate, 1966).

- **Bactéries protéolytiques**

Ce sont majoritairement des bactéries amylolytiques (plus de 40 % de la flore ruminale) et certaines bactéries fibrolytiques parmi lesquelles, *R. amylophilus*, *P. ruminicola*, *B. fibrisolvens*, *S. ruminantium* qui exercent cette fonction (Jarrige *et al.*, 1995). Cette activité concerne la majeure partie des protéines solubles ainsi que des protéines insolubles (Wallace, 1991).

- **Les bactéries dégradant les acides organiques**

Au sein des bactéries ruminales utilisatrices d'acides organiques, un certain nombre d'entre elles est capable d'utiliser le lactate. Le pH optimum de fermentation du lactate pour la plupart des bactéries lacticoxytiques est compris entre 6 et 6,5. Et l'acétate est probablement le produit majeur (Belbis, 2007).

- **Bactéries lipolytiques**

Un certain nombre de bactéries ruminales sont impliquées dans l'utilisation des lipides présents dans le rumen. *Anaerovibrio lipolytica* possède une lipase capable d'hydrolyser les triglycérides en acides gras libres et en glycérol (Bruger, 1983). Les galactolipides et les phospholipides peuvent être hydrolysés par l'estérase synthétisée par certaines bactéries du genre *Butyrivibrio* entre autre *B. fibrisolvens*, *B. hungatei* et *B. proteoclasticus* (Chen et Wolin, 1979).

- **Bactéries uréolytiques**

Ces bactéries sont attachées à la paroi du rumen et contrôlent la régulation du débit d'urée qui traverse la paroi ruminale et transforment l'urée en ammoniac (la plus importante source d'azote). Parmi ces bactéries : *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Selenomonas sp*, *P. ruminicola*, *Ruminococcus bromii*, *Butyrivibrio sp* et *Treponema sp* (Tiret, 2001).

**Tableau 1** : Quelques caractéristiques des bactéries rencontrées dans le rumen (Amokrane, 2010 (1) ; (Dakhmouche, 2011(2)).

Espèce bactérienne	Gram	Diamètre µm	forme	Les substrats dégradés				
				Cellulose	hémicellulose	Amidon	Pectine	caséine
<i>Fibrobacter succinogenes</i> (1)	-	0.8-1.6	Bacille	+	+	-	+	-
<i>Ruminococcus albus</i> (1)(2)	+	0.8-0.9	Cocci	+	+	-	+	-
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> (1)	+	0.8-1.5	Cocci	+	+	-	+	-
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> (2)	-	0.3-0.8	Bacille isolé	-	+	+	+	+
<i>Prevotella ruminicola</i> (1)	-	0.8-1.0	Bacille en chinette	-	+	+	+	+
<i>Selenomonas ruminantium</i> (1)	-	0.9-1.1	vibrion	-	-	+	-	+
<i>Streptococcus bovis</i> (2)	+	0.9-1.0	Cocci	-	-	+	+	+
<i>Ruminobacter amylophilus</i> (2)	-	1.0-1.5	Bacille isolé	-	-	+	-	+
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> (1)	-	0.3-0.8	Bacille incurvé	-	-	-	+	+
<i>Anaéorovibrio lipolytica</i> (1)	-	0.3-0.5	Bacille isolé	-	-	-	-	+
<i>Lachnospira multiparus</i> (2)	+	0.4-0.6	Bacille incurvé	-	-	-	+	-

**2.2. Les champignons**

Les champignons correspondent à environ 8% de la biomasse microbienne. Trois genres ont été identifiés : mono flagellés comme *Neocallimastix*, *Piromyces* et pluri flagellés comme *Caecomyces*. Ils apparaissent dans le rumen des ruminants quelques jours seulement après la naissance (Dusart, 2014).

Les champignons secrète plusieurs enzyme pour la dégradation de nombreux polymères structuraux (cellulose, hémicelluloses, pectine) (Amokrane, 2010).

### **2.3. Les protozoaires**

Les protozoaires sont des organismes unicellulaires de taille très variable. Dans le rumen, on distingue deux types, les flagellés et les ciliés ; tous les deux de la sous-classe des Trichostomatia. Les protozoaires jouent un rôle important dans l'hydrolyse de l'amidon qu'ils stockent sous forme de réserves (Bestle et Jouany, 1990).

Le nombre de protozoaires varie fortement avec l'alimentation. Si cette dernière est riche en glucides, les protozoaires croissent rapidement (Belbis, 2007).

### **2.4. Les facteurs de variation du microbiote ruminal**

#### **2.4.1. Variabilité spatiale**

Les microorganismes de la flore ruminale ne sont pas distribués de façon homogène et uniforme. La répartition spatiale des communautés microbiennes entre la phase solide et la phase liquide du rumen est différente.

Des études réalisées sur la vache et le mouton montrent que quel que soit le régime alimentaire, les communautés bactériennes de la phase solide contiennent plus de Firmicutes et de *Proteobacteria*. Une différence a été également notée entre les communautés microbiennes de la lumière du rumen (phase solide et liquide) et celles de la paroi ruminale, composée de 6 à 12 fois plus de Firmicutes et de 0,3 à 8 fois moins de Bacteroidetes que les communautés bactériennes ruminales (Zened, 2011).

#### **2.4.2. Variabilité liée à l'alimentation**

Le principal facteur qui influence l'équilibre des populations microbiennes du tube digestif est l'aliment. Il conditionne la fourniture de nutriments et d'énergie pour la micropopulation, et au cours de sa biodégradation, il agit sur les paramètres physicochimiques du milieu (pH, potentiel redox, concentration des métabolites...) qui conditionnent l'équilibre des communautés microbiennes.

Les régimes riches en amidon et/ou glucides rapidement fermentescibles ont un effet marqué sur le microbiote ruminal où on note une augmentation des populations amylolytiques (*Steprococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*,...), saccharolytiques (les lactobacilles) (Zened, 2011).

### **3. Le métabolisme ruminal**

#### **3.1. Le métabolisme énergétique**

Les sucres libérés par hydrolyse sont absorbés, puis fermentés en pyruvate par les voies d'Emden-Meyerhof et des pentoses phosphates. A partir de l'acide pyruvique, plusieurs voies métaboliques sont alors possibles, aboutissant à la formation des AGV, principalement les acides : acétique (C<sub>2</sub>), propionique (C<sub>3</sub>), butyrique (C<sub>4</sub>), valérique (C<sub>5</sub>), caproïque (C<sub>6</sub>) et leurs isomères, avec dans certains cas de l'acide lactique et de gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> et CH<sub>4</sub>). L'énergie libérée sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), permet l'entretien et la croissance microbienne. (RF ??)

##### **3.1.1. Le métabolisme des polysides pariétaux**

Les polysides structuraux constituent la forme essentielle de stockage de l'énergie des végétaux. Ils sont composés des polymères souvent complexes responsables de la rigidité des végétaux. Ils représentent 40-60% de la matière sèche des fourrages et constituent 50-70% de la matière sèche des parois (Fonty et Forano, 1999). Leurs teneurs respectives varient fortement selon l'espèce botanique, l'âge de la plante, les organes et les tissus (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007). Ces polysides ne sont pas hydrolysables par les enzymes digestives des êtres vivants supérieurs, mais sont dégradés par les microorganismes fibrolytiques (Nocek et Tamminga, 1991).

La population microbienne du rumen tire, de la fermentation des oses provenant de l'hydrolyse des glucides pariétaux, l'énergie (ATP) et le carbone qui lui sont nécessaires pour son entretien, sa croissance et sa prolifération. Les produits métaboliques de cette fermentation sont un mélange d'acides organiques à courte chaîne, dits acides gras volatils, essentiellement acétique, propionique et butyrique, et des gaz (gaz carbonique et méthane). Les produits intermédiaires (acides succinique, lactique...) sont généralement utilisés par les microbes au fur et à mesure de leur formation (Thivend *et al.*, 1985).

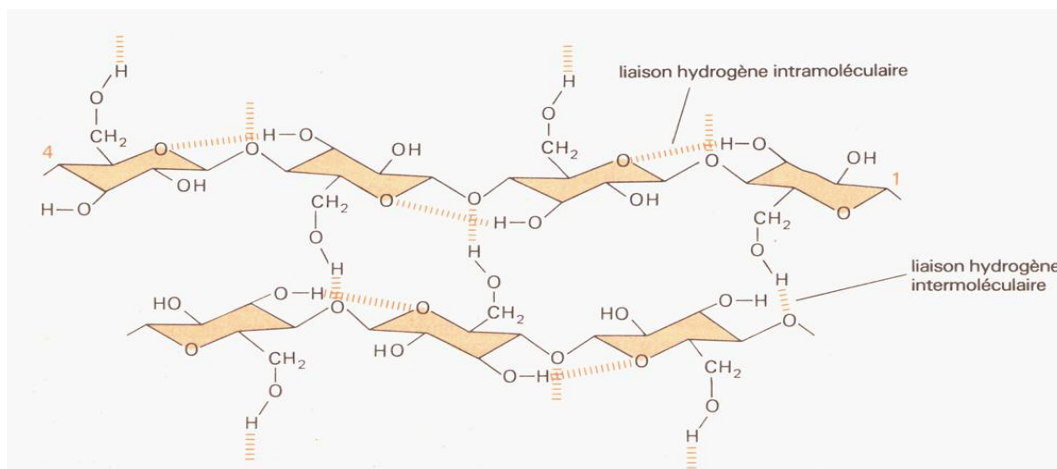
Les polysides pariétaux appartiennent à trois groupes de glucides :

- **La cellulose**

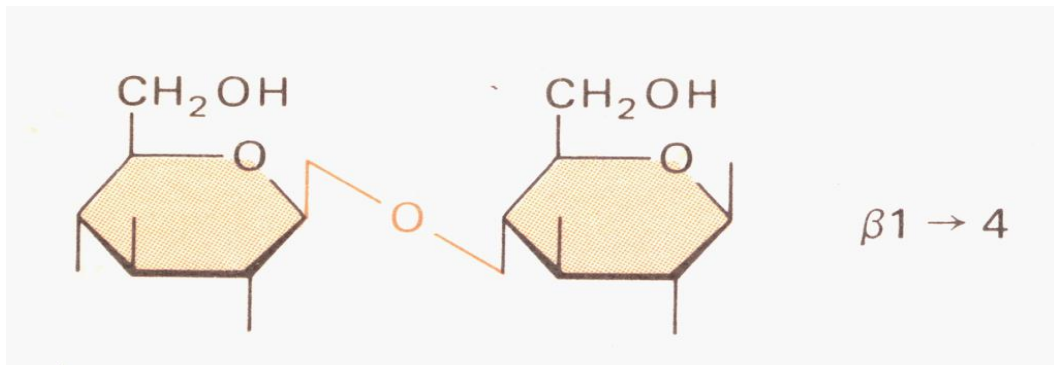
La cellulose est le polysaccharide le plus abondante sur terre. Elle représente plus de la moitié de la biomasse terrestre et constitue un réservoir de carbone sous forme organique à l'échelle de la plante (Fonty et Chauchyras –Durand, 2007).

Elle joue un rôle de soutien et représente le constituant principal des parois des plantes fourragères.

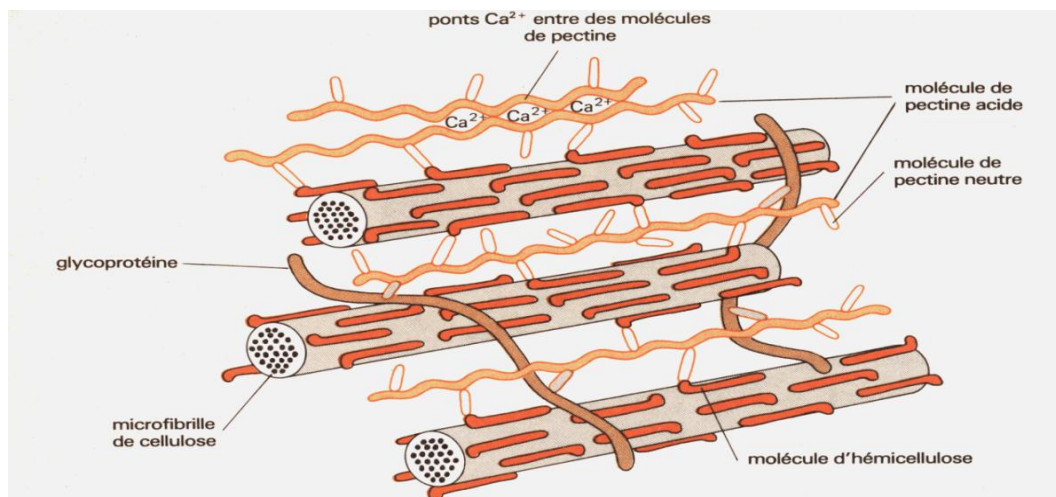
La cellulose est un polymère linéaire constitué d'unités de glucose (figure1) reliées entre elle par des liaisons  $\beta$  (1-4) glycosidiques (figure 2). Ces liaisons osidiques confèrent à la cellulose une structure tridimensionnelle très résistante. La cellulose caractérisée par sa nature, possède une structure partiellement cristalline, rigide peu réactive et de plus insoluble dans de nombreux solvants conventionnels. La cellulose possède aussi des régions cristallines organisées en microfibrilles (figure3) ainsi que des zones dite amorphes, beaucoup plus réactives (Jarrige et *al.*,1995 ; Chambon,2011) .



**Figure 1:** Arrangement cristallin des chaînes d'une microfibrille de cellulose (Alberts *et al.*, 1986).



**Figure 2:** La liaison  $\beta$  (1- 4) glycosidique (Alberts *et al.*, 1986).



**Figure 3 :** Caractères distinctifs des cellules végétales (Alberts *et al.*, 1986).

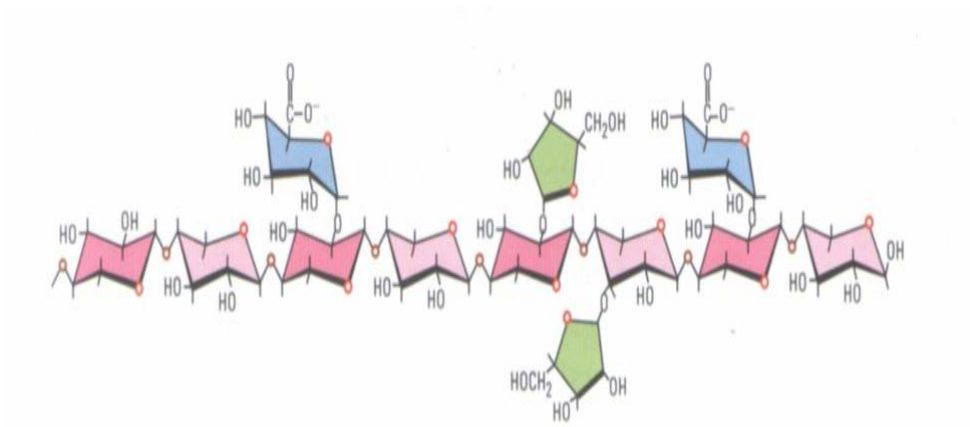
La dégradation de cellulose par *F. succinogenes* se fait par l'attachement de ce dernier à la molécule de cellulose par les protéines fibro-slim et les pilins de type IV (figure 5), puis commence à couper des fibres de cellulose par les enzymes carbohydriques-actives (cellulase, exo-hémicellulase) pour donner les chaînes individuelles de cellulose, puis sont transportés par le système de transport ABC (ATP-binding cassette) vers l'espace périplasmique où se fait la dégradation par les endoglucanases (Ransom-Jones *et al.*, 2012).

*Ruminococcus albus* utilise surtout la cellulose, les hémicelluloses et la pectine. Ces dernières donnent essentiellement du  $C_2$  mais également de manière variable du dihydrogène, de l'éthanol, de l'acide formique, de l'acide lactique et de l'acide succinique (Dusart, 2014).



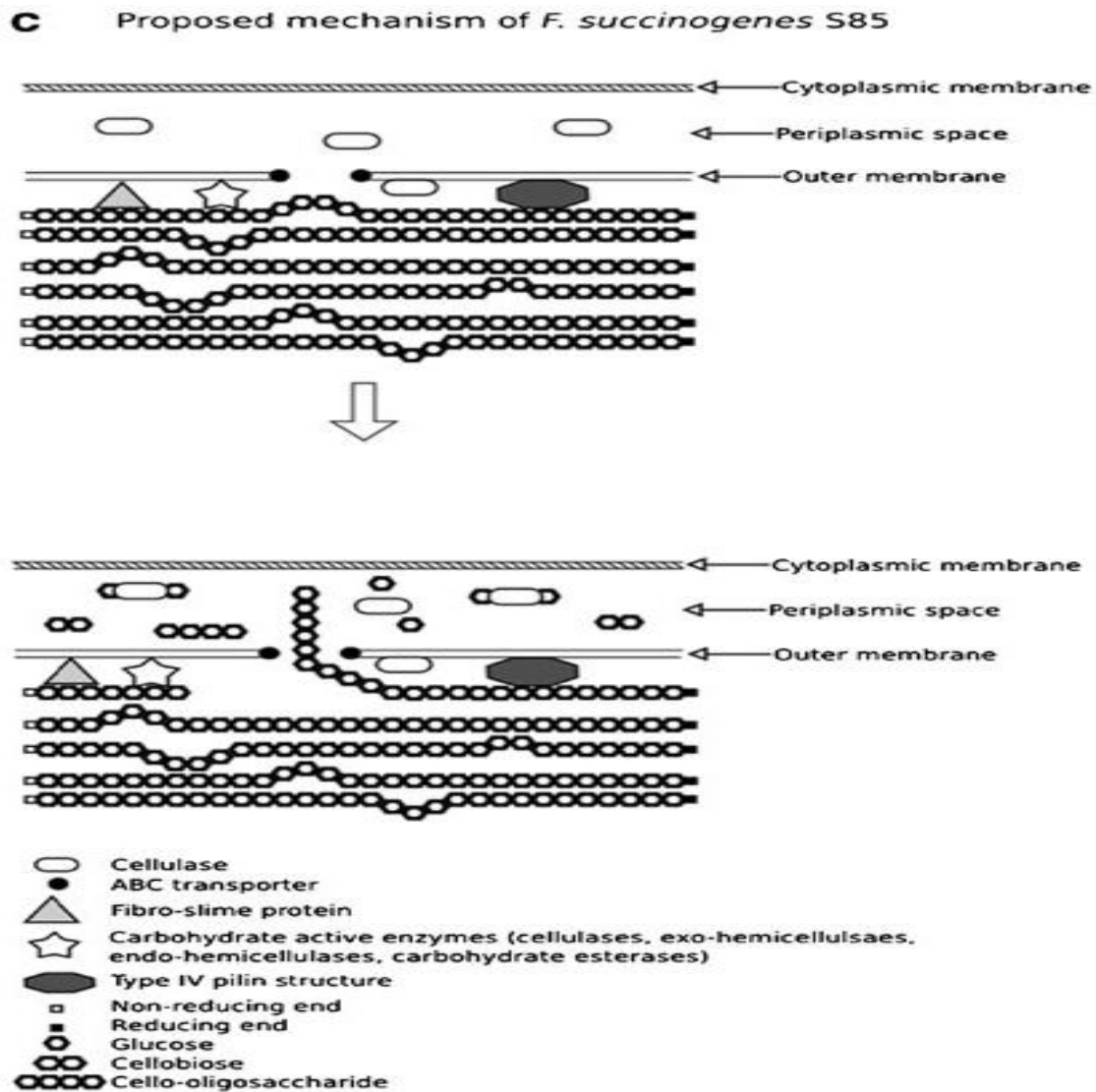
## - Les hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent entre 10 à 25 % de la matière sèche des fourrages (Jarrige *et al.*, 1995). Elles sont systématiquement liées et enchevêtrées à la cellulose pour constituer la base de la paroi végétale (figure 3) et (figure 4). 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 (principalement arabinose et xylose) ou un hexose (glucose, mannose et galactose). Les hémicelluloses se différencient de la cellulose par la présence simultanée des liaisons  $\beta$  (1-4) ;  $\beta$  (1-3) ;  $\alpha$  (1-4) ;  $\alpha$  (1-3). (Jean-Blain, 2002 ; Himmel, 2009).



**Figure 4:** Structure de l'hémicellulose (Res *et al.*, 2006).

Les micro-organismes sécrètent de nombreuses hydrolases dans le milieu ruminal. Trois types de cellulases agissent en synergie : une endo  $\beta$  1-4 glucanase, une cellobiosidase et une  $\beta$ -glucosidase. La première attaque la cellulose au hasard pour former des cello-oligosaccharides. La deuxième enzyme attaque l'extrémité non réductrice de la cellulose pour donner des unités de cellobiose et la troisième hydrolyse la cellobiose et les cello-oligosaccharides de faible degré de polymérisation pour donner du glucose (Dusart, 2014).



**Figure 5:** Mécanisme de dégradation de cellulose par *F. succinogenes* (Ransom-Jones *et al.*, 2012).

La cellulose et l'hémicellulose sont attaquées par des cellulases secrétées par des bactéries cellulolytiques. Elles subissent une hydrolyse lente et partielle aboutissant au stade des oses ou sucres simples (glucose, pentoses). Ces sucres vont donner d'autres produits après leur fermentation en anaérobie, en premier lieu il s'agit d'acide pyruvique et d'adénosine triphosphate (ATP) utilisée par les microbes pour leurs besoins d'entretien et de multiplication. Le pyruvate va suivre différentes voies métaboliques qui aboutissent à la formation d'un mélange d'acides gras à courtes chaînes (AGCC) appelés aussi acides gras volatils (AGV) et selon les rations habituelles les proportions des acides gras volatils seront: acide acétique (en C<sub>2</sub>) 60 à 65% du mélange, acide propionique (en C<sub>3</sub>) 18 à 20% du mélange et 10 à 15% d'acide butyrique (en C<sub>4</sub>). On peut aussi

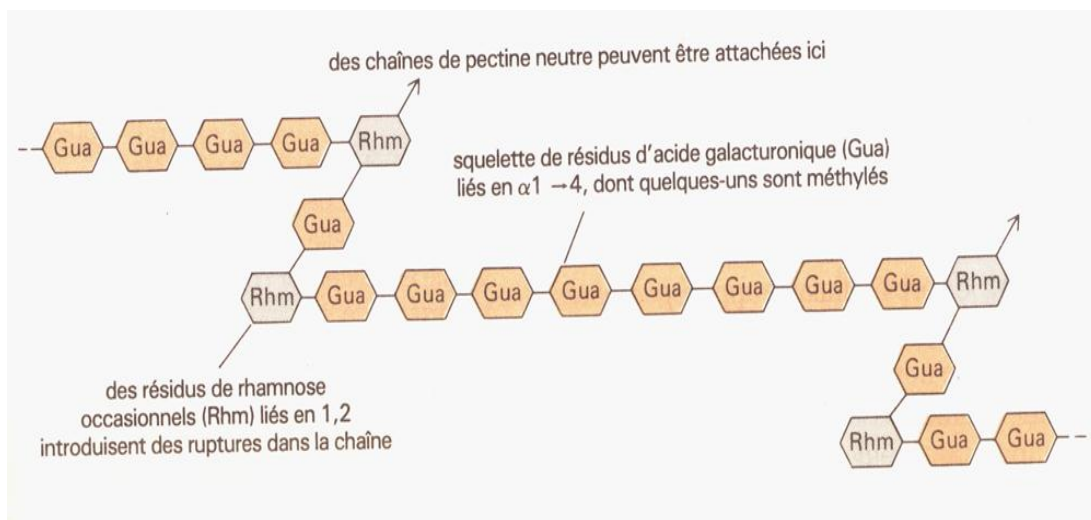
trouver d'autres acides en C<sub>5</sub> (valérique) ou en C<sub>6</sub> (caproïque) mais en quantités beaucoup plus modestes (2 à 5% du mélange) (Yaakoub, 2006).

Ces acides organiques renferment l'énergie utilisable par l'animal, ils sont absorbés surtout à travers la paroi du rumen et constituent la principale source d'énergie pour l'animal hôte puisqu'ils fournissent de 70 à 80% de l'énergie totale absorbée chez les ruminants (Sauvant et Milgen, 1995).

La fermentation produit aussi des gaz, surtout le dioxyde de carbone et le méthane. On trouve une proportion de méthane qui varie entre 25-35 % et une proportion en CO<sub>2</sub> qui varie entre 60-70 %. Le CO<sub>2</sub> est rejeté à la fois par l'éruclation et par la circulation sanguine pulmonaire (Yaakoub, 2006).

### - Les pectines

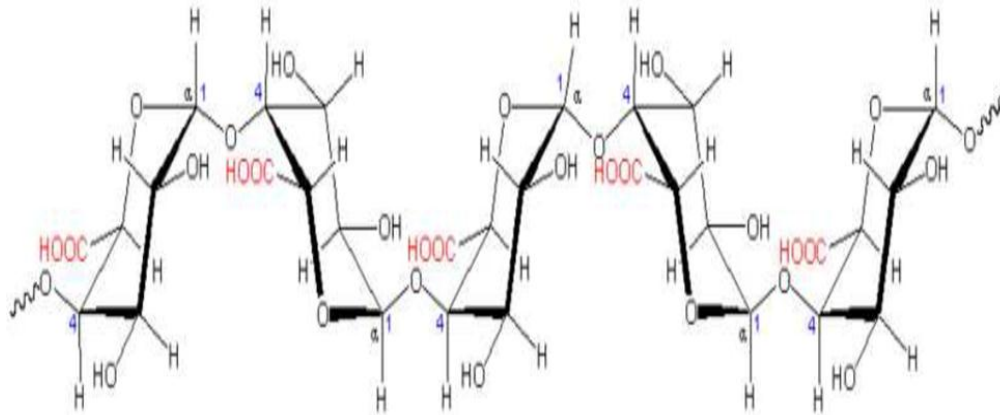
Les pectines forment l'ensemble de fibres dites solubles, se sont des polymères d'acide uronique et d'oses principalement sous formes de polymères d'acide  $\alpha$ -galacturonique et de rhamnose liés par des liaisons  $\alpha$  (1-4) (figure 6). Leur hydrolyse est donc rapide et elles sont facilement dégradables par la microflore ruminale (Grenet et Besle, 1991).



**Figure 6:** Structure chimique de la pectine (Alberts *et al.*, 1986).

Les glucides pariétaux peuvent être dégradés par les enzymes sécrétées par le microbiote ruminal capable de produire des  $\beta$ -glycosidase (Dusart, 2014).

Les enzymes pectinolytiques sont divisés en 2 principaux groupes : les pectines estérases, qui catalysent la dégradation du méthanol, et les enzymes de dépolymérisation, qui sont soit des hydrolases, soit des lyases (Belbis, 2007).



**Figure 7 :** Structure de la pectine (Bestle et Jouany, 1990).

### 3.1.2. Le métabolisme des constituants pariétaux non polysaccharidiques

- **Les protéines de structure**

Les parois primaires contiennent de 5-10 % de glycoprotéines (dénommées extensines) riches en hydroxyproline. Les unités constitutives caractéristiques de l'extensine sont des chaînes polypeptidiques qui, outre l'hydroxyproline, contiennent les acides aminés suivants : sérine, lysine, tyrosine et histidine. La majorité des molécules d'hydroxyproline portent des chaînes latérales formées de trois ou quatre molécules d'arabinose (Amokrane, 2010).

On distingue trois principales classes de protéines pariétales : des protéines riches en glycérine (PRG), des protéines riches en proline (PRP) et des protéines riches en hydroxy proline (GRH) (Amokrane, 2010).

- **Les composés phénoliques**

- **La lignine**

La lignine présente une structure polyphénolique, elle peut incruster l'ensemble cellulose-hémicellulose, par des liaisons non connues avec précision.

L'organisation s'effectue autour des microfibrilles de cellulose, et aboutit à un treillis dense et mécaniquement résistant. La lignine sert donc de ciment entre la cellulose et hémicellulose conférant une plus grande résistance aux parois végétales (Chambon, 2011).

La teneur en lignine est un facteur limitant à la dégradation des parois végétales car elle n'est pas digestible. Les parois lignifiées résistent longtemps à la dégradation microbienne et à la mastication (Jarrige *et al.*, 1995).

- **Les lipides complexes**

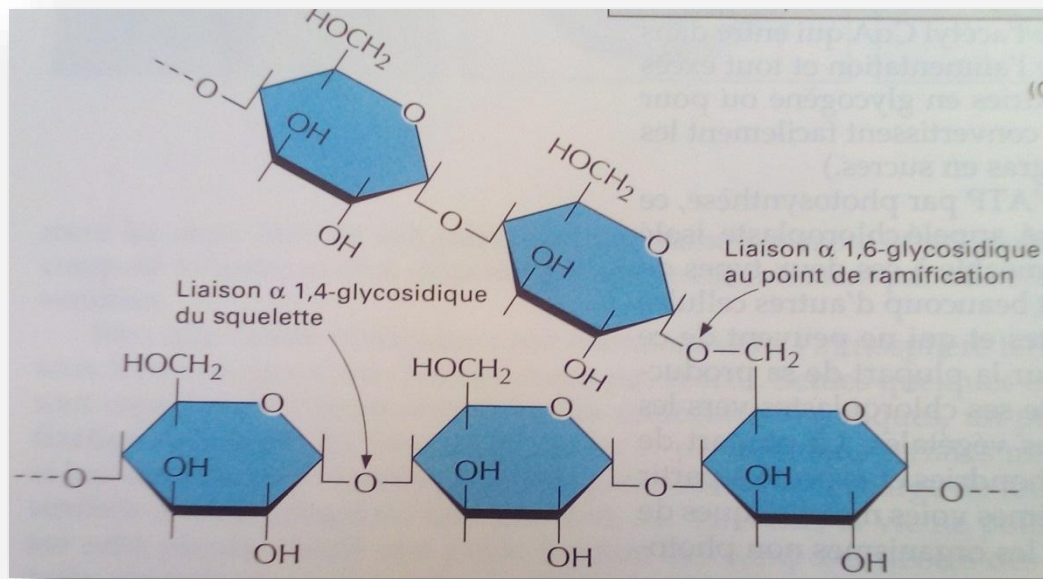
La cutine et la subérine sont des composants structuraux importants de beaucoup de parois cellulaires des tissus protecteurs externes de la plante. La principale fonction de ces lipides est de former une matrice dans laquelle sont enrobées les cires (composés lipidique à longues chaînes hydrophobes) (Raven *et al.*, 2007 ; Murray, 2008).

La lignification, la subérification et la cutinisation sont des contraintes physiques à l'attaque microbienne en limitant l'utilisation de la paroi végétale.

### **3.1.3. Le métabolisme des constituants cytoplasmiques**

- **Les glucides**

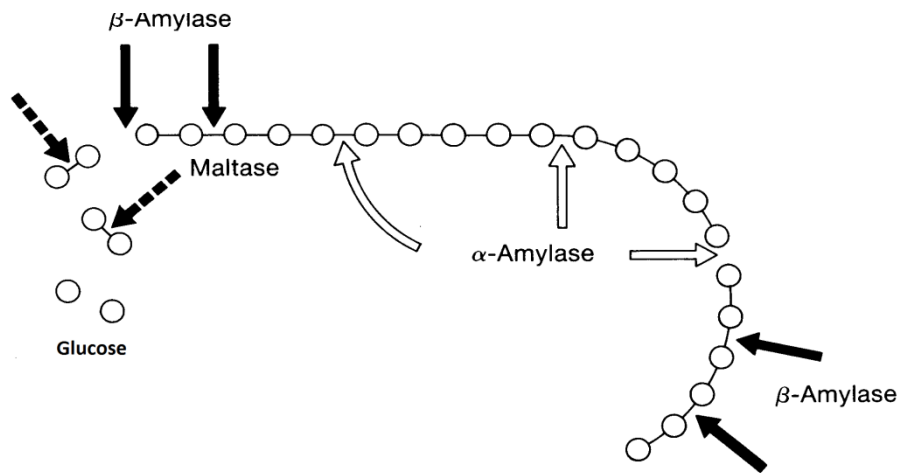
Ils comprennent les glucides hydrosolubles et les polyholosides de réserve (Amidon). Ils sont constitués essentiellement d'une fraction glucidique (99 %) et de l'amylose (20 à 30%). Ce dernier résulte de la polymérisation de molécules de glucoses (entre 500 et 20000) liées par des liaisons de type  $\alpha$  (1-4).



**Figure 8:** Structure de l'amidon (Alberts *et al.*, 1986).

Les glucides solubles et l'amidon (figure 8) sont rapidement fermentés par les bactéries amylolytiques. La vitesse de digestion ruminale de l'amidon varie selon son origine botanique. La présence de protéines sur l'enveloppe des grains d'amidon constitue une limite importante à leur dégradation. La fermentation de l'amidon favorise la production de propionate et diminue la méthanogènes (Jouany, 1994).

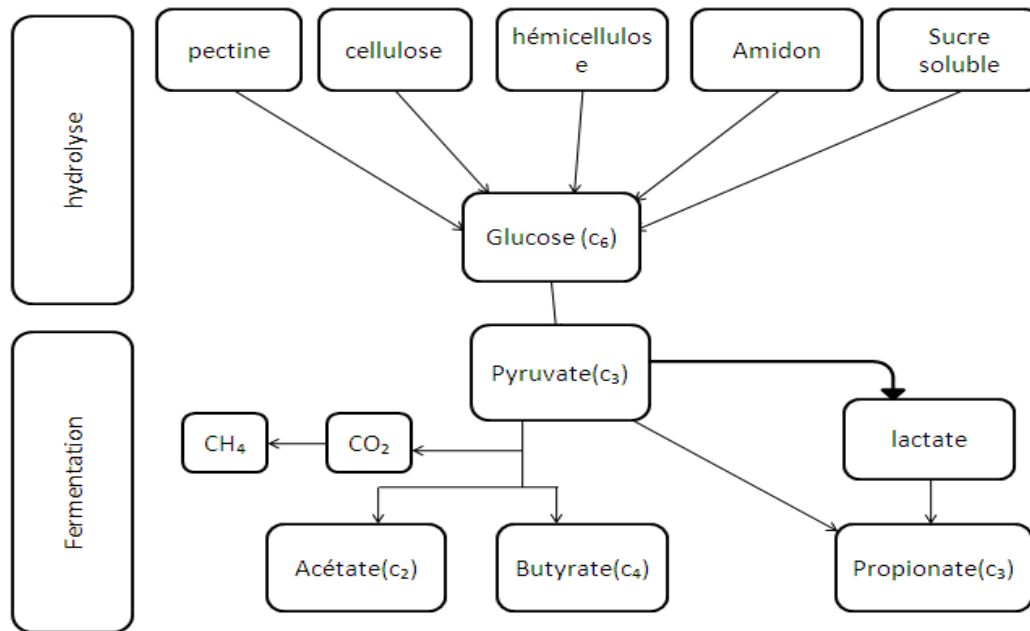
Un certain nombre de bactéries cellulolytiques ruminales sont également amylolytiques comme certaines souches de *F. succinogenes* et la plupart des souches de *B. fibrisolvans* (selon Amokrane (2010) les bactéries amylolytiques sont trop petites pour ingérer les grains d'amidon). Les espèces non cellulolytiques – *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica* et *Selenomonas ruminantium* – comprennent de nombreuses souches dégradant l'amidon (Belbis, 2007).



**Figure 9 :** Mécanisme de dégradation de l'amidon (Alberts *et al.*, 1986)

Les bactéries amylolytiques comme *S. bovis*, *R. amylophilus*, *P.ruminicola*, *S.amylolytica* et *S. ruminantium* sont impliquées dans l'hydrolyse de l'amidon. Les bactéries amylolytiques sont favorisées par un pH ruminal inférieur à 6 (selon Belbis (2007), on retrouve *S. bovis* à des valeurs de pH ruminal proches de 5-5,5. Si le pH décroît encore, et passe sous le seuil de 5, la persistance de *S. bovis* devient impossible). Ces bactéries sécrètent des  $\alpha$ -amylases et  $\beta$ -amylases extracellulaires (figure 9), qui vont s'attaquer aux liaisons  $\alpha$ -glucosidiques de façon aléatoire. Le produit final de cette hydrolyse est le glucose qui va pouvoir être absorbé et fermenté par les microorganismes.

Une forte teneur en amidon (par exemple avec une forte proportion de céréales dans la ration) favorise la production de C<sub>3</sub> (propionique), au détriment de celle du C<sub>2</sub> (Acétique) (Dusart, 2014).



**Figure 10** : Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques (Chentli, 2015).



**Tableau 2 :** Principales équations stéchiométriques simplifiées des fermentations dans le rumen (Offner *et al.*, 2006).

<p><b>Pyruvate (glycolyse) :</b></p> $\text{Glucoses} + 2 (\text{ADP} + \text{Pi}) + 2 \text{NAD}^+ \longleftrightarrow 2 \text{Pyruvate} + 2 \text{ATP} + 2(\text{NADH} + \text{H}^+)$
<p><b>Propionate :</b></p> $\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longleftrightarrow \text{Lactate} + \text{NAD}^+$ $\text{Lactate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \longleftrightarrow \text{Propionate} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ \text{ (voie du lactate)}$ $\text{Pyruvate} + 2 \text{NADH} + 3 \text{H}^+ + \text{ADP} + \text{Pi} \longleftrightarrow \text{propionate} + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{NAD} + \text{ATP}$ <p>(voie de succinate)</p>
<p><b>Acétate :</b></p> $\text{Pyruvate} + (\text{ADP} + \text{Pi}) + \text{NAD}^+ \longleftrightarrow \text{Acétate} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{NADH}$
<p><b>Butyrate :</b></p> $2 \text{Pyruvates} + (\text{ADP} + \text{Pi}) + 2\text{H}^+ \longleftrightarrow \text{Butyrate} + \text{CO}_2 + \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$
<p><b>Valérate :</b></p> $2 \text{Pyruvates} + 3 \text{NADH} + 4 \text{H}^+ \longleftrightarrow \text{Valérate} + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 3 \text{NAD}^+$

### 3.2. Le métabolisme azoté

Dans la cellule végétale, les constituants azotés se trouvent soit sous forme des constituants azotés protéiques (75-85% de l'azote total), soit sous forme des constituants azotés non protéiques (15-25% de l'azote total), qui ne sont utilisables par les ruminants qu'une fois transformés en protéines microbiennes, mais facilement utilisés par la microflore ruminale (Jarrige *et al.*, 1995).

#### 3.2.1. Les constituants azotés protéiques

Ce sont des protéines et polypeptides qui donnent par hydrolyse des peptides et des acides aminés et l'ammoniaque (figure11). Leur structure et leur nature donnent une certaine solubilité dans l'eau et dans les différents tampons ainsi qu'une aptitude à être hydrolysés par les enzymes bactériennes chez les ruminants (Yaakoub, 2006). Les besoins des microorganismes du rumen en azote ammoniacal (acides aminés) ou peptidiques (peptides) peuvent être affecté par la ration alimentaire (sources d'énergie). Les peptides et les acides aminés stimulent la croissance des

microorganismes du rumen lorsqu'une source d'énergie rapidement dégradable comme la pectine, l'amidon ou l'hémicellulose, par contre lorsque des sources d'énergie sont fermentées lentement comme la cellulose la stimulation par les peptides et les acides aminés ne sont que faiblement dégradés (National Research Council, 2001).

### 3.2.2. Les constituants azotés non protéiques

Ce sont des amides, divers nitrates et de l'ammoniac. Il s'agit plutôt de formes azotées simples tel que l'ion nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), l'ion nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), et l'ion ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) avec une teneur assez variable dans les aliments. Parmi les aliments les plus riches on trouve les graines oléagineuses et protéagineuses (22 à 40%). Les céréales sont les plus pauvres en azote non protéique (10%) (Yaakoub, 2006).

La teneur en matières azotées chez les plantes fourragères dépend de leur stade de végétation. Au début de croissance, les graminées fourragères feuillues contiennent environ 20% de matières azotées totales (MAT) dans la matière sèche. Cette teneur diminue à 3% dans les pailles de céréales et l'herbe sèche. Cette teneur dépend également de la nature botanique : le maïs fourrager est plus pauvre en azote que les légumineuses.

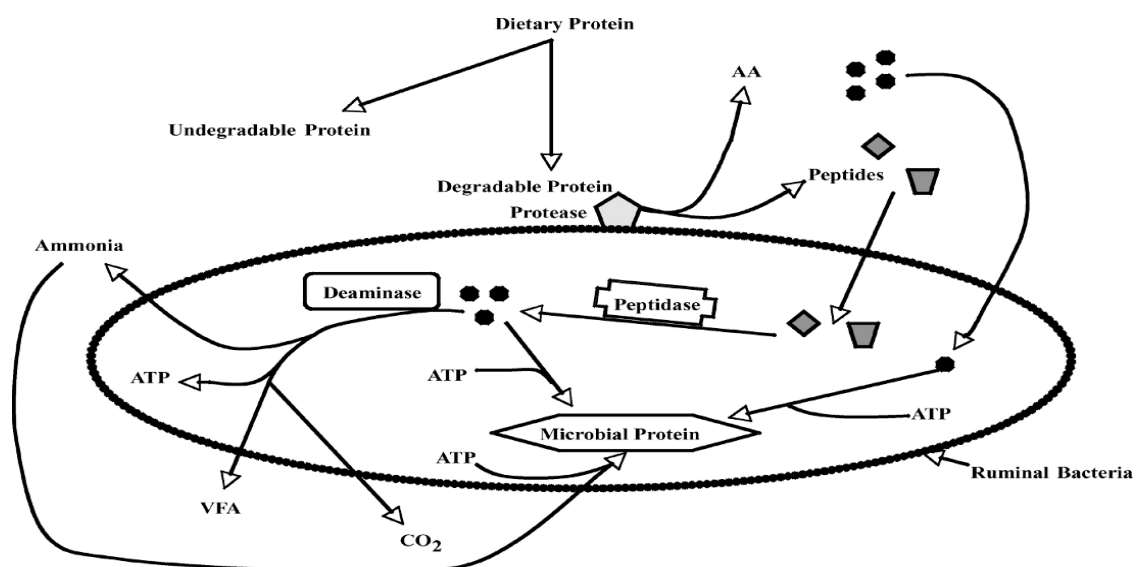
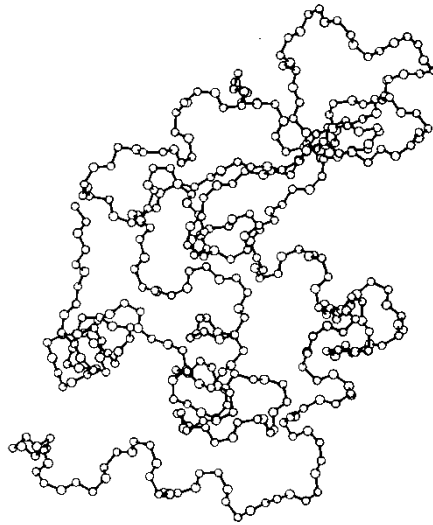


Figure 11: Mécanisme de dégradation des protéines et des acides aminés (Bach *et al.*, 2005).

Les protéines ingérées par l'animal sont dégradées par le microbiote ruminal et plus particulièrement par les bactéries et les protozoaires. Les bactéries ruminales ont une forte activité

protéolytique par rapport aux protozoaires car cette activité est présente au niveau de leur paroi cellulaire, à l'inverse des protozoaires dont l'activité protéolytique est intracellulaire.



**Figure 12 :** Structure tertiaire de protéine (Alberts *et al.*, 1986)

*Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, sont des bactéries protéolytiques. *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas*, *Succinivibrio*, *Lachnospira*, *Eubacterium*, et *Fusobacterium* ont également été isolées sous certaines conditions (Belbis, 2007).

La première étape du métabolisme azoté dans le rumen est la protéolyse. Les enzymes bactériennes agissent directement sur les protéines solubles pour produire des peptides et des acides aminés (figure 12). La vitesse de dégradation des protéines dépend tout d'abord de la solubilité : les prolamines et les glutélines, qui sont insolubles, sont plus lentement dégradées que les globulines, qui sont solubles (Dusart, 2014).

Les protozoaires ingèrent les résidus protéiques (acides aminés) et les bactéries elles-mêmes. Les acides aminés présents dans le rumen sont désaminés majoritairement par les protozoaires pour former l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) sous forme d'ammonium et des squelettes carbonés dont des AGV ramifiés, en particulier isobutyrate et isovalérate. L'activité uréolytique de certaines bactéries participe aussi à la production de  $\text{NH}_3$ , à partir d'urée alimentaire ou endogène (Chentli, 2015 ; National Research Council, 2001).

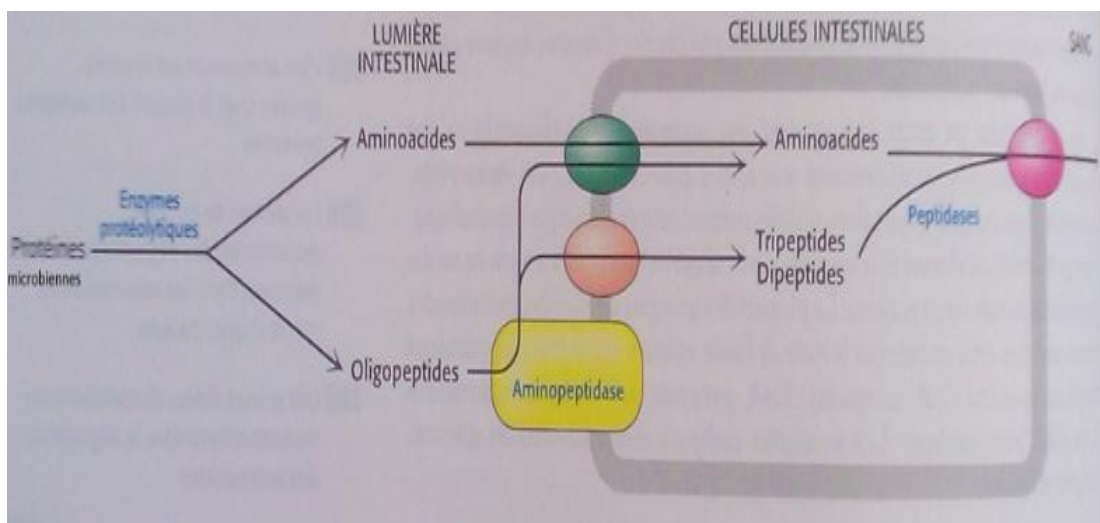
La deuxième étape est une synthèse protéique par les microorganismes (c'est la phase de la protéosynthèse microbienne) qui est assurée par la présence d'énergie nécessaire libérée au cours de

la dégradation des glucides (Yaakoub, 2006 ; National Research Council, 2001), réutilisant en partie les produits de dégradation (peptides, acides aminés et ammoniac préférentiellement).

Les protéines microbiennes assurent 60 à 70% de l'apport protéique des ruminants (Chentli, 2015).

L'urée produite dans le foie à partir du  $\text{NH}_3$  ruminal peut être recyclée par la salive ou à travers la paroi du rumen, ou lorsque ces processus sont saturés, l'urée peut être éliminée par la voie du lait ou par l'urine. Ce processus de recyclage est essentiel dans le cas des rations pauvres en protéines ou en N dégradable. Une relation linéaire entre le  $\text{NH}_3$  ruminal et l'urée du lait ou du sang a été déterminée (Chentli, 2015).

L'ammoniac est la plus importante source d'azote pour la croissance des bactéries ruminales. En fonction de l'alimentation, 60 à 90% de l'azote consommé journalièrement par le ruminant est converti en ammoniac, et de 50 à 70 % de l'azote bactérien est issu de l'ammoniac (Belbis, 2007).



**Figure 13 :** Digestion et absorption des protéines microbiennes (Berg *et al.*, 2013).

Les protéines des cellules microbiennes produites dans le rumen sont dégradées au niveau intestinal par des protéases et des peptidases. Les aminoacides isolés, ainsi que les di- et tripeptides, sont transportés de la lumière du tube digestif dans les cellules intestinales (figure 13), puis libérés dans le sang afin d'être absorbés par d'autres tissus (Berg *et al.*, 2013).

## 4. Le métabolisme de sources azotées alternatives

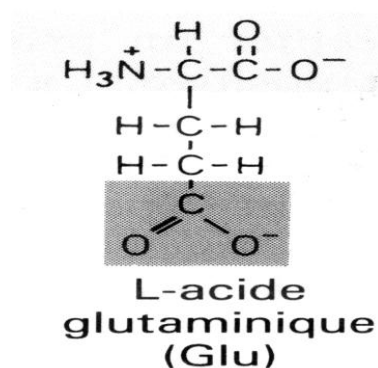
### 4.1. Le bicarbonate d'ammonium

Le bicarbonate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), composé inorganique de poids moléculaire 79,06  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  avec un prix de 11,20 Euro/Kg (Sahli et Latrous, 2015), et un pH de 7,8. Le bicarbonate d'ammonium n'est pas toxique pour les êtres vivants.

Il constitue une source importante de l'azote, 30-50% des protéines microbiennes du rumen peut être recyclé à partir l'ion de l'ammonium (Morrison, 2000).

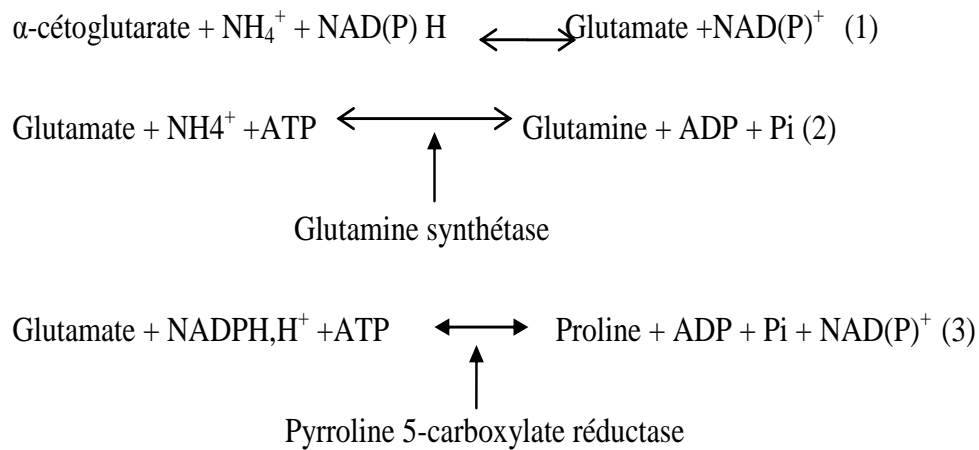
### 4.2. Le Glutamate de sodium

Le glutamate de sodium est un composé organique. Sa formule chimique est :  $\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4\text{Na}$  (figure 14). sa masse moléculaire est de 187,13  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  avec un prix de 5,33 Euro/Kg (Sahli et Latrous, 2015), et un pH de 7.



**Figure 14 :** Structure de l'acide glutamique.

Le glutamate de sodium est bénéfique pour l'animal, car une fois dans les bactéries, l'ion d'ammonium et les acides aminés sont transformés en groupement amide de la glutamine ou (et) de l'asparagine. Ces groupements sont utilisés pour l'amination de l' $\alpha$ -cétoglutarate en glutamate (figure 15(1)). Vient ensuite la synthèse de l'alanine et de l'aspartate. Puis Celle des autres acides aminés (glutamine, proline) (figure 15(2) et (3)) a lieu par transfert des groupes aminés sur d'autres chaînes carbonées. L'ensemble de ces acides aminés est alors utilisé pour la formation des protéines et la synthèse des acides nucléiques (Thivend *et al.*, 1985).



**Figure 15 :** Processus d'amination et la synthèse des acides aminés.

Ces réactions de transamination sont réversibles et elles peuvent donc être utilisées pour la synthèse des aminoacides à partir de  $\alpha$ -cétoacides (Berg *et al.*, 2013).

L'atome d'azote du glutamate est converti en ion ammonium libre par désamination oxydative. Cette réaction est catalysée par le glutamate déshydrogénase. Cet enzyme est inhabituel en ce sens qu'il peut utiliser soit le  $\text{NAD}^+$ , soit le  $\text{NADP}^+$  du moins dans certaines espèces. La réaction s'effectue par déshydrogénation de la liaison C-N (Berg *et al.*, 2013).

#### 4.3. Le nitrate de potassium

Le nitrate est un composé inorganique. Sa formule chimique est  $\text{NO}_3^-$ . Sa masse moléculaire est de  $62 \text{ g.mol}^{-1}$ .

L'azote constituant la molécule de nitrate est dénommé azote nitrique et généralement noté  $\text{N-NO}_3^-$ . Le nitrate est un élément minéral nutritif pour les végétaux et les microorganismes. On peut trouver le nitrate sous forme  $\text{KNO}_3$ , c'est le nitrate de potassium, sa masse moléculaire est de  $101,01 \text{ g.mol}^{-1}$ . Le prix de ce produit est 5,61 Euro/Kg (Sahli et Latrous, 2015), et un pH de 6,2.

Le nitrate de potassium est toxique pour les microorganismes. Les nitrites sont absorbés à travers la paroi du rumen dans le sang où ils interagissent avec l'hémoglobine dans l'érythrocyte pour former la méthémoglobine, qui est incapable de transporter l'oxygène (Yang *et al.*, 2016).

**Tableau 3 :** Niveau du nitrate de fourrage (base de matière sèche) et l'effet potentiel sur les animaux (Kraig *et al.*, 2011).

ppm Nitrate (NO <sub>3</sub> )	Effet sur les animaux
0–3,000	Pratiquement toute sécurité.
3,000–6,000	Modérément sécurité dans la plupart des situations; limiter l'utilisation des animaux stressés à 50% de la ration totale.
6,000–9,000	Potentiellement toxique pour le bétail en fonction de la situation; ne devrait pas être la seule source d'alimentation.
9000 et au-dessus	Dangereux pour le bétail et souvent va causer la mort.

La réduction du nitrate et l'accumulation du nitrite dans le rumen ont d'abord été détectée par Shapiro *et al.* (1949) et Lewis (1951). Le nitrite résultant de la réduction des nitrates est donc toxique et les conséquences de nitrate peuvent être fatales.

Le schéma global du métabolisme du nitrate dans le rumen est représenté sur la figure :

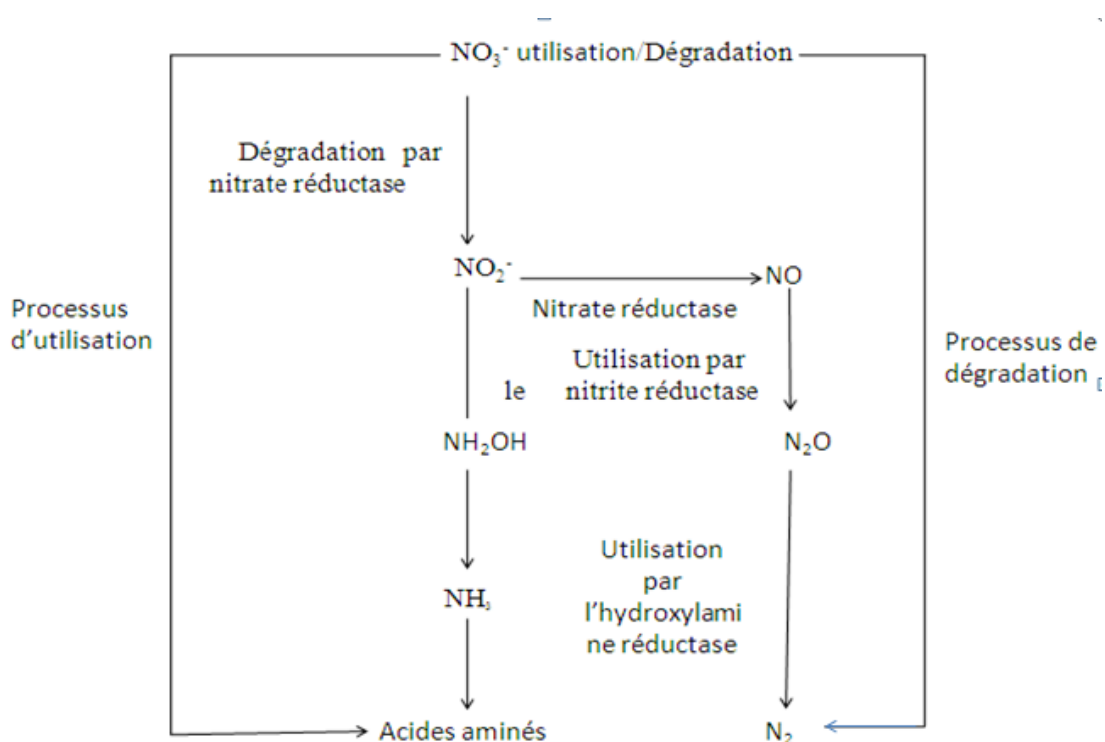


Figure 16: Métabolisme du nitrite et du nitrate (Yang *et al.*, 2016).

Les réductions assimilatrice et dissimilatrice du nitrite, conduisent à la production d'ammoniac et ont été mises en évidence dans le contenu du rumen. En incubation avec le contenu ruminal de bovin *in vitro*, la réduction assimilatrice des nitrates était prédominante, et aucune dénitrification de N<sub>2</sub> n'a été détectée, mais une certaine accumulation de N<sub>2</sub>O, a eu lieu après l'addition du nitrite. Selon l'équilibre des activités enzymatiques, la séquence de réduction de NO<sub>3</sub> à NH<sub>4</sub><sup>+</sup> peut donner NO<sub>2</sub>, NO ou N<sub>2</sub>O à toute étape (figure 15). Normalement, la réduction du nitrite en ammoniac est beaucoup plus lente que la réduction du nitrate en nitrite, ce qui conduit à l'accumulation de nitrite. Ainsi, une concentration dangereuse de nitrite peut avoir lieu quand un régime alimentaire riche en nitrates est introduit (Yang *et al.*, 2016).

Plusieurs facteurs importants influent sur la toxicité du nitrite dérivé du nitrate :

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

#### **4.4. L'extrait de levure**

L'extrait de levure et mélange organique dérivé de cellules de levures est composé de :

- 62-73,8 % des protéines totales.
- 10-11,8% d'azote total.
- 4,5-5,8% d'azote aminique.
- ≤0,5% de cendre de sodium.
- ≤0,6% de moisissure.
- Le prix de ce produit est de 203 Euro/Kg (Sahli et Latrous, 2015).
- Son pH est de 6,8-7,2.

L'addition de cellules de levure à la ration du ruminant laitier semble, dans un certain nombre de cas, bénéfique pour le métabolisme ruminal (Reverdin *et al.*, 2004). C'est une excellente source de vitamines B et d'autres facteurs de croissance non identifiés. Des acides organiques, des acides aminés et des vitamines peuvent jouer un rôle dans la stimulation de l'absorption du lactate par certaines bactéries comme *S. Ruminantium* et *M. elsdenii* (Callaway et Martin, 1997).



## 5. Méthodes d'étude de l'activité métabolique des microorganismes du rumen

Nos essais ont été conduits *in vitro*, donc entre le milieu ruminal *in vivo* et le milieu de fermentation *in vitro* de grandes différences existent, parmi ces différentes, nous a cité quelques une dans le tableau 4.

**Tableau 4 :** Comparaison entre le milieu ruminal *in vivo* et le milieu de fermentation *in vitro*.

<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le système de fermentation est fermé.</li> <li>- Absence d'apport externe et pas d'absorption des acides aminés.</li> <li>- Accumulation des métabolites terminaux.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Le système de fermentation est discontinu (ouvert/fermé).</li> <li>- Evacuation du contenu ruminal et absorption par la paroi ruminale.</li> <li>- Pas d'accumulation des métabolites terminaux.</li> </ul>

Chapitre 02

**Matériels**

**Et**

**Méthodes**

## **1. Introduction**

Notre travail a été réalisé *in vitro*, dans des conditions d'anaérobiose à 39°C et à un pH de 6,8 dans un milieu tamponné au bicarbonate de sodium. Il consiste à étudier l'effet de différentes sources d'azote telles que le bicarbonate d'ammonium, le glutamate de sodium, le nitrate de potassium et l'extrait de levure sur l'activité métabolique des bactéries ruminales spécialisées dans la dégradation de la cellulose (cellulolytiques), de la pectine (pectinolytiques), de l'amidon (amylolytiques), de l'hémicellulose (xylanolytiques) et de la caséine (protéolytiques). Pour cela l'inoculum (contenu ruminal filtré) a d'abord été épuisé dans les conditions citées au début de ce paragraphe pour réduire l'énergie et l'azote résiduels apportés par les particules alimentaires solubles ou celles qui passent à travers le filtre. L'inoculum épuisé sert ensuite à assurer l'inoculation des différentes combinaisons source d'azote – source d'énergie.

## **2. Epuisement de l'azote et de l'énergie résiduels**

Comme l'inoculum est constitué par le contenu ruminal apporte des particules alimentaires est malgré la filtration, nous avons essayé de réduire au maximum cet apport en énergie. La fin de l'épuisement est estimée par l'apparition d'un plateau dans la courbe de production de gaz.

## **3. Les sources d'azote sont-elles utilisées comme source d'énergie**

Pour répondre à cette question, nous avons effectué un épuisement suivi d'un l'ajout de chaque source d'azote (équivalent à 222,52 N mg/l) et d'une incubation pendant 22h en anaérobiose à 39°C et un pH 6.8.

## **4. Effet de la source d'azote sur les principaux groupes bactériens dans le rumen**

Afin d'étudier l'effet des différentes sources d'azote sur les bactéries cellulolytiques, pectinolytiques, amylolytiques, xylanolytiques et protéolytiques et déterminer la source d'azote qui stimule le plus les groupes bactériens, nous avons effectué des fermentations en utilisant la cellulose, l'amidon, la pectine, le xylane et la caséine avec les différentes sources d'azote, le bicarbonate d'ammonium, le glutamate de sodium, l'extrait de levure et nitrate de potassium.

## **5. Inoculum et animal donneur**

Les animaux à partir desquels l'inoculum est prélevé, sont des bovins ayant un régime libre non défini. Ils pèsent en général entre 300 et 600 Kg.

L'inoculum utilisé est constitué par le contenu ruminal prélevé juste après l'abattage à l'abattoir municipal d'El khroub. L'inoculum est recueilli dans des thermos aseptisés et transporté directement au laboratoire où il est filtré sur deux couches de tissu en mousseline. Le filtrat est ensuite utilisé pour l'inoculation dans tous les essais.

## **6. Analyse des caractéristiques de l'inoculum**

### **6.1. Les caractéristique physico-chimiques**

- **Le pH**

Le pH du liquide ruminal est relevé directement après son arrivée au laboratoire à l'aide d'un pH mètre préalablement étalonné.

- **Le potentiel d'oxydoréduction**

Le potentiel d'oxydoréduction ou potentiel redox (millivolts) représente la force des systèmes présents échangeant des électrons. Il est d'autant plus élevé (valeurs positives) que le milieu est oxydant (Branger *et al.*, 2007).Ce potentiel est mesuré à l'aide d'électrodes spécifiques.

- **La température**

La température de l'inoculum est généralement mesurée avant son utilisation à l'aide d'un thermomètre à mercure.

- **Détermination de la matière sèche**

La matière sèche est déterminée par la perte de poids de l'échantillon par évaporation de l'eau à l'étuve réglée à 105°C jusqu'à ce que le poids devienne constant.

## **Méthode**

Afin de déterminer le taux de la matière sèche, une quantité du liquide ruminal homogénéisé est pesée dans des creusets en porcelaine préalablement séchés et tarés. Ils sont par la suite placés dans une étuve à réglée à 105°C pendant 24 heures. Après 24 h, les creusets

sont mis dans un dessiccateur pendant au moins une demi-heure pour les refroidir dans une atmosphère sèche.

La teneur en matière sèche est calculée par la relation suivant :

$$MS = (P_2 - P_0)$$

%MS =  $100 \times MS / MF$ , elle est exprimée en g/100g de matière fraîche.

$P_0$  = poids de la tare

$P_1$  = prise d'essai en matière fraîche

$P_2$  = poids après séchage + la tare

Le taux d'humidité est calculé comme étant le complément à 100 de la MS.

- **Détermination de la matière organique et de la matière minérale**

Lorsque l'échantillon préalablement séché est soumis à une incinération à 550°C, la matière organique se consomme et la matière résiduelle constitue la matière minérale (AOAC 1990).

#### **Méthode**

La quantité de matière sèche déjà obtenue dans le même creuset en porcelaine est ensuite mise dans un four à moufle à 550°C pendant 8 h. La perte de poids lors de la calcination correspond à la matière organique et le résidu aux cendres (AOAC, 1990).

La teneur en matière minérale (MM) est calculée par la relation suivant:

$$MM = P_2 - P_0$$

%MM =  $100 \times MM / MS$ , elle est exprimée en g/100g de matière sèche.

$P_0$  = poids de la tare

$P_2$  = poids après séchage + tare

- La matière organique est calculée comme étant le complément à 100 de la MM.

#### **6.2. Les caractéristique microbiologiques de l'inoculum**

La flore ruminale est analysée par un examen microscopique de trois types de frottis :

- Un frottis de liquide ruminal frais tel quel (LRTQ), dès son arrivée.
- Un frottis du liquide ruminal filtré (LRF) à travers deux couches de mousseline.
- Un frottis après la fermentation.

Les lames sont par la suite soumises à la coloration de Gram des anaérobies selon Kopeloff.

**Tableau 5:** Procédure de la coloration de Gram selon Kopeloff.

<b>Procédure de coloration</b>	<b>Réactifs utilisés</b>
<b>On fait agir le cristal violet (solution A) sur la préparation et on ajoute 5 gouttes de la solution B : Durée totale 30seconds.</b>	Cristal violet alcalin : Solution A : 10 g de cristal violet dans 1000 ml d'eau distillée. Solution B : 50 g de NaHCO <sub>3</sub> dans 1000ml d'eau distillée.
<b>On rince à l'eau de robinet pendant 2 à 3 seconds.</b>	
<b>On couvre avec la solution du mordant (KI+I) Durée : 60 seconds</b>	Solution iodo-iodurée : 4g de NaOH dans 25 ml d'eau distillée, on ajoute 20 g de iode et 1g de KI, bien dissoudre. On ajoute graduellement 975 ml d'eau distillée, en agitant correctement à chaque ajout.
<b>On rince à l'eau de robinet pendant 2 à 3 seconds.</b>	
<b>On éponge l'eau avec un buvard propre</b>	
<b>On décolore au maximum pendant 15-20 seconds.</b>	Solution de mélange décolorant : On mélange 300 ml d'acétone à 700 ml d'alcool éthylique à 95%.
<b>On rince à l'eau immédiatement.</b>	
<b>On éponge l'eau en excès.</b>	
<b>On recouvre par la solution de contre-colorant pendant 20 seconds.</b>	solution de contre-colorant : On ajoute de l'alcool à 95% pour dissoudre complètement 20g de safranine ; ensuite on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée.
<b>On rince puis on sèche avant d'examiner le résultat.</b>	

## 7. Les sources d'azote alternatives

Nous avons utilisé quatre sources d'azote alternatives différentes

- Deux sources d'azote organiques:
  - L'extrait de levure (forme essentiellement protéique et aminique de l'azote).
  - Le glutamate de sodium (forme aminique de l'azote).
- Deux sources d'azote inorganiques
  - Le bicarbonate d'ammonium
  - Le nitrate de potassium

## 8. Les sources d'énergie

Pour évaluer l'utilisation de différentes sources d'énergie en présence des différentes sources d'azote par la flore ruminale bovine nous avons utilisé cinq polymères : la cellulose, l'amidon, la pectine, le xylane et la caséine.

## 9. Composition des milieux de fermentation

Dans notre travail nous avons deux types de milieux : le milieu d'épuisement et le milieu de fermentation avec des compositions différentes.

**Tableau 6:** Composition du milieu d'épuisement.

Type de milieu	Composition par litre
Milieu d'épuisement	NaHCO <sub>3</sub> .....10 g Eau distillée.....960 ml Résazurine.....1,24 ml Solution réductrice : 40 ml NaOH .....8 ml Na <sub>2</sub> S ..... .0,4 g

**Tableau 7 :** Composition du milieu de fermentation des différentes sources d'azote.

<b>Composition du milieu de fermentation</b>	<b>Les sources d'azote alternatives g/l</b>
NaHCO <sub>3</sub> .....10g	Bicarbonate d'ammonium.....1,25
Eau distillée.....960ml	Glutamate de sodium.....2,67
Résazurine.....1,24 ml	Nitrate de potassium.....1,53
Solution réductrice : 40ml	Extrait de levure.....1,76
NaOH ..... 8 ml	
Na <sub>2</sub> S .....0,4 g	

**Tableau 8 :**Composition des milieux de fermentation des différentes sources d'énergie avec les différentes sources d'azote.

<b>milieu de fermentation</b>	<b>sources d'azote alternatives g/l</b>	<b>sources d'énergie g/l</b>
NaHCO <sub>3</sub> .....10 g	Bicarbonate	Cellulose.....10
Eau distillée.....960 ml	d'ammonium.....1, 25	Amidon.....10
Résazurine.....1, 24 ml	Glutamate de sodium....2, 67	Pectine.....10
Solution réductrice : 40 ml	Nitrate de potassium....1,53	Xylane.....10
NaOH ..... 8 ml	Extrait de levure.....1,76	Caséine.....10
Na <sub>2</sub> S .....0,4 g		
A chaque essai en ajoute une seule source d'azote avec les différentes sources d'énergie.		



**Tableau9 :** Composition du milieu de fermentation de la cellulose avec des différentes sources d'azote.

milieu de fermentation	sources d'azote alternatives g/l	source d'énergie
NaHCO <sub>3</sub> .....10 g	- Bicarbonate	Cellulose.....10 g/l
Eau distillé.....960 ml	d'ammonium.....1,25	
Résazurine.....1,24 ml	- Glutamate de sodium.....2,67 l	
Solution réductrice :... 40 ml	- Nitrate de potassium.....1,53	
NaOH .....8 ml	- Extrait de levure.....1,76	
Na <sub>2</sub> S .....0,4 g		

## 10. Préparation des milieux

### a) Préparation du milieu d'épuisement

Dans 960 ml d'eau distillée stérile, on ajoute 10g de NaHCO<sub>3</sub>, 1,24 ml de la résazurine. Ensuite on stérilise le milieu dans l'autoclave pendant 15min à 120°C. Après autoclavage, le milieu est placé dans un bain- marie à 39°C et maintenu sous un flux continu de CO<sub>2</sub> par barbotage. On ajoute 40 ml de solution réductrice constituée de 8ml de NaOH et 0,4g de Na<sub>2</sub>S. Le barbotage est maintenu jusqu'à la réduction du milieu indiquée par le virage de la couleur de l'indicateur du potentiel d'oxydoréduction (résazurine) du bleu au rose avant de devenir incolore (figure 17).



**Figure 17:** Virage de couleur du milieu d'épuisement.

## **b) Préparation du milieu de fermentation**

### **b.1. Milieu de fermentation des différentes sources d'azote**

Dans 960 ml d'eau distillée stérile, on ajoute 10 g de  $\text{NaHCO}_3$ , 1,24 ml de la résazurine. Ensuite on stérilise le milieu dans l'autoclave pendant 15 min à 120°C. Après autoclavage, le milieu est placé dans un bain- marie à 39°C et maintenu sous un flux continu de  $\text{CO}_2$  par barbotage. On ajoute 40 ml de solution réductrice constituée de 8 ml de NaOH et 0,4 g de  $\text{Na}_2\text{S}$ . Le barbotage est maintenu jusqu'à la réduction du milieu indiquée par le virage de la couleur de l'indicateur du potentiel d'oxydoréduction (résazurine) du bleu au rose avant de devenir incolore.

-Au cours du transfert, on ajoute dans chaque flacon une seule source d'azote (bicarbonate d'ammonium, glutamate de sodium, nitrate de potassium ou extrait de levure).

### **b.2. Milieu de fermentation des différentes sources d'énergie avec les différentes sources d'azote.**

On a suivi la même démarche de préparation de premier milieu de fermentation (b .1), et au cours de transfert en ajoute dans les flacons une seule source d'énergie (cellulose, pectine, amidon, xylane ou caséine) à raison de 10g/l.

### **b.3. Milieu de fermentation de la cellulose avec les différentes sources d'azote**

On a suivi la même démarche de préparation de premier milieu de fermentation (b .1), et au cours de transfert en ajoute dans les flacons 10 g/l de cellulose.

## **11. Incubation des milieux**

### **11.1 Milieu d'épuisement**

-12 flacons en verre stérilisable de 250ml sont préalablement lavés à l'eau javellisée et rincés à l'eau distillée sont stérilisés dans un autoclave pendant 15min à 120°C. Quinze d'inoculum filtré et 15ml du milieu sont transférés en utilisant une seringue en verre aseptisée.

- La colonne de réduction sert à fournir le  $\text{CO}_2$  pour assurer l'anaérobiose au cours des différentes étapes de l'inoculation. Elle comporte deux bouteilles de gaz l'une à hydrogène et

l'autre à CO<sub>2</sub>, et un cylindre remplis de copeaux de cuivre. Le CO<sub>2</sub> est purifié par piégeage d'éventuelles traces d'oxygène par passage à travers les copeaux de cuivre chauffés à 300°C. L'oxygène résiduel réagit alors avec le cuivre pour former de l'oxyde de cuivre (CuO). La durée d'épuisement est entre 5 à 7 heures.

### **11.2. Milieu de fermentation**

Dans les 12 flacons contenant le milieu d'épuisement déjà saturés en CO<sub>2</sub>, 120 ml de milieu de fermentation sont ajoutés à l'aide d'une seringue de 120 ml. Après chaque inoculation, le flacon est hermétiquement fermé avec un bouchon préalablement aseptisé, lié directement à l'appareil de mesure de gaz. Une fois l'inoculation des 12 flacons achevée ces derniers sont placés dans un incubateur au bain-marie à 39°C pour une durée de 24h et 72h. Après la fermentation, le contenu de chaque flacon est vérifié pour son pH final et le Gram de sa population bactérienne.

### **12. Mesure de l'activité métabolique de la flore ruminale**

La production de gaz est fondamentalement le résultat de la fermentation des glucides en métabolites terminaux, gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>), H<sub>2</sub>O et AGV (acétate, propionate et butyrate). La cinétique de fermentation est suivie par la mesure volumétrique de la production de gaz (figure 18) indiquée automatiquement par l'appareil qui permet de mesurer instantanément la quantité de gaz produite dans chaque flacon en donnant à chaque fois un signal lumineux (0,33 ml). Les signaux sont enregistrés et reportés graphiquement en fonction du temps d'incubation.



**Figure 18:** Appareil de mesure du gaz produit par la fermentation *in vitro*.

### 13. Expression et élaboration des données

La mesure de l'activité métabolique a été suivie par l'enregistrement des spots issus de la production de gaz dans chacun des canaux de fermentation. Chaque spot indique un volume de gaz dégagé de 0,3 ml. Les temps obtenus sont convertis en temps absolus (en heures). Les volumes obtenus sont ensuite regroupés dans un tableau afin de tracer des courbes représentant le volume de gaz produit par chaque groupe bactérien en fonction du temps de fermentation. Pour les sources d'azote utilisées comme source d'énergie, les résultats sont exprimés en ml de gaz par 222 mg d'azote par litre de milieu d'incubation, alors que pour les sources d'énergie les résultats sont exprimés en ml de gaz par 10 gramme de MS par litre de milieu de d'incubation.

Chapitre 03

Résultats

Et

Discussion

## 1. Analyse des caractéristiques de l'inoculum

### 1.1. Analyses des caractéristiques générales

Les animaux utilisés pour le prélèvement du contenu du rumen sont des bovins de différents poids variant entre 350 et 500 kg. Les caractéristiques générales de ce contenu sont présentées dans le tableau 10.

**Tableau 10:**Caractéristiques générales du contenu du rumen.

Essais	Poids (kg)	Consistance	Couleur	Odeur
<b>Essai 1 06/04/2016</b>	400	Pailleuse, granuleuse.	Jaune clair	Désagréable
<b>Essai 2 12/04/2016</b>	400	pailleuse	Jaune clair	Désagréable
<b>Essai 3 26/04/2016</b>	-	Paille, herbe, foin très sec	Verdâtre	Désagréable, piquante
<b>Essai 4 04/05/2016</b>	500	Paille, herbe, foin liquide	Verdâtre	Désagréable, piquante
<b>Essai 6 24/05/2016</b>	350	Paille, herbe, foin liquide	Jaune clair	Désagréable, piquante

Les contenus de rumen utilisés ont une consistance et une couleur variable. Cette variation est liée fortement à l'alimentation des bovins qui, composée d'un mélange de paille, d'herbe et de foin, donne une couleur verdâtre avec une odeur désagréable fortement piquante ; et une alimentation composée de maïs et de paille, donne une couleur jaune claire avec une odeur moins piquante. L'odeur provient des produits de la fermentation ruminale, caractérisée par des acides gras volatils.

### 1.2. Analyse des caractéristiques physico-chimiques

Le pH du rumen, le potentiel d'oxydoréduction (rH), la température, la matière sèche (MS), la matière organique (MO) et la matière minérale (MM) ont été mesurés. Les valeurs sont présentées dans le tableau 11.

**Tableau 11:**Caractéristiques physico-chimiques de l'inoculum.

	<b>pH</b>	<b>rH</b>	<b>T</b>	<b>MS</b>	<b>MM</b>	<b>MO</b>
		<b>mV</b>	<b>(°C)</b>	<b>(% MF)</b>	<b>(% MS)</b>	<b>(% MS)</b>
<b>Essai1</b> 06/04/2016	5,78	-220	36	11,67	7,0	92,99
<b>Essai2</b> 12/04/2016	5,22	-210	34	16,57	9,11	90,89
<b>Essai3</b> 26/04/2016	5,13	-	-	19,25	10,13	89,87
<b>Essai4</b> 04/05/2016	4,95	-	26	11,25	12,06	87,94
<b>Essai5</b> 24/05/2016	-	-	-	16,3	11,06	88,94
<b>Minimum</b>	5,78	-210	26	11,25	7,0	87,94
<b>Maximum</b>	4,95	-220	34	19,25	12,06	92,99
<b>Moyenne</b>	<b>5,27</b>	<b>-215</b>	<b>32</b>	<b>15,01</b>	<b>9,87</b>	<b>90,13</b>
<b>écart-type</b>	0,36	7,07	5,29	3,44	1,94	1,94

- **pH de l'inoculum**

D'une manière générale, les valeurs du pH du liquide ruminal des différents essais sont comprises entre (4,95 et 5,78) avec une valeur moyenne de (5,27) et un écart –type de 0,36. Cette valeur est favorable pour l'activité des microorganismes du rumen.

Le pH optimal du rumen est généralement compris entre (5,5 et 7) (Dussart, 2014).La variation du pH est fortement liée à la phase digestive, plus cette dernière avance, plus elle donne des valeurs plus basses due à la libération des acides gras volatils.

Les valeurs du pH qui sortent de la zone de normalité (4,95 et 5,78) sont la conséquence d'un déséquilibre alimentaire qui peut être justifié dans notre cas par l'utilisation d'un jus de rumen issu des animaux à un régime alimentaire libre.

- **Le potentiel d'oxydoréduction**

D'une manière générale, les valeurs négatives montrent que le milieu est en anaérobiose (pauvre d'O<sub>2</sub>). Dans notre résultat le potentiel d'oxydoréduction est mesuré entre (-210 à -220 mV), avec une valeur moyenne de (-215mV), et un écart-type de (7,07). Cette

valeur est proche de celle citée par Bonnefont (2008), qui a rapporté une zone de (-150 à -250 mV).

- **La température**

La température de l'inoculum des différents essais est comprise entre 26°C et 34°C, avec une valeur moyenne de 32°C, et un écart-type est de(5,29).

La valeur 32°C est proche à celle citée par Dussart (2014), qui a trouvé des valeurs comprises entre 39 et 41°C. Selon Guillame(2007) cette valeurvariee fonction de l'intensité des fermentations ruminales pendant le repas.

- **La matière sèche, la matière minérale, et la matière organique**

La valeur de la matière sèche du liquide ruminale dans les différents essais varie entre(1,25 % à 19,25%) avec une moyenne de (15,01) et un écart-type de (3,44). Ce résultat est inférieur à celui obtenu par Fonty et Chaucheyras-Durand (2007) ainsi que celui obtenu par Amokrane (2010) qui ont enregistré des valeurs entre(8,5 % à 18%).

En ce qui concerne la valeur de la matière organique, on a obtenu des valeurs variant entre ( 8,94% et 92,99%) avec une moyenne de (90,13%) et un écart-type de (1,94), alors que la matière minérale varie entre (7 % et 12,06 %) avec une moyenne de ( 9,87 )et un écart-type de (1,94).

Donc le contenu ruminal est riche en matière organique et pauvre en matière minérale. Ceci révèle un contenu ruminal assez liquide.

Les variations de ces paramètres dépendent en premier lieu de l'état digestif de l'animal et de la nature de sa ration alimentaire.

## **2. Analyse des caractéristiques microbiologiques de l'inoculum**

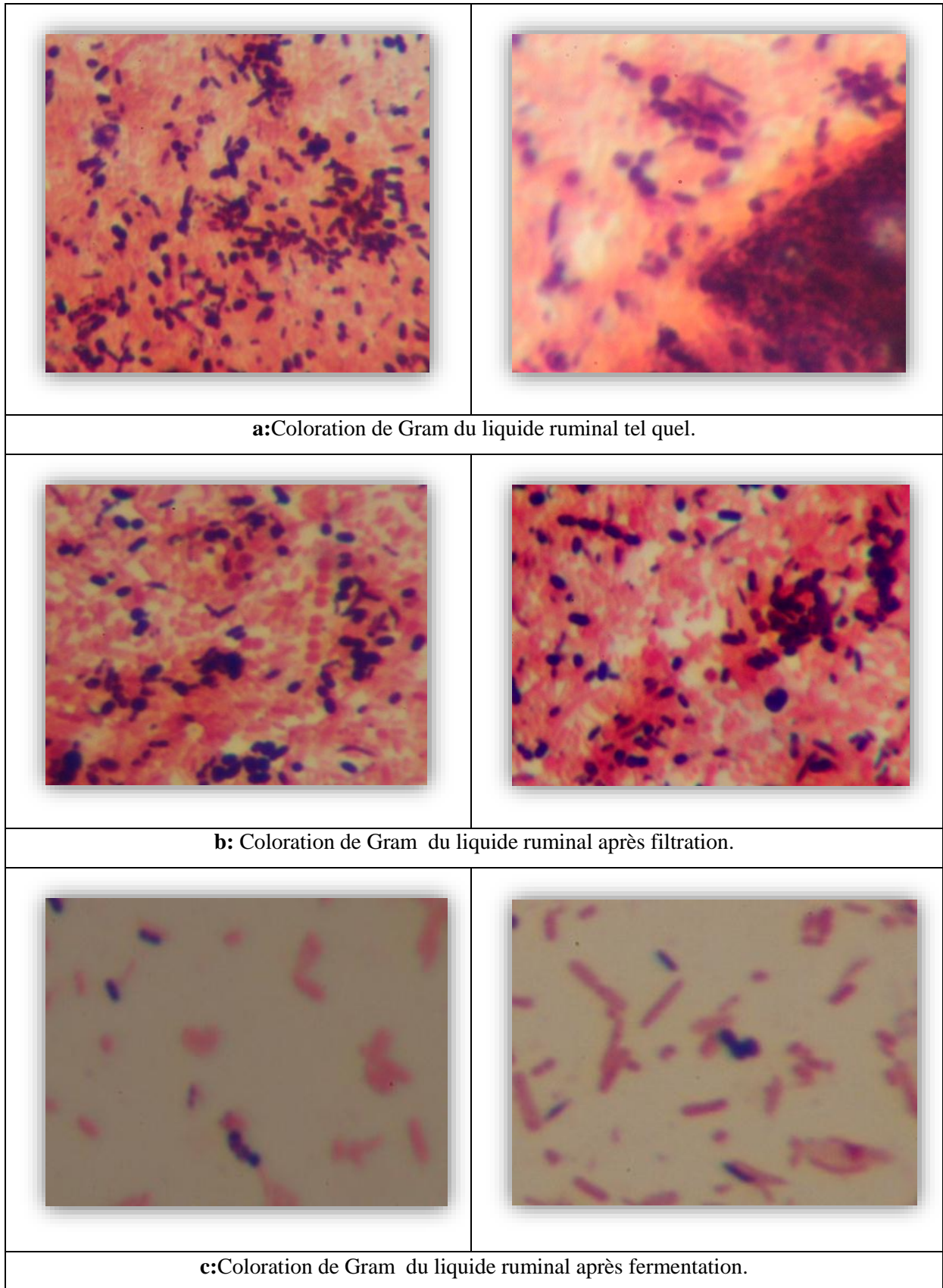
La coloration de Gram et l'observation microscopique révèle en premier lieu dans le liquide ruminale tel quel (figure 18 a) une dominance absolu des bactéries Gram négatifs par rapport aux bactéries Gram positifs. Qui sont présente par des formes et mode de regroupements différents cocci, bacille, diplocoque, tétrade, coccobacille, vibrion, chainette et d'autre forme que nous n'avant pas pu déterminer à cause de la charge microbienne et la qualité des microscopes.



Après la filtration, la charge microbienne sont diminuée (figure 18 b) et on constate une forte diminution des bactéries Gram<sup>+</sup> par rapport des bactéries Gram<sup>-</sup> qui reste toujours le plus dominant.

En admettant que la majorité des bactéries Gram<sup>+</sup> soit attachée aux fibres alimentaires (Guillaume, 2007), la quantité des bactéries Gram<sup>+</sup> disparues après filtration est due à l'élimination de ces dernières avec les grosses particules alimentaires auxquelles elles s'associent dont la taille est supérieure à celle des pores du filtre.

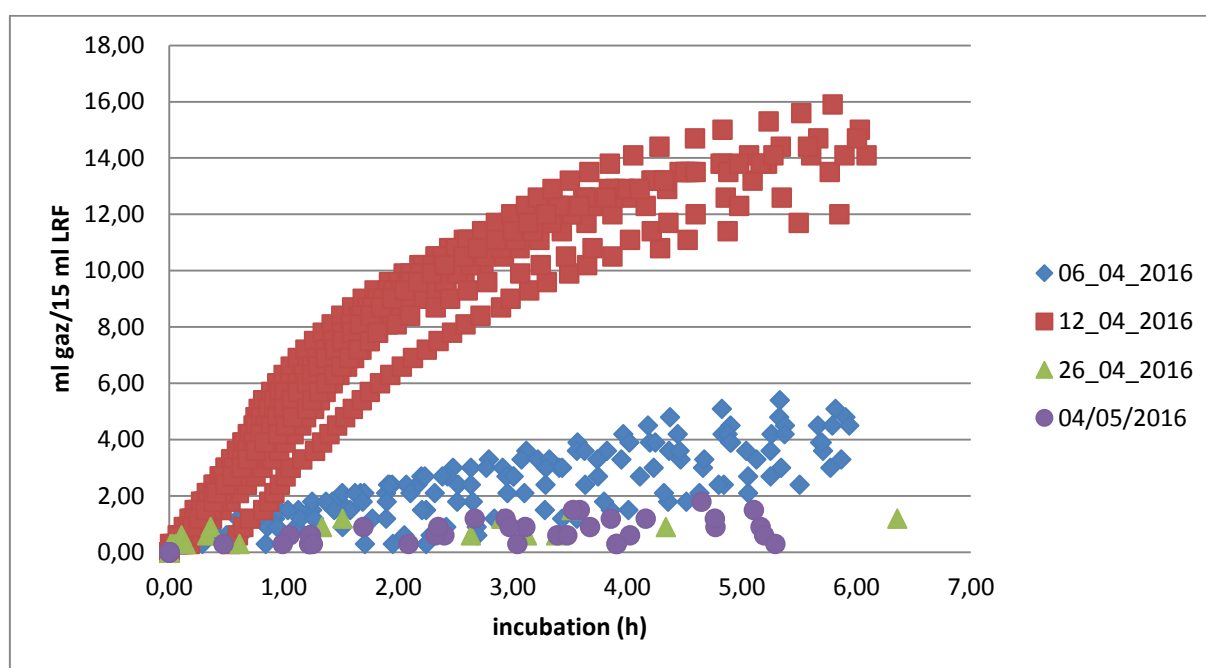
Après la fermentation, le taux des bactéries Gram négatif et Gram positif ont fortement diminué (figure 18 c).



**Figure 18** :Résultats de la coloration de Gram.

### 3. L'épuisement de l'azote et de l'énergie résiduels

Durant la phase d'épuisement, la flore ruminale va utiliser l'énergie et l'azote apportés par le contenu ruminal filtré. Cet azote et énergie résiduels sont métabolisés en protéines microbiennes et en ATP, ceci permet d'abaisser fortement le contenu de l'inoculum en azote et en énergie et permet de tester l'effet d'une source d'azote ou d'énergie ou les deux à la fois sans interférence avec l'apport d'au contenu ruminal filtré.



**Figure 19** : Courbes d'épuisement des différents essais.

Les courbes montrent qu'au bout de 4-5 heures, le plateau de la production de gaz est atteint, donc les sources d'énergie et d'azote résiduels ont été bien épuisées par les microorganismes du rumen avec une production de gaz estimée à (15,9 ml). Ces résultats sont en accord avec ceux de Cône et *al.*, (2009), qui ont obtenu un volume de gaz de (15 ml) au bout de 5 heures d'épuisement en présence des sources d'énergie (figure 19).

La forte production de gaz (15,9 ml) est liée à la richesse des aliments en amidon (la couleur de l'inoculum est jaunâtre), qui présentent une teneur élevée en énergie (99%) comparée avec ceux riches en fibre (herbe, foin, paille de couleur verdâtre) ayant une faible teneur en énergie dont la faible production de gaz (1,5 ml).

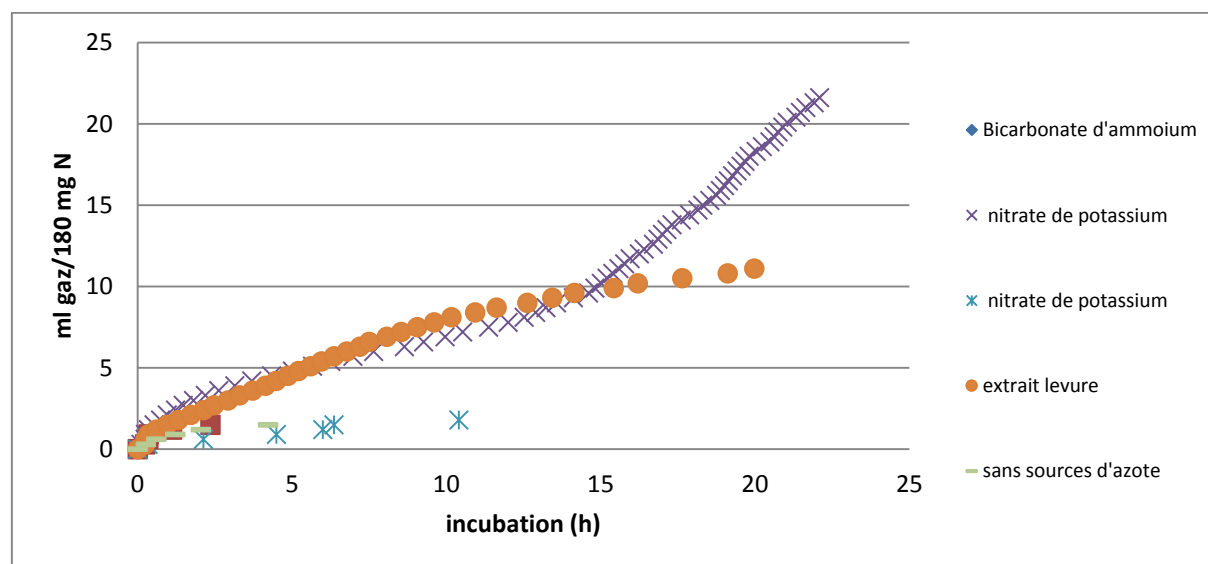
La durée de chaque essai avec leur volume minimal et maximal de production de gaz sont représentés dans le tableau 12.

**Tableau 12** :Tableau récapitulatif des durées d'épuisement et des productions minimales et maximales de gaz des différents essais.

Essais	Date	Durée d'incubation (h)	Volume minimal de gaz (ml)	Volume maximal de gaz (ml)
1	06/04/2016	5	2,4	5,4
2	12/04/2016	6	3,6	15,9
3	26/04/2016	7	0,6	1,5
4	04/05/2016	5	0,3	1,8
5	16/05 /2016	6	0,3	1,5
6	24/05/2016	6	0,6	1,5

#### 4. Les sources d'azote comme source d'énergie

Après la phase d'épuisement, on rajoute les sources d'azotes alternatives. Dans cet essai, nous avons répondu à la question :est-ce que les microorganismes du rumen peuvent utiliser les sources d'azote alternatives comme source d'énergie ?



**Figure 20**: Courbes d'utilisation des sources d'azote comme sources d'énergie.

Le glutamate de sodium est le plus rapidement fermenté par le microbiote ruminal qui se caractérise par un temps de latence très court (0,1 h), suivi par l'extrait de levure et le  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (0,24 h), puis le  $\text{KNO}_3$  (0,33 h) (Tableau 13).

**Tableau 13:**Caractéristiques cinétique de l'utilisation des sources d'azote comme source d'énergie.

Sources d'azote	Pente	Temps de latence (h)	Volume max de gaz (ml)
<b>Bicarbonate d'ammonium (<math>\text{NH}_4\text{HCO}_3</math>)</b>	Faible	0,24	1,5
<b>Glutamate de sodium (Na – glutamate)</b>	Forte, puis très forte à partir de 12 h d'incubation	0,1	21,6
<b>Nitrate de potassium (<math>\text{KNO}_3</math>)</b>	Faible	0,33	1,8
<b>Extrait levure</b>	Forte	0,24	11,1
<b>Sans sources d'azote</b>	faible	8,06	1,5

L'addition du glutamate de sodium au jus ruminal donne une forte production de gaz estimée à (21,6 h), il est suivi de l'extrait de levure (11,1 ml), puis (1,8 ml) et (1,5 ml) pour  $\text{KNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  respectivement (figure 20).

Les pH mesurés après 48 h d'incubation des sources d'azote alternatives avec l'inoculum sont présentés dans le tableau 15 et varient entre (6,89) et (7,06). La valeur la plus élevée est obtenue pour l'extrait de levure et la plus basse est enregistrée pour le glutamate de sodium.

**Tableau 14:**pH initial et final du contenu fermenté de différentes sources d'azote

Sources d'azote fermentées	pHi	pH final, après 24 h incubation	$\Delta\text{pH}$
<b>Bicarbonate d'ammonium (<math>\text{NH}_4\text{HCO}_3</math>)</b>	6,8	7,04	0,24
<b>Na – glutamate</b>		6,89	0,09
<b>Nitrate de potassium (<math>\text{KNO}_3</math>)</b>		6,97	0,17
<b>Extrait levure</b>		7,06	0,26
<b>Sans source d'azote</b>		7,07	0,27

L'acidification du milieu de fermentation est essentiellement due à l'utilisation du glutamate par les microorganismes du rumen comme source d'énergie. L'alcalinisation du milieu est due à l'accumulation d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) durant la dégradation des protéines et

polypeptides car, dans le cas de l'extrait de levure, le microbiote du rumen utilise ce dernier comme source d'énergie ( $\Delta\text{pH}=0,27$ ).

L'ajout du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  et du  $\text{KNO}_3$  ont une influence négative sur le microbiote ruminal, car lorsque le  $\text{KNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  sont dissous, donnent  $\text{K}^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  respectivement, en outre ils ne fournissent pas d'ATP. Par conséquent, le microbiote du rumen ne peut pas utiliser le  $\text{KNO}_3$  et  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  comme source d'énergie.

Dans l'absence totale des sources d'azote et d'énergie, le microbiote en lyse cellulaire et la dégradation des protéines cellulaires microbiennes font augmenter le pH ( $\Delta\text{pH}=0,27$ , tableau 14).

La production de gaz est liée à la composition chimique du substrat. Lorsque qu'il s'agit des sources d'azote organiques (extrait levure ou Na-glutamate), les microorganismes du rumen utilisent ces substrats comme source d'énergie, contrairement aux sources d'azotes inorganiques ( $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) qui ne peuvent pas être utilisées comme source d'énergie et la production est alors très basse.

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

### **5.1. Effet du bicarbonate d'ammonium**

Après la phase d'épuisement on ajoute le bicarbonate d'ammonium au milieu de fermentation (taux d'inoculation 10%) comme source d'azote alternative. Le résultat de la fermentation est présenté dans la figure 20, considéré pour 5 h d'incubation seulement à cause d'une panne d'électricité à l'Université.

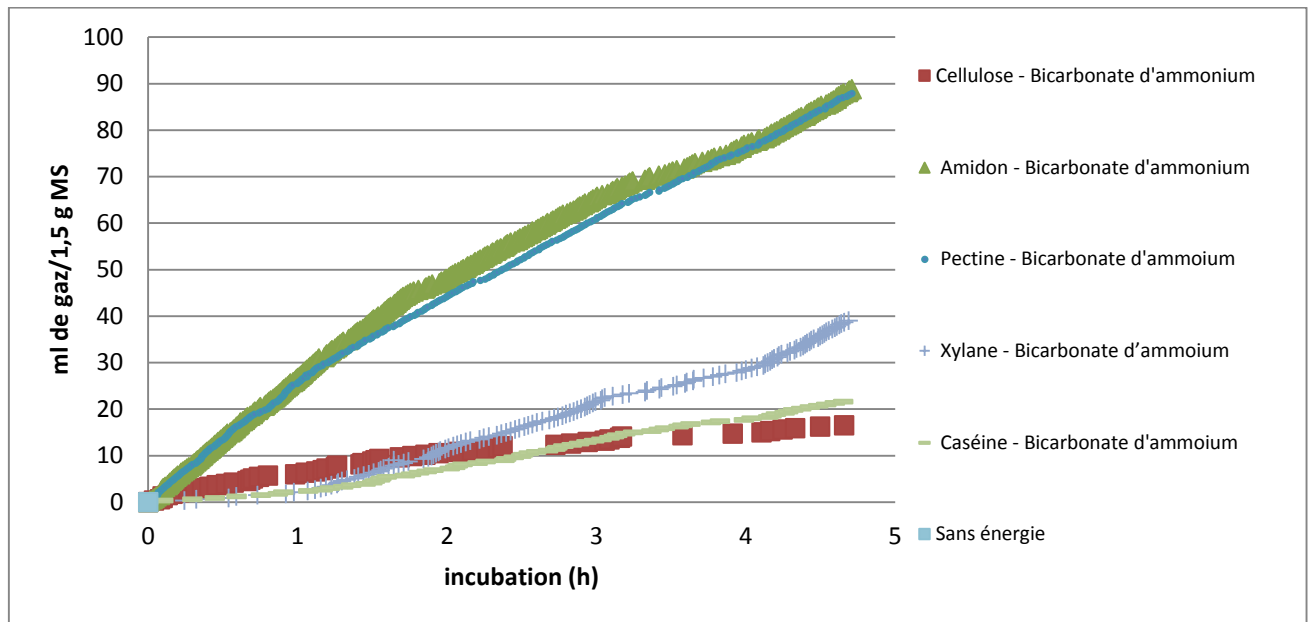


Figure 21 : Effet du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.

En utilisant le bicarbonate d'ammonium comme source d'azote, on constate que la phase de latence ne dépasse pas (0,4 h) en présence des différentes sources d'énergie.

Tableau 15: Caractéristiques cinétique de la fermentation des sources d'énergie en présence de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

Sources d'énergie+ source d'azote	Pente	Temps de latence (h)	Volume max (ml)
Cellulose - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	faible	0,4	16,50
Amidon - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	Très élevée	0,01	88,8
Pectine - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	Très élevée	0,02	87,9
Xylane - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	moyenne	0,24	39
Caséine - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	faible	0,1	21,6
Sans sources d'énergie - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	Absence	infini	0

Au bout de 5 h de fermentation, le bicarbonate d'ammonium stimule plus les amylolytiques et les pectinolytiques qui démarrent plus vite la fermentation sans temps de latence avec une forte production de gaz estimée de (86,4 et 78,9 ml respectivement) suivis par les xylanolytiques avec une vitesse plus faible et une quantité de gaz de (39 ml). Enfin, les protéolytiques et les cellulolytiques utilisent le bicarbonate d'ammonium lentement avec le temps de latence le plus long avec une très faible production de gaz (21,6 ml et 16,5 ml respectivement).

Quant au témoin, contenant du bicarbonate d'ammonium mais pas de source d'énergie, on constate qu'il n'ya aucune production de gaz, ce qui confirme que le bicarbonate d'ammonium ne peut pas être utilisé comme source d'énergie (figure 21), et que l'étape d'épuisement a éliminé toute trace d'énergie résiduelle.

Donc le bicarbonate d'ammonium n'a aucun effet négatif sur ces principaux groupes bactériens qui utilisent tous cette source d'azote selon leur capacité et aussi selon leur composition chimique. En effet, la cellulose c'est un substrat très complexe et difficilement dégradable. Alors que la pectine et l'amidon sont facilement dégradables vu leurs liaisons chimiques simples. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Nshalai *et al.* (1994) qui ont montré qu'il y a une corrélation entre la vitesse de production de gaz et la composition chimique des résidus agro-alimentaires.

Les pH finaux après fermentation en présence du bicarbonate d'ammonium comme source d'azote sont présentés dans le tableau 16.

**Tableau 16:** Valeurs du pH initial et final du contenu fermenté des sources d'énergie en présence de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ .

Sources d'azote + source d'énergie	pHi	pH final, après 48 h d'incubation	$\Delta\text{pH}$
Cellulose - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$	6,83	7,02	0,19
Amidon - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$		6,53	-0,3
Pectine - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$		6,83	0
Xylane - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$		7,11	0,28
Caséine - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$		6,94	0,11
Sans source d'énergie - $\text{NH}_4\text{HCO}_3$		6,99	0,16

Les résultats du pH montrent que les valeurs finales du pH sont pratiquement proches au pH initial en présence des différentes sources d'énergie, sauf pour l'amidon dont le pH final est plus bas que le pH de départ.



## 5.2.Effet du nitrate de potassium

Après la phase d'épuisement on ajoute le nitrate de potassium au milieu de fermentation comme source d'azote alternative. Les résultats de la fermentation sont présentés dans la figure 22.

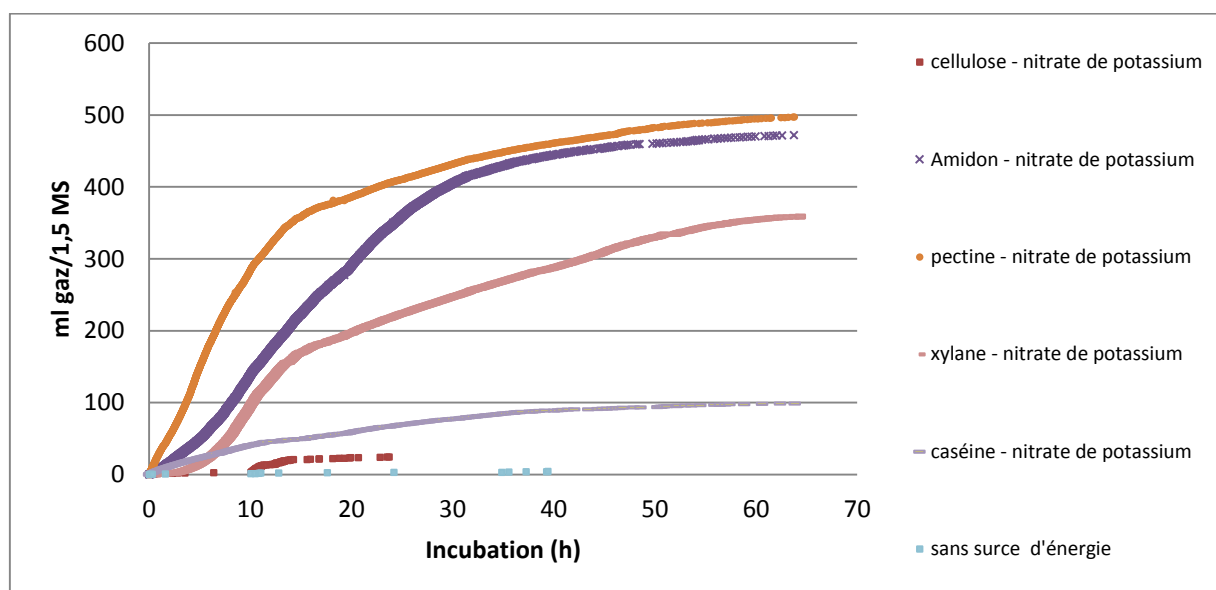


Figure 22 : Effet du  $KNO_3$  comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.

Les groupes bactériens du rumen ont une production de gaz, des vitesses, des pentes et des temps de latence différents. Le temps de latence des différents groupes bactériens varie entre (0,1h) et (0,18h), ce qui est très court. Donc ces bactéries se sont très rapidement adaptées au milieu de fermentation.

Tableau 17: Caractéristiques cinétique de la fermentation des sources d'énergie en présence de  $KNO_3$ .

Source d'énergie + source d'azote	Pente	Temps de latence (h)	Volume max (ml)
Cellulose - $KNO_3$	faible	0,08	24,6
Amidon - $KNO_3$	élevée	0,03	471,9
Pectine - $KNO_3$	Très élevée	0,01	497,4
Xylane - $KNO_3$	moyenne	0,18	363
Caséine - $KNO_3$	faible	0,02	99
Sans sources d'énergie - $KNO_3$	faible	0,1	4,5

On constate que les bactéries pectinolytiques sont les plus stimulées par le  $\text{KNO}_3$  qui ont produit un volume important de gaz. Au bout de 64 h, ces bactéries ont produit (497,4 ml/1,5 g MS) de gaz avec une forte pente qui se traduit par une vitesse de dégradation élevée. Les bactéries cellulolytiques sont les moins stimulées par le  $\text{KNO}_3$  avec la production de gaz la plus basse (24,6 ml) et la pente la plus faible (Tableau 17).

Le  $\text{KNO}_3$  stimule également les amylolytiques avec une production de gaz de (471,9 ml), avec une forte pente et un temps de latence de (0,03 h), suivis des xylanolytiques (363 ml/1,5 g MS) avec une pente moyenne et un temps de latence de (0,18 h).

La caséine produit une quantité de gaz trois fois moins de celle du xylane, quatre fois moins que l'amidon et cinq fois moins que la pectine.

Les cellulolytiques produisent la quantité la plus basse de gaz. Donc ces bactéries sont inhibées par le  $\text{KNO}_3$ , par contre les pectinolytiques, les amylolytiques, les xylanolytiques et les protéolytiques arrivent à utiliser l'azote issu du  $\text{KNO}_3$ .

L'utilisation de  $\text{KNO}_3$  comme source d'azote dans le rumen peut comporter un grave effet, celui de l'inhibition du groupe le plus important et le plus sensible: les bactéries cellulolytiques.

Les pH obtenus après fermentation sont rapportés dans le tableau 18.

**Tableau 18:** pH initial et final du contenu fermenté des différentes sources d'énergie en présence de  $\text{KNO}_3$ .

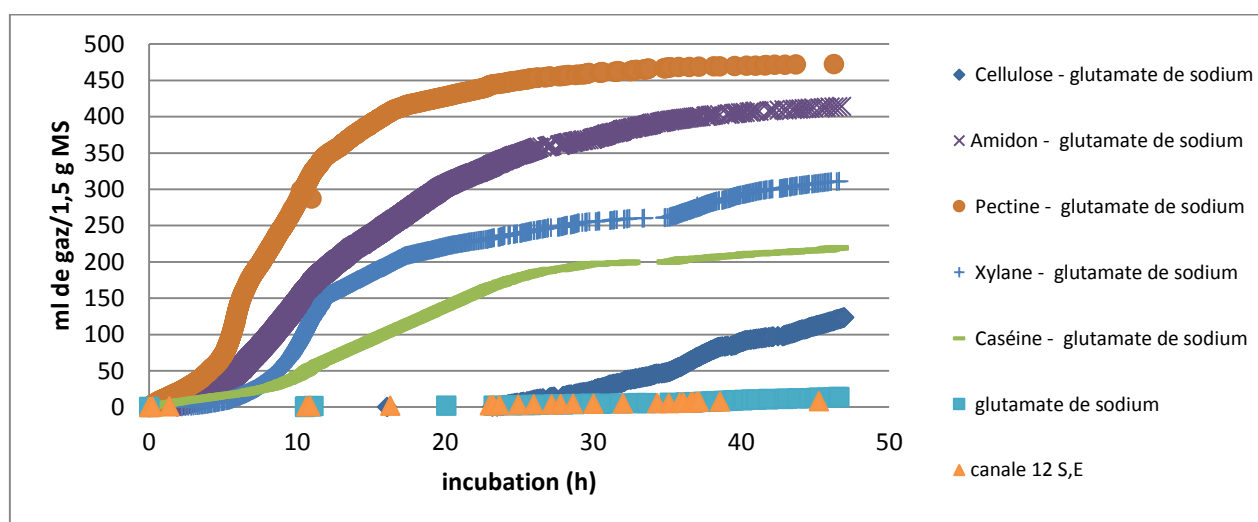
Sources d'énergie + source d'azote	pHi	pH final, après 68 h d'incubation	$\Delta\text{pH}$
Cellulose - $\text{KNO}_3$	6,81	6,91	0,1
Amidon - $\text{KNO}_3$		6,78	-0,03
Pectine - $\text{KNO}_3$		6,89	0,08
Xylane - $\text{KNO}_3$		6,85	0,04
Caséine - $\text{KNO}_3$		6,91	0,1
sans sources d'énergie - $\text{KNO}_3$		6,97	0,16

Le tableau montre que le pH final des différents essais est pratiquement proche au pH initial, à part pour le témoin contenant du KNO<sub>3</sub> mais pas d'énergie, ( $\Delta\text{pH}=0,16$ ), qui peut s'expliquer pas la lyse cellulaire.

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

### 6.1.Effet du glutamate de sodium

Après la phase d'épuisement on ajoute le glutamate de sodium au milieu de fermentation comme source d'azote alternative. Les résultats de la fermentation sont présentés dans la figure 23.



**Figure 23** :Effet du Na-glutamate comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.

L'activité métabolique des groupes bactériens du rumen se traduit par une production de gaz, des vitesses, des pentes et des temps de latence différents. Le temps de latence des différents groupes bactériens varie entre (0,03 et 16,06 h), les résultats sont résumés dans le tableau 19.

**Tableau 19:**Caractéristiques cinétiques de la fermentation des sources d'énergie en présence du glutamate de sodium.

<b>sources d'énergie + source d'azote</b>	<b>pente</b>	<b>Temps de latence (h)</b>	<b>Volume max (ml)</b>
<b>Cellulose - Na-glutamate</b>	faible	16,06	123,6
<b>Amidon - Na-glutamate</b>	Elevée	1,27	414,0
<b>Pectine - Na-glutamate</b>	Très élevée	0,03	472,2
<b>Xylane - Na-glutamate</b>	moyenne	2,2	311,1
<b>Caséine - Na-glutamate</b>	moyenne	0,04	219,3
<b>sans sources d'énergie - Na-glutamate</b>	faible	10,53	14,1

On constate que les bactéries pectinolytiques et amylolytiques sont les plus stimulées par le glutamate de sodium, elles donnent un volume important de gaz. Au bout de 68 h, ces bactéries ont produit (472,2 et 414 ml respectivement), avec une forte pente et un temps de latence de (0,03 h) et (1,27 h) et une vitesse de dégradation importante. Suivent ensuite les bactéries xylanolytiques qui sont aussi stimulées par le glutamate de sodium (vol max 311,1 ml/1,5 g MS), avec la pente la plus faible et un temps de latence de (2,2 h) (Tableau 19).

Le glutamate de sodium stimule également les bactéries protéolytiques (219,3 ml) avec une forte pente et un temps de latence de (0,04 h), alors que les bactéries cellulolytiques sont les moins stimulées par le glutamate de sodium avec une production de gaz de (123,6ml), une faible pente et un démarrage très lentement : (16,06 h).

Les valeurs du pH obtenues après fermentation sont résumées dans le tableau 20.

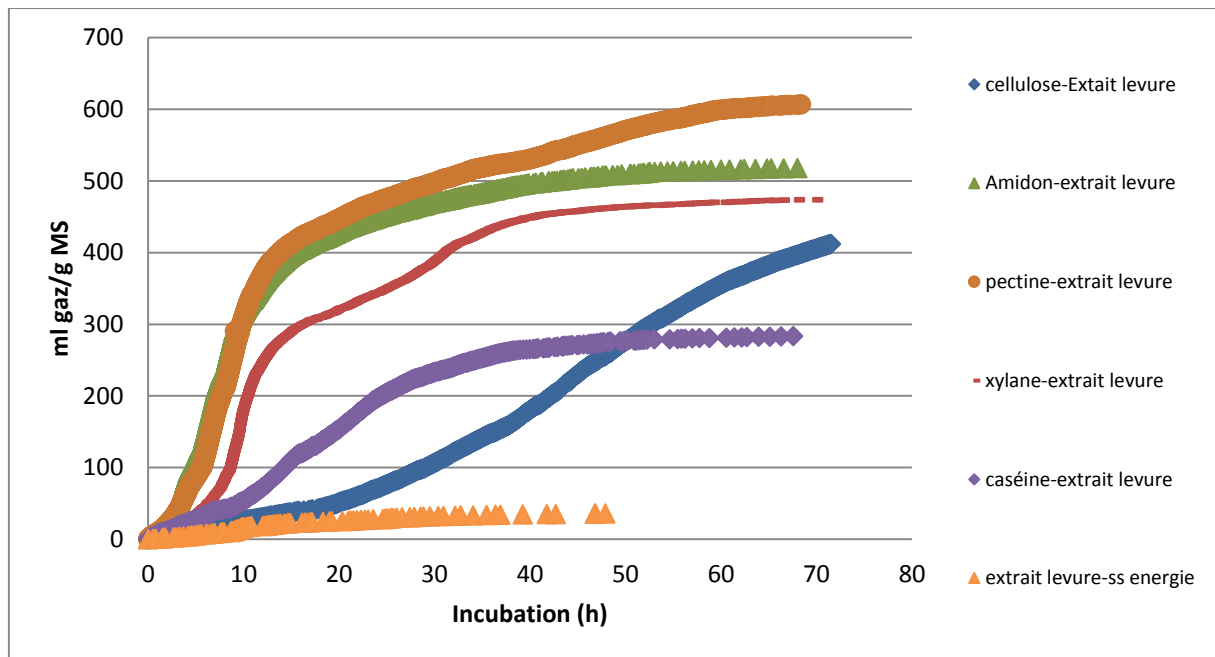
**Tableau 20** :pH initial et final du contenu fermenté de différentes sources d'énergie en présence du glutamate de sodium.

sources d'énergie + Source d'azote	pHi	pH final, après 48 h d'incubation	$\Delta$ pH
Cellulose - Na-glutamate	6,88	5,82	-1,06
Amidon - Na-glutamate		4,89	-1,99
Pectine - Na-glutamate		5,31	-1,57
Xylane -Na-glutamate		5,48	-1,4
Caséine -Na-glutamate		6,08	-0,8
Sans sources d'énergie - Na-glutamate		6,58	-0,3

Le tableau montre que le pH final des différents essais est pratiquement proche au pH initial, mais contrairement aux sources d'azote précédentes, les  $\Delta$ pH, sont négatives, indiquant qu'une acidification s'est produite, elle découle surtout du caractère acide du glutamate de sodium. Quand le glutamate de Na est désaminé, le squelette carboné comportant deux fonctions carboxyle (COO-) présentent un caractère acide.

## 6.2.Effet de l'extrait de levure

Après la phase d'épuisement on ajoutel'extrait de levure au milieu de fermentation comme source d'azote alternative. Les résultats de la fermentation sont présentés dans la figure 24.



**Figure 24** :Effet de l'extrait levure comme source d'azote sur les principaux groupes bactériens du rumen.

Les groupes bactériens du rumen ont une production de gaz, des vitesses, des pentes et des temps de latence différents. Le temps de latence des différents groupes bactériens varie entre (0,01 h) et (0,49 h), les résultats sont représentés dans le tableau 21.

**Tableau 21**:Caractéristiques cinétique de la fermentation des différentes sources d'énergie en présence de l'extrait levure.

Sources d'énergie+ source d'azote	pente	Temps de latence (h)	Volume max (ml)
Cellulose - Extrait levure	moyenne	0,03	411,9
Amidon - Extrait levure	forte	0,04	517,8
Pectine - Extrait levure	forte	0,01	606,6
Xylane - Extrait levure	moyenne	0,04	473,7
Caséine - Extrait levure	faible	0,03	283,2
sans sources d'énergie - Extrait levure	faible	0,49	36

Au bout de 72 h d'incubation, l'extrait de levure a bien stimulé les bactéries pectinolytiques et les bactéries amylolytiques. Elles sont démarrées par une vitesse élevée, un temps de latence très court (0,01 h et 0,04 respectivement) et une forte production de gaz (600 et 500 ml respectivement). Suivent ensuite les xylanolytiques avec une vitesse moins forte que, sans temps de latence et un volume de gaz de (473,7 ml/g MS). Viennent ensuite les protéolytiques avec une vitesse faible par rapport aux pectinolytiques et aux amylolytiques, un temps de latence de (0,04 h) et un volume de gaz de (283,2 ml). En effet les cellulolytiques avec un temps de latence de (0,03 h) et (411,9 ml). Selon [chikunya et al., 1996](#) ; [National Research Council, 2001](#)), lorsque les sources d'énergie sont fermentées lentement la stimulation de la croissance des microorganismes du rumen par les acides aminés et les peptides n'apparie pas. Donc quand on n'ajoute pas la source d'énergie il ya une activité métabolique mais assez faible.

L'extrait de levure est utilisé par tous les groupes bactériens du rumen mais de façon différentes selon le type de substrat énergétique, il ya une évidence que les acides aminés et aussi des peptides stimule la croissance des microorganismes du rumen lorsque les sources d'énergie présent sont rapidement dégradable ([National Research Council, 2001](#)).

Les pH obtenus après fermentation des sources d'énergie en présence de l'extrait de levure sont résumé dans le tableau 22.

**Tableau 22:** Valeurs du pH initial et final du contenu fermenté des différentes sources d'énergie en présence de l'extrait levure.

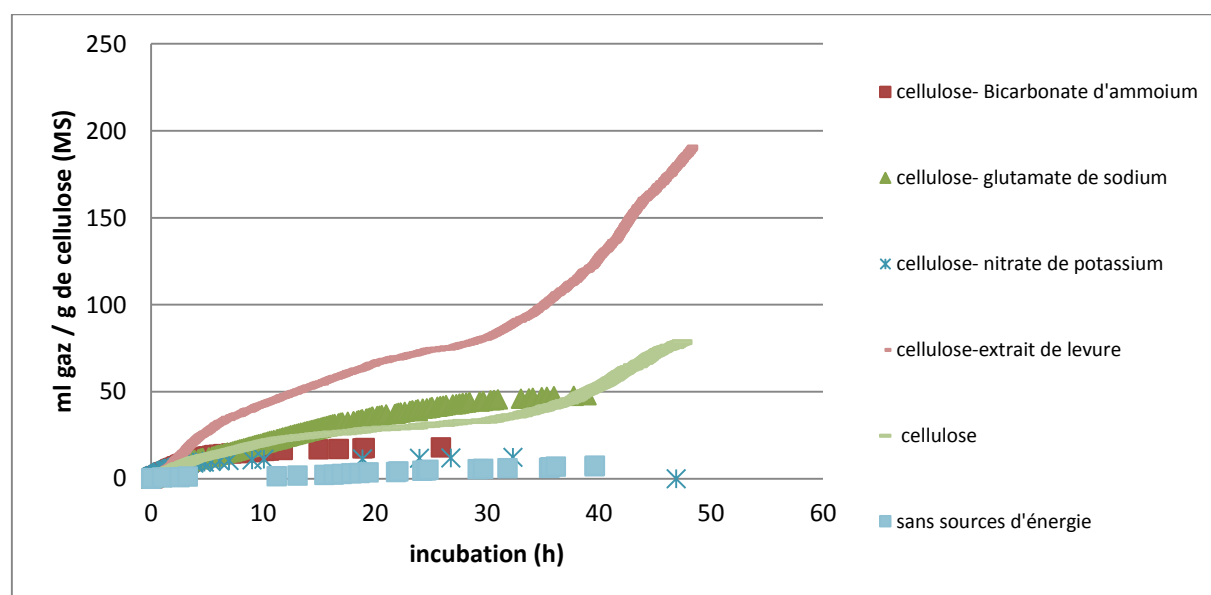
Sources d'énergie + source d'azote	pHi	pH final, après 72 h d'incubation	$\Delta$ pH
Cellulose - Extrait levure	6,69	5,83	-0,86
Amidon - Extrait levure		5,25	-1,44
Pectine - Extrait levure		5,69	-1
Xylane - Extrait levure		5,84	-0,85
Caséine - Extrait levure		6,71	0,02
Sans source énergie - Extrait levure		6,62	-0,07

Le tableau montre que le pH final des différents essais est pratiquement proche au pH initial, mais les différences de pH ( $\Delta$ pH) sont négatives, indiquant qu'une acidification s'est

produite. Cette acidification provient de la désamination des acides aminés présents dans l'extrait de levure qui donnent l'ammoniac et des squelettes carbonés dont des acides gras volatils. Selon (Chikunya *et al.*, 1996 ; National Research Council, 2001), lorsque des peptides sont ajoutés en présence des fibres, soit rapidement dégradables comme l'amidon, la pectine et l'hémicellulose ou lentement dégradables comme la cellulose, la croissance microbienne est améliorée, donc la fermentation de ces sources d'énergie au lieu.

### 7. Effet des sources d'azote sur la dégradation de la cellulose

Un essai à part a été réservé au groupe des cellulolytiques vu son importance dans la dégradation des aliments chez les ruminants (ici des bovins). Après la phase d'épuisement on a ajouté les sources d'azote organiques et les sources d'azote inorganiques au milieu de fermentation. Les résultats de la fermentation sont représentés dans la figure 25.



**Figure 25 :** Dégradation de la cellulose en présence des différentes sources d'azote.

Les courbes de la fermentation de la cellulose en présence des différentes sources d'azote montrent qu'au bout de 35h l'extrait levure donne une forte production de gaz (190,5 ml), suivi du glutamate (50,7 ml), puis du  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (24,9ml) et enfin du  $\text{KNO}_3$  (12,3 ml) Tableau 23.



**Tableau 23:**Caractéristiques cinétique de la dégradation de cellulose en présence desdifférentes sources d'azote.

Source d'énergie + sources d'azote	penne	Temps de latence (h)	Volume max (ml)
Cellulose - NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	élevée	0,1	24,9
Cellulose - Na-glutamate	moyenne	0,05	50,7
Cellulose - KNO <sub>3</sub>	faible	0,03	12,3
Cellulose -Extrait levure	très élevée	0,02	190,5
Cellulose	moyenne	0,01	78,6
Sans source d'énergie-sans sources d'azote	faible	0,05	7,5

La forte production de gaz desbactéries cellulolytiques est liée à leur stimulation par l'extrait levure et le NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. En effet, le KNO<sub>3</sub> inhibe l'activité cellulolytiques, car dans le milieusans source d'azote, la production de gaz est de (78,6 ml) beaucoup plus élevée par rapport à celle produite en présence de KNO<sub>3</sub>qui n'est que de (12,3 ml).

Les pH obtenus après fermentation sont résumé dans le tableau 24.

**Tableau 24:**pH initial et final du contenu fermenté de celluloseen présences des différentes sources d'azote.

source d'énergie + sources d'azote	pHi	pH final, après 72 h d'incubation	ΔpH
Cellulose-NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	6,74	6,98	0,24
Cellulose-Na-glutamate		6,89	0,15
Cellulose-KNO <sub>3</sub>		6,96	0,22
Cellulose-Extrait levure		6,69	-0,05
Cellulose		6,73	-0,01
Sans source d'énergie-sans sources d'azote		6,9	0,16

Le tableau montre que le pH final des différents essais est pratiquement proche au pH initial. Les pH mesurés après 48 h d'incubation des sources d'azote alternatives avec l'inoculum en présence de cellulose montrent des valeurs comprises centre (6,69) et (6,98). La valeur la plus élevée est obtenue pour NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>(6,98) et la plus basse est enregistrée pour l'extrait levure (6,69).

Les résultats obtenus de la production de gaz après la fermentation de tous les essais sont récapitulés dans le tableau 25.

**Tableau 25 :** Tableau récapitulatif des volumes maximum de gaz produits en présence des sources d'énergie et des sources d'azote.

Les sources d'énergie et les sources d'azote (222 mg N/litre)			Sources d'énergie (10 g/litre)				
			Cellulose	Amidon	Pectine	xylane	caséine
Sources d'azote	Inorganique	Bicarbonate d'ammonium (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ), après 5h d'incubation	16,5	88,8	87,9	39	21,6
		Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> ), après 68h d'incubation	24,6	471,9	497,4	363	99
	Organique	Glutamate de sodium (Na-glutamate), après 48 h d'incubation	123,6	414	452,1	311,1	219,3
		Extrait de levure, après 72 h d'incubation	411,9	517,8	606,6	473,7	283,2

A partir des résultats obtenus de la production de gaz en présence des sources d'azote organiques et inorganiques, on constate que les bactéries cellulolytiques sont fortement stimulées par l'extrait de levure avec une forte production estimée de (411,9 ml) de gaz, par contre elles sont faiblement stimulées par le bicarbonate d'ammonium avec une production de gaz de (16,5 ml).

Un résultat proche est enregistré pour les xylanolytiques en présence de l'extrait de levure avec une production de gaz maximale estimée de (473,7ml) et elle stimule faiblement par le bicarbonate d'ammonium avec un volume de gaz produit estimé de 39ml ils ont aussi enregistré une production intermédiaire avec le nitrate de potassium et glutamate de sodium estimé de 363 et (311,1 ml) respectivement.

Un résultat supérieur à ceux enregistrés pour les bactéries cellulolytiques et xylanolytiques est obtenu pour les bactéries amylolytiques. La production maximale de gaz est de (517,8 ml) en présence de l'extrait de levure et la production minimale est de (88,8 ml) en présence du bicarbonate.

Les pectinolytiques sont les plus stimulées par l'extrait de levure par rapport aux autres groupes bactériens avec une production de gaz estimée de (606,6 ml). Ces bactéries

sont faiblement stimulées par le bicarbonate d'ammonium avec une production de gaz estimée de (87,9 ml). Une production intermédiaire est enregistrée en présence du nitrate de potassium et du glutamate de sodium estimée de (497,4) et (452,1 ml) respectivement.

Et enfin, les valeurs les plus basses en présence l'extrait de levure, sont obtenues pour les bactéries protéolytiques avec une production de gaz maximale estimée de (283,3 ml). Une très faible production de gaz est enregistrée en présence du bicarbonate d'ammonium avec une valeur de (21,10 ml).

Les temps de latence des différentes fermentations des sources d'énergie avec les sources d'azote sont récapitulés dans le tableau suivant.

**Tableau 26:** Tableau récapitulatif des temps de latence mis par les différents groupes bactériens du rumen pour fermenter les différentes sources d'énergie en présence des différentes sources d'azote.

Les sources d'énergie et les sources d'azote (222 mg N/litre)			Sources d'énergie (10 g/litre)				
			Cellulose	Amidon	Pectine	xylane	Caséine
Sources d'azote	Inorganique	Bicarbonate d'ammonium (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ), après 5 h d'incubation	0,4 h	0,01 h	0,02 h	0,24 h	0,1 h
		Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> ), après 68 h d'incubation	0,08 h	0,03 h	0,01 h	0,18 h	0,02 h
	Organique	Glutamate de sodium (Na-glutamate), après 48 h d'incubation	16,06 h	1,27 h	0,01 h	2,20 h	0,04 h
		Extrait de levure, après 72 h d'incubation	0,03 h	0,04 h	0,01 h	0,04 h	0,03 h

Selon les résultats obtenus, les cellulolytiques ont le temps de latence le plus long estimé de (16,16 h) avec le glutamate de sodium, et un temps de latence très court avec l'extrait de levure estimé de (0,03h) avec des temps intermédiaires avec le nitrate de potassium et la bicarbonate d'ammonium estimés de (0,08) et (0,4 h) respectivement.

Les amylolytiques sont stimulées par le glutamate de sodium après un temps de latence plus au moins long estimée de (1,27 h) et un temps de latence plus court enregistré avec le bicarbonate d'ammonium (0,01h). Des temps de latence intermédiaires sont

enregistrés en présence du nitrate de potassium et de l'extrait de levure estimés de (0,03 h) et (0,04 h).

Des résultats proches sont enregistrés pour les xylanolytiques avec un temps de latence estimé de 2,2 h en présence du glutamate de sodium et un temps plus court estimé de (0,04h) en présence de l'extrait de levure. Des temps de latence intermédiaire sont enregistrés avec les sources d'azote inorganiques mesuré entre (0,18 h) et (0,24h).

Des temps très court sont ainsi enregistrés pour les protéolytiques en présence des différentes sources d'azote (0,02 h) et (0,1 h).

Un temps de latence très court est enregistré chez les bactéries pectinolytiques en présence des sources d'azote organique (0,01h) ainsi qu'en présence des sources d'azote inorganique avec (0,02 h).

Les pentes des courbes de production de gaz en présence des sources d'énergie combiné avec les sources d'azote sont représentées dans le tableau suivant.

**Tableau 27:** Tableau récapitulatif de la pente de production de gaz en présences des sources d'énergie et des sources d'azote.

Les sources d'énergie et les sources d'azote (222 mg N/litre)			Sources d'énergie (222 mg N/litre)				
			Cellulose	Amidon	Pectine	Xylane	caséine
Sources d'azote	Inorganique	Bicarbonate d'ammonium (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ), après 5 h d'incubation	Faible	Forte	Forte	Moyenne	Faible
		Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> ), après 68h d'incubation	Faible	Forte	Forte	Moyenne	Faible
	Organique	Glutamate de sodium (Na-glutamate), après 48 h d'incubation	Faible	Forte	Forte	Moyenne	Moyenne
		Extrait de levure, après 72 h d'incubation	Moyenne	Forte	Forte	Moyenne	Faible

D'après les résultats obtenus, les bactéries amylolytiques et pectinolytiques possèdent la forte pente avec toutes les sources d'azote organiques et inorganiques. Les bactéries xylanolytiques possède une pente moyenne avec toutes les sources azote.

Contrairement aux bactéries cellulolytiques et protéolytiques, on constate une pente faible avec toutes les sources d'azote à l'exception de l'extrait de levure et le glutamate, respectivement, où on observe une pente moins faible que les premiers cas.

Les résultats finaux des pH en présence des sources d'énergie et les sources d'azote sont représentés dans le tableau 28.

**Tableau 28 :** Tableau récapitulatif des pH finaux en présence des sources d'énergie et des sources d'azote.

Les sources d'énergie et les sources d'azote (222 mg N/litre)			Sources d'énergie(10g /litre MS)				
			Cellulose	Amidon	Pectine	xylane	Caséine
Sources d'azote	Inorganique	Bicarbonate d'ammonium (NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> ), après 5 h d'incubation	7,02	6,53	6,83	7,11	6,94
		Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> ), après 68h d'incubation	6,91	6,78	6,89	6,85	6,91
	Organique	Glutamate de sodium (Na-glutamate), après 48 h d'incubation	5,82	4,89	5,31	5,48	6,08
		Extrait de levure, après 72 h d'incubation	5,83	5,25	5,69	5,84	6,71

Selon Les résultats obtenus, les bactéries cellulolytiques enregistrent avec le bicarbonate d'ammonium un pH maximal estimé de (7,02). Le pH minimal est enregistré avec le glutamate de sodium (5,82).

Des résultats proches sont enregistrés pour les xylanolytiques en présence du bicarbonate d'ammonium avec un pH maximal de (7,11). Le pH minimal est enregistré avec le glutamate de sodium avec une valeur de(5,48).

Les pectinolytiques et les protéolytiques possèdent des valeurs de pH très proches à l'exception du glutamate de sodium où on a enregistré un pH un peu plus bas pour les pectinolytiques.

Les valeurs les plus basses sont enregistrées pour les bactéries amylolytiques avec un pH maximal en présence du nitrate de potassium (6,78). Le pH minimal est enregistré en présence du glutamate de sodium (4,89).

# *CONCLUSION*

**Conclusion :**

Dans ce travail nous avons étudié l'effet de différentes sources d'azote organique (glutamate de sodium, extrait levure), et inorganique (nitrate de potassium, bicarbonate d'ammonium), sur l'activité métabolique des principaux groupes bactériens fonctionnel du rumen de bovin. En effet la source d'azote est l'élément le plus couteux dans la nutrition des ruminants. Le but du travail est de savoir si des sources d'azote alternatives peu couteuses peuvent stimuler l'activité métabolique des microorganismes du rumen. Pour cela nous avons procédé à des fermentations *in vitro* du liquide ruminal prélevé de bovins, présentés à l'abattage, à régime alimentaire libre en utilisant comme source d'énergie la cellulose, l'amidon, la pectine, le xylane et la caséine en des quatre sources d'azote. La première étape consiste à effectuer un épuisement de l'azote et de l'énergie résiduels de l'inoculum. L'incubation se fait pendant 5 à 6 h en suivant la production de gaz. La deuxième étape consiste à réaliser des fermentations en utilisant les différentes sources d'énergie avec chacune des différentes sources d'azote. Le suivi de la fermentation est effectué par la mesure volumétrique de la production de gaz. Les résultats montrent que 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. Les groupes bactériens qui dégradent la cellulose, obtiennent plus lentement leur énergie à cause des difficultés de la dégradation de la cellulose 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 les groupes cellulolytiques et protéolytiques.

*RÉFÉRENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*



**AOAC. 1990.** Official Methodes of Analysis, 15<sup>ème</sup>édition. Association of Official Analytical Chemists, AOAC, Arlington, VA.

**Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1986.** Biologie Moléculaire de la Cellule. 4<sup>ème</sup> éd. Paris: Flammarion, 1986, pp : 1102.

**Allison H., Leek D.A., Swenson S., Reece S. 2007.** Rumen Microbiology and Fermentation. Animal Nutrition Handbook, 3, pp: 54.

**Amokrane S. 2010.** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale. Département de Biochimie et de Microbiologie. Université des Frères Mentouri Constantine.

**Bach A., Calsamiglia S., et Stern M. D. 2005.** Nitrogen Metabolism in the Rumen, *J. Dairy Sci.* 88:Ed. Suppl., pp: 9.

**Belbis Guillame Hervé. 2007.** Flore du rumen : origine, composition, évaluation, conséquences physiopathologique. Alfort : Faculté de Médecine de Creteil, pp : 13.

**Berg J.M., Tymoczko J.L., and Stryer L., Gatto G.J. Biochimie. 2013.** 7<sup>ème</sup> Ed. Lavis (Italie): Médecine Science publications, pp: 674.

**Bestle J M. et Jouany J P. 1990.** La biomasse pariétale des fourrages et sa valorisation par les herbivores. INRA. Pro. Anim, 3 (1), pp: 39.

**Bonnefont C. 2008.** Le potentiel Redox et le milieu ruminal. Ecole Nationale Vétérinaire, Telouse, pp : 24.

**Branger A., Richer M.M., Roustel S. 2007.** Microbiologie et Alimentation. Educ. agri., pp : 78.

**Bruger H. 1983.** Biochimie du rumen : Aspect physiologique. Bull. GTV Group. Tech. Vétérinaire doss.Tech.Veterinaire.

**Callaway E.S., Martin S.A. 1997.** Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* Culture on Ruminant Bacteria that Utilize Lactate and Digest Cellulose. *J.Dairy Science*, 80(9), pp : 235.

**Chambon F. 2011.** Transformation de la cellulose par catalyse hétérogène. Lyon 1: Université Claude Bernard.

**Chen M., Wolin M.J. 1979.** Effect of monensin and losalocid –sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, pp: 72.

**Chentli A. 2015.** Valorisation nutritionnelle du *Cactus edacacia spp.* Dans l'alimentation des ruminants. Effet de haute teneur en tannin et oxalate sur l'activité du microbiote ruminale. *Microbiologie*, Thèse de Doctorat, Université des Frères Mentouri Constantine, pp 34.

**Clos Jean. 2008.** Les fonctions de nutrition chez les animaux : Ellipses, pp : 376.

**Cone J.W., Rodrigues M.A.M., Guedes C.M., Blok M.C. 2009.** Comparaison of protein fermentation characteristics in rumen fluid determined with the gaz production technique and the nylon bag technique. *Elsevier Anim. Feed Sci. Technol* 153, pp : 34.

**Dakhmouche K. 2011.** Effets de l'ajout des résidus de tomate sur la microflore ruminale de dromadaire et sur sa composante bactérienne. *Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*, Université des Frères Mentouri Constantine, pp: 30.

**Dusart C. 2014.** La digestion ruminale : Mise en place d'un modèle d'étude in vitro à long terme en cultures batch. Toulouse : Université Paul-Sabatier.

**Fonty G., Forano E., Gaudet G., Komisarczuk S. et Gouet Ph. 1988.** The rumen bacteria. The rumen microbial ecosystem. *Elsevier*. London and New York. pp: 21-76.

**Fonty G., Jouany J.P., Forano E., Gouet P. 1994.** L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: *Nutrition des animaux domestiques*. Paris Edition INRA: Jouany J.P, pp : 330.

**Fonty G. et Forano E. 1999.** Ecologie de la dégradation et de la fermentation des polyosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahier Agriculture*, 8 (1), pp: 21.

**Fonty G., Chaucheyras-Durand F. 2007.** Les écosystèmes digestifs. Eds, Technique & Documentation, Paris, pp: 79.

**Graham L .P., Malcolm J.L. 1979.** Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. *Journal of General Microbiology*, 110, pp: 21.

**Grenet E., Besle J. 1991.** Microbes and fibre degradation, in Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion. Edition Quac, pp 107-129. Academic press, pp : 90.

**Himmel M.E. 2009.** Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy .Wiley-Black well.

**Hungate R. E. 1966.** The rumen bacteria. *In*: The rumen and its microbes. Academic press : Hungate, pp: 90.

**Jarrige R., Grenet E., Demarquilly C CC., Besle. 1995.** Les constituants de l'appareil végétatif des plants fourragères, In : Nutrition des ruminants Domestiques : Ingestion et Digestion. INRA Edition, pp : 25-81.

**Jean-Blain, C. 2002.** Introduction on the nutrition of domestic animals .Ed. Tec & Doc.

**Jouany J.P. 1978.** Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen : leur dynamique, leur role dans la digestion et leur intérêt pour le rumen. Th.D'Etat. Université Clermont.

**Jouany J.P. 1994.** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation, INRA Productions animales, <hal-00896087>, pp.207-225.

**Koike S., P., Kobayashi Y., Tanaka K. 2003.** Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *J.Dairy Sci.* 86, pp: 1429-1435.

**Kraig Roozeboom ., Dale Blasi et Dave Mengel. 2011.** Nitrate Toxicity. Kansas State University Agricultural Experiment Station and, Department of Agriculture Cooperating, Gary, pp: 1.

**Moletta René. 2008.** La méthanisation. Tec. & Doc: La Voisier, pp : 26.

**Morrison M. 2000.** The Microbial Ecology and Physiology of Ruminant Nitrogen Metabolism. In: Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. Department of Animal Science, School of Biological Sciences and Center for Biotechnology. USA : University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, 2000, pp : 103.

**Murray N. 2008.** Biologie végétale, Structure, Fonctionnement. Ecologie et Biotechnologie. Pearson, Paris, pp: 36-40.

**National Research Council .2001.** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academies Press (U.S.).

**Nocek J.E et Tamminga.1991.**Site of digestion of starch in the gastro-intestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition, *J. Dairy Sel* 74, pp : 3598-3629.

**Nshalai I.V., Siaw D.E.K.A. and Osuji P.O. 1994.** The relationship between gas production and chemical composition of 23 browses of the genus *Sesbania*. *J. Sic Food and Agri*, 65 :13-20.

**Offner A., Sauvant D., other. 2006.** Thermodynamic modeling of ruminal fermentations. *AnimRes*, vol:55, pp: 343-365.

**Patterson J.A. 1992.** Rumen microbiologie. In : Lederberg J. Encyclopedia of Microbiology, Academic Press, Vol 3M-R, pp.458-470.

**Raven P.H., Evert R.F. and Eichhorn S.E. 2007.** Biologie végétale. (Eds), De Boeck, Paris, pp. 53-58.

**Ransom-Jones Emma ., David L. Jones ., Alan J. McMcCarthy ., 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., et Bajon C. 2006.**Le monde des fibres. Belin, Paris, pp : 17-26, 27-36, 323-334.

**Sahli B., Latrous N. 2015.** Etude de la fermentation in vitro des résidus de tomate et l'orange et deux plantes fibreuses (Carde et Chrysanthème), par la flore ruminale bovine, dans différentes sources d'azote. Mémoire de Master. Université des frères Mentouri Constantine, pp : 32.

**Sauvant D. et Van Milgen J.1995.** Les conséquences de la dynamique de la digestion des aliments sur le métabolisme ruminal et les performances animales. *INRA Production. Anim.*, 8 (5), pp : 353-36.

**Thivend P., Fonty G., Jouany J.P., Durand M., Gouet P. 1985.** Le fermenteur rumen. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 25 (4B), pp : 733-743.

**Tiret L. 2001.** Physiologie de la digestion. Polycopié. Alfort : Ecole Nationale Vétérinaire. Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique, pp : 69.

**Wallace R.J. 2001.** Rumen proteolysis and its control. In: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA Editions, 1991, pp 131-150.

**Yaakoub F. 2006.** Evaluation "*in vitro*" de la dégradation des principaux fourrages des zones arides. Département Vétérinaire. Batna : Université El-hadj Lakhdar, pp : 80-120.

**Yang John A Chengjian., Rooke Irene Cabeza and Robert J.Wallace.2016.** Nitrate and Inhibition of Ruminant Methanogenesis: Microbial Ecology, Obstacles, and Opportunities for Lowering Methane Emissions from Ruminant Livestock. February 2016, 7 | Article 132 pp:2.

**Zened A. 2011.** Particularité du microbiote et son activité lors de la déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10. Université de Toulouse Institut National Polytechnique, pp 41-42.

#### **Site électronique**

**FAO. 2012.** Evolution mondiale de la consommation de viande, 10 mars 2016, 3trois3.com, <http://www.fao.org/>.

**Giger-Reverdin., G.Bertin., J. Tessier., D. Sauvant.2004.** Effet d'une levure (*Saccharomyces cerevisiae* CBS 493.94) sur le métabolisme ruminal de la chèvre laitière, 30 mai 2016, Textes en ligne 11<sup>e</sup> journées 3R – 2004 –Alimentation, <http://www.journees3r.fr/spip.php?article508>.

## Résumé

Notre travail a porté sur l'étude de l'effet de différentes sources d'azote organique, et inorganique, sur l'activité métabolique des principaux groupes bactériens fonctionnels du rumen de bovin. Pour cela nous avons procédé à des fermentations *in vitro* utilisant le liquide ruminal prélevé de bovins, comme inoculum, en utilisant différentes sources d'énergie en présence de différentes sources d'azote. La première étape consiste à épuiser l'azote et de l'énergie résiduels apportés l'inoculum. L'incubation se fait pendant **5 à 6 h** en suivant la production de gaz. Dans la deuxième étape des fermentations ont été conduites en utilisant les différentes sources d'énergie avec chacune des différentes sources d'azote. Le suivi de la fermentation est effectué par la mesure volumétrique de la production de gaz. Les résultats montrent que les groupes bactériens du rumen qui dégradent rapidement les polymères végétaux tels que la pectine (**lag 0,01h**), l'amidon (**lag 0,01h**) et l'hémicellulose (**lag 0,04h**) sont capables d'utiliser les quatre source d'azote alors que les groupes bactériens qui dégradent la cellulose, obtiennent plus lentement leur énergie (**lag 16,06h**) et sont moins stimulés par ces mêmes 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 (**606,6 ml**, chez les pectinolytiques) que le glutamate de sodium (**452,1ml**, chez les pectinolytiques), et le bicarbonate d'ammonium (**350,80 ml**, chez les pectinolytiques) plus que le nitrate de potassium (**497,4 ml**, chez les pectinolytiques), qui présente même une inhibition de l'activité métabolique en particulier chez les groupes cellulolytiques (**24,6 ml**) et protéolytiques (**99 ml**). La variation du pH traduit entre **5,25** et **7,11**, il diminue jusqu'à **5,25** lorsqu'on ajoute l'extrait de levure en ruminants riche en amylolytiques et augmente jusqu'à **7,11**. Lorsqu'on ajoute le bicarbonate d'ammonium en ruminants riche en xylanolytiques. En conclusion, les sources d'azote organiques et inorganiques alternatives peuvent être utilisées avec des rations pour les ruminants composées d'aliments fibreux pour les premières et faiblement fibreuses pour les secondes.

**Mots clés :** fermentation *in vitro*, extrait de levure, glutamate de sodium, polymères végétaux.

## الملخص :

وقد ركز عملنا على دراسة تأثير مصادر مختلفة من النيتروجين العضوي و الغير العضوي، على النشاط الأيضي للمجموعات الوظيفية الرئيسية من البكتريا المستخلصة من الكرش البقري. لهذا أجرينا عملية التخمير في المختبر باستخدام السائل الكرشى المأخوذ من الماشية، باعتبارها العينة، و ذلك باستخدام مصادر الطاقة المختلفة في وجود مصادر النيتروجين المختلفة. الخطوة الأولى هي إنهاء النيتروجين و الطاقة المتبقية في العينة. تتم الحضانة لمدة 5 إلى 6 ساعات مع متابعة إنتاج الغاز. الخطوة الثانية من عملية التخمير تتم باستخدام مصادر الطاقة المختلفة مع كل مصادر النيتروجين المختلفة. مراقبة عملية التخمير تتم عن طريق القياس الحجمي للإنتاج الغازي. أظهرت النتائج أن المجموعات البكتيرية المستخلصة من الكرش هي التي تحلل بسرعة متعدد الوحدات النباتية مثل البكتين في زمن قدره ( 0.01 ساعة)، و النشاء في زمن قدره (0.01 ساعة) و الهيموسيليلوز في زمن قدره (0.04 ساعة) قادرة على استخدام المصادر الأربعة النيتروجينية بينما المجموعات البكتيرية هي التي تحلل السليلوز، تحصل على الطاقة بصفة بطيئة في زمن قدره (16.06 ساعة)، و أقل تحفيزا من هذه المصادر النيتروجينية. تحفز مصادر النيتروجين العضوي المزيد من النشاط الأيضي للكائنات الدقيقة للسائل الكرشى من المصادر غير العضوية. حيث مستخلص الخميرة يحفز البكتريا البكتينوليتكية بإنتاج كمية من الغاز قدرها 606.6 مل، كما أن غلوتامات الصوديوم يحفز البكتريا البكتينولكتية أيضا بإنتاج كمية من الغاز قدرها 145.2 مل و هذه المجموعة تحفز أيضا من طرف البيكاربونات الأمونيوم مع إنتاج كمية من الغاز قدرها 350.80 مل، و مع نترات البوتاسيوم 497.4 مل، في وجود هذا الأخير الذي يقوم بتطبيق النشاط الأيضي و خاصة مع المجموعتين السليلوزية ( 24.6 مل) و البروتينية ( 99 مل ). نتائج درجة الحموضة سجلت بين القيمتين 5.25 و 7.11. سجلت انخفاضا إلى 5.25 عند إضافة مستخلص الخميرة، و ارتفاعا إلى 7.11 عند إضافة بيكاربونات الأمونيوم عند المجترات الغنية بالبكتريا الهادمة للاكز لان. في الختام يمكن استخدام مصادر بديلة النيتروجين العضوي و غير العضوي مع حصص للحيوانات المجترة التي تتكون من المواد الغذائية الليلية مع مصادر بديلة النيتروجين العضوي و ثانيا ليفية ضعيفة مع مصادر بديلة النيتروجين الغير العضوي.

**الكلمات المفتاحية :** التخمير في المختبر، مستخلص الخميرة، غلوتامات الصوديوم، متعدد الوحدات النباتية

## **Abstract:**

Our work has focused on the study of the effect of different sources of organic and inorganic nitrogen on the metabolic activity of the main functional groups of bacteria from bovine rumen. We performed several *in vitro* fermentations using rumen fluid taken from cattle, as inoculum, using various energy sources in the presence of different nitrogen sources. The first step is to exhaust residual nitrogen and energy in the inoculum. Anaerobic incubation lasted from 5 to 6 hours following gas production. The second step of the fermentations was carried out using different energy sources each with different nitrogen sources. Monitoring the fermentation is effected by the volumetric measurement of gas production. Results shown that rumen bacterial group which rapidly degrade plant polymers such as pectin (**lag 0,01h**), starch (**lag 0,01h**) and hemicellulose (**lag 0,04h**) are able to use the four nitrogen source while the bacterial groups that degrade cellulose and protein, getting slower energy (**lag 16,06 h**) and are less stimulated by these nitrogen sources. Organic nitrogen sources stimulate more metabolic activity of ruminal microorganisms than inorganic sources. Yeast extract stimulates more pectinolytic group (**606.6 ml**), than sodium glutamate (**452,1ml**), ammonium bicarbonate (**350,8 ml**) and potassium nitrate (**497,4 ml**).  $\text{KNO}_3$  has shown some inhibition of metabolic activity especially in cellulolytic groups (24.6 ml) and proteolytic (**99 ml**). pH varied between **5.25** and **7,11** and decreased to **5,25** when yeast extract was used by amylolytic group as nitrogen source and increased to **7,11**, when adding ammonium bicarbonate to xylanolytic bacterial group. In conclusion, organic and inorganic alternative nitrogen sources may be used with rations for ruminants composed of fibrous feed for the first sources and for less fibrous for the second nitrogen sources.

**Key words:** *in vitro* fermentations, Yeast extract, sodium glutamate, plant polymers.



**Effet de la source d'azote sur l'activité métabolique  
des principaux groupes bactériens du rumen de bovin :  
cas du glutamate de sodium et de l'extrait de levure****Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale et Biologie  
Moléculaire des Microorganismes****Résumé :**

Notre travail a porté sur l'étude de l'effet de différentes sources d'azote organique, et inorganique, sur l'activité métabolique des principaux groupes bactériens fonctionnels du rumen de bovin. Pour cela nous avons procédé à des fermentations *in vitro* utilisant le liquide ruminal prélevé de bovins, comme inoculum, en utilisant différentes sources d'énergie en présence de différentes sources d'azote. La première étape consiste à épuiser l'azote et de l'énergie résiduels apportés par l'inoculum. L'incubation se fait pendant **5 à 6 h** en suivant la production de gaz. Dans la deuxième étape des fermentations ont été conduites en utilisant les différentes sources d'énergie avec chacune des différentes sources d'azote. Le suivi de la fermentation est effectué par la mesure volumétrique de la production de gaz. Les résultats montrent que les groupes bactériens du rumen qui dégradent rapidement les polymères végétaux tels que la pectine (**lag 0,01 h**), l'amidon (**lag 0,01 h**) et l'hémicellulose (**lag 0,04 h**) sont capables d'utiliser les quatre source d'azote alors que les groupes bactériens qui dégradent la cellulose, obtiennent plus lentement leur énergie (**lag 16,06 h**) et sont moins stimulés par ces mêmes 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 (**606,6 ml**, chez les pectinolytiques) que le glutamate de sodium (**452,1ml**, chez les pectinolytiques), et le bicarbonate d'ammonium (**350,80 ml**, chez les pectinolytiques) plus que le nitrate de potassium (**497,4 ml**, chez les pectinolytiques), qui présente même une inhibition de l'activité métabolique en particulier chez les groupes cellulolytiques (**24,6 ml**) et protéolytiques (**99 ml**). La variation du pH traduit entre **5,25** et **7,11**, il diminue jusqu'à **5,25** lorsqu'on ajoute l'extrait de levure en ruminants riche en amylolytiques et augmente jusqu'à **7,11**. Lorsqu'on ajoute le bicarbonate d'ammonium en ruminants riche en xylanolytiques. En conclusion, les sources d'azote organiques et inorganiques alternatives peuvent être utilisées avec des rations pour les ruminants composées d'aliments fibreux pour les premières et faiblement fibreuses pour les secondes.

**Mots clés :** fermentation *in vitro*, extrait de levure, glutamate de sodium, polymères végétaux.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne.  
Université des frères Mentouri. Constantine.

**Devant le Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** M. *KHELIFI Douadi* (Professeur - UFM Constantine).

**Encadreur :** M. *HADDI Mohamed-Laid* (Professeur - UFM Constantine).

**Co-encadreur:** Mme. *BENCHIHEUB Meriem* (M.A.A. - UFM Constantine).

**Examineur :** M. *KADEM Dhaou El Djabine* (Professeur - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 30/06/2016