



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 الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*

Intitulé :

Comparaison entre azote organique et inorganique portant sur la dégradation *in vitro* des sources alternatives d'énergie par la microflore ruminale: cas des résidus d'oranges

Présenté et soutenu par : Bouzana Khaoula

Le : 09/07/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Kadem Dhaou el Djabine* (Professeur- Université Constantine 1)

Rapporteur : *Haddi Mohamed-Laid* (Professeur - UFM Constantine 1)

Examinatrice : *Bellil Ines* (Maitre de Conférences - UFM Constantine 1)

Année universitaire 2016 – 2017

Remerciements

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à Dieu qui m'a donné le courage et la volonté pour achever ce travail.

*Je tiens à exprimer ma très grande considération et ma vive reconnaissance à mon directeur de mémoire Monsieur **Haddi Mohamed-Laid**, Professeur à l'université Mentouri de Constantine, pour sa rigueur scientifique, sa grande disponibilité, sa patience, ses précieux conseils, son suivi et l'orientation dont j'ai pu bénéficier.*

*J'exprime mes profonds remerciements à Monsieur **Kadem Dhaou el Djabine** Professeur à l'université de Mentouri de Constantine pour nous avoir accepté d'assurer la présidence du jury et pour son support durant notre recherche.*

*Je remercie vivement et chaleureusement le membre de jury Mme **Bellil Ines** Maitre de conférences à l'université Mentouri de Constantine pour avoir accepté de lire et juger ce mémoire.*

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à mes meilleures amies Manel et Amira qui m'ont accompagnée tout au long de mes études.

Je remercie vivement tous ceux qui m'ont aidée.

Dédicaces

Je dédie cette thèse....

A ma très chère mère, source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance et amour. Ta prière m'a été d'un grand secours tout au long de ma vie. Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon très cher père, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines et tes valeurs nobles. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

A mes chères grands-mères et à mes chers grands-parents.

A mon très cher frère Abdallah, Aucune dédicace ne saurait exprimer ma reconnaissance pour ton support, tes conseils et ta patience. A mon très cher frère Haithem.

A mes deux meilleures amies Manel et Amira, Aucun mot ne pourrait exprimer ma gratitude, mon respect et mon amour.

A mes chères cousines Zahra et Boutheina.

A tous les membres de ma promotion, en particulier Hadjer, Rayanne, Ibtissem, Chourouk.

A tous mes enseignants qui m'ont accompagnée le long de mes années d'étude.

A tous ceux qui me sont chers.

Table des matières

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

Chapitre I synthèse bibliographique

1 - L'écosystème ruminale.....	2
1.1 - Les paramètres physico-chimiques du rumen.....	2
1.1.1 - L'anaérobiose.....	2
1.1.2 - L'humidité.....	2
1.1.3 - Le pH.....	2
1.1.4 - La température.....	3
1.1.5 - Le Potentiel d'oxydo-réduction.....	3
1.1.6 - La pression osmotique.....	3
1.1.7 - La Phase gazeuse.....	3
2 - La microflore du rumen.....	3
2.1 - Les bactéries.....	4
2.2 - Les protozoaires.....	11
2.3 - Les champignons.....	11
2.4 - Les virus.....	12
3 - La fermentation dans le rumen.....	12
3.1 - Le métabolisme énergétique.....	12
3.1.1 - Les glucides cytoplasmiques.....	12
3.1.2 - Les glucides pariétaux.....	14
3.2 - Le métabolisme azoté.....	20
4 - Le recyclage des résidus de l'industrie agro-alimentaire dans l'alimentation des ruminants.....	22
5 - Les sources alternatives d'azote.....	25
5.1 - Le bicarbonate d'ammonium.....	25
5.2 - Le nitrate de potassium.....	25
5.3 - Le glutamate de sodium.....	27
5.4 - L'extrait de levure.....	27
6 - Aspects environnements.....	29

Chapitre II Matériel et méthodes

1 - Matériel	31
1.1- Inoculum et l'animal donneur.....	31
1.2 - Sources d'énergie.....	31
1.3- Sources d'azote organique et inorganique.....	32
2 - Analyse des caractéristiques physico-chimique du liquide ruminal	32
2.1 - Mesure du pH.....	32
2.2 - Mesure de la température.....	33
3 - Taux de matière sèche du liquide ruminal	33
4 - Taux des matières organiques et minérales du liquide ruminal	34
5 - Evaluation de la Teneur en matières sèche, organique et minérale du résidu d'oranges et des cardes	35
6 - Etude des caractéristiques microbiologiques du liquide ruminal	35
6.1 - Coloration de Gram et évaluation du rapport Gram+/Gram-.....	35
6.2 - Etude morphologique de la flore bactérienne du liquide ruminal.....	36
7 - Épuisement de l'azote et de l'énergie résiduels dans l'inoculum	37
8 -Utilisation des sources d'azote comme source d'énergie	37
9 - Etudes des caractéristiques fermentatives des différentes sources d'azote et d'énergie <i>in Vitro</i>	38
9.1 - Préparation de la verrerie et du matériel.....	38
- La stérilisation	38
- L'aseptisation.....	38
9.2 - La réalisation des conditions d'anaérobiose.....	38
- Phase liquide	38
- Phase gazeuse.....	39
9.3 - Préparation des milieux.....	39
9.4.1 - Le milieu d'épuisement et de fermentation.....	39
9.4.1.1 - Inoculation et incubation du milieu.....	39
9.4.2 - L'ajout des sources d'azote et d'énergie.....	41
9.4.2.1 - Incubation l'ajout des sources d'azote et des sources d'énergie.....	42
9.5 - Mesure du pH final à la fin de la fermentation.....	43
10 - Suivi de l'activité métabolique de la flore ruminale	43

11 - Acquisition des données	43
------------------------------------	----

Chapitre III Résultats et discussion

1 - L'analyse des caractéristiques physico-chimiques de l'inoculum.....	45
1.1 - pH.....	45
1.1.1 - Le pH avant la fermentation.....	45
1.1.2 - Le pH après la fermentation.....	46
1.2 - Température.....	48
1.3 - Taux de matière sèche, de matière organique et de matière minérale.....	49
2 - Analyse des caractéristiques microbiologiques de l'inoculum.....	50
2.1 - Analyse du rapport Gram+/Gram-.....	50
2.2 - Analyse morphologique.....	50
3 - Analyse des caractéristiques des sources d'énergie.....	51
3.1 - Les caractéristiques des sources d'énergie : les résidus d'oranges et les cardes.....	51
4 - Cinétique de la dégradation des sources d'azote organiques et inorganiques	52
4.1 - Utilisation des sources d'azote comme source d'énergie.....	52
5 - Cinétique de la dégradation des sources d'énergie en présence de différente source d'azote.....	54
5.1 - Les sources d'énergie fibreuse : les cardes.....	54
5.2 - Les sources d'énergie non fibreuse : les résidus d'oranges.....	56
Conclusion.....	58
Références bibliographique.....	59

Liste des tableaux

Tableau - 1 Caractéristiques des principales espèces cellulolytiques du rume.....	6
Tableau - 2 Caractéristiques des principales espèces amylolytiques du rumen.....	7
Tableau 3 - Caractéristiques des principales bactéries méthanogènes.....	8
Tableau 4 - Caractéristiques des principales espèces pectinolytiques du rumen.....	8
Tableau 5 - Caractéristiques des principales bactéries fermentant les sucres simples du rumen.....	9
Tableau 6 - Caractéristiques des principales bactéries lipolytiques.....	10
Tableau 7 - la classification botanique des résidus d'oranges.....	24
Tableau-8 la classification botanique des cardes.....	25
Tableau - 9 Composition, toxicité et prix des sources d'azote alternatives.....	29
Tableau 10 - Composition chimique des résidus d'oranges et des cardes.....	32
Tableau 11 - Composition des solutions étalons.....	33
Tableau 12 - Procédure de la coloration de Gram selon Kopeloff.....	36
Tableau 13 - Composition du milieu d'épuisement et de fermentation.....	41
Tableau 14 - Répartition des différentes sources d'azote et d'énergie dans les flacons.....	42
Tableau 15 - Tableau récapitulatif des différents essais.....	43
Tableau 16 - pH du LRTQ, milieu tamponné réduit et milieu tamponné réduit inoculé, après épuisement.....	45
Tableau 17 - variation du pH après 96 h de fermentation des différentes sources d'azotes après épuisement de l'inoculum.....	46
Tableau 18 - variation du pH après 96 h de fermentation des cardes après épuisement de l'inoculum.....	47
Tableau 19 - variation du pH après 96h de la fermentation des résidus d'orange après l'épuisement de l'inoculum.....	48

Tableau 20 - Température (°C) du LRTQ, milieu tamponné réduit et du milieu tamponné réduit inoculé.....	47
Tableau 21 - le pourcentage de la matière sèche, organique et minérale du liquide ruminal tel quel.....	49
Tableau 22 - Taux de matière sèche résiduelle, organique et minérale des résidus d'orange et des cardes.....	51
Tableau 23 - Caractéristiques de la cinétique de l'utilisation des sources d'azote comme source d'énergie.....	53

Liste des figures

Figure 1 - Structure de l'amidon.....	13
Figure 2 - Polymères des tissus végétaux.....	14
Figure 3 - Structure de la cellulose.....	15
Figure 4 - Structure de l'hémicellulose.....	16
Figure 5 - Structure chimique de la pectine.....	17
Figure 6 - Structure de la lignine.....	17
Figure 7 - Principales voies métaboliques des glucides dans les fermenteurs digestifs.....	18
Figure 8 - Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidique.....	19
Figure 9 - Digestion des matières azotées chez les ruminants.....	21
Figure 10 - Fleurs et fruits d'un oranger.....	23
Figure 11 - Cardes en fleurs.....	24
Figure 12 - Structure de nitrate de potassium.....	25
Figure 13 - Utilisation et dégradation de nitrate et nitrite.....	26
Figure 14 - Structure de l'acide glutamique.....	27
Figure 15 - La dégradation des protéines et leurs produits finaux dans le rumen.....	28
Figure 16 - Matière organique dans le dessiccateur après incinération.....	35
Figure 17 a - Le milieu tamponné réduit inoculé avant épuisement.....	40
Figure 17 b - Le milieu tamponné réduit inoculé après épuisement.....	40
Figure 18 - Virage de couleur lors de réduction du milieu tamponné.....	41
Figure 19 - Appareil de mesure de gaz <i>in vitro</i>	44
Figure 20 - Observation microscopique du liquide ruminal tel quel.....	50
Figure 21 - Observation microscopique du liquide ruminal filtré.....	50
Figure 22 - Observation microscopique du liquide ruminal mixte.....	51
Figure 23 - Observation microscopique du liquide ruminal après filtration.....	51
Figure 24 - Production de gaz par les sources d'azote.....	52
Figure 25 - Production de gaz par la fermentation des cardes.....	55
Figure 26 - Production de gaz par la fermentation des résidus d'oranges.....	56

Liste des abréviations

AA - Acide aminé

ADF - Acid-detergent fibre

ADICP - acid-detergent-insoluble crude protein

AGV - acides gras volatils

aNDF - amylase-treated neutral detergent fibre

Lignin (sa) - sulfuric acid lignin

LR - liquide ruminal

LRF - liquide ruminal filtré

LRTQ - liquide ruminal tel quel

MF - matière fraîche

MM - matière minérale

MO - matière organique

MOsm - molliosmole

MS - matière sèche

NDICP - neutral-detergent-insoluble crude protein

NSC - non-structural carbohydrates, computed as: $(100 - \text{aNDF} - \text{CP} - \text{EE} - \text{ash})$

pH - potentiel d'Hydrogène

Introduction générale

Introduction générale

A travers le monde, l'élevage des ruminants est un élément majeur pour l'alimentation humaine. Aujourd'hui plusieurs pays en voie de développement, y compris l'Algérie, veulent parvenir à un taux de production animale qui peut satisfaire la demande nationale, et ensuite passer à l'exportation vers l'étranger. Cependant la production animale dans ces pays rencontre de nombreux problèmes tels l'insuffisance en ressource fourragère dont le potentiel nutritionnel est souvent de mauvaise qualité. Ce déficit fourrager engendre certainement des répercussions négatives telles que le recours massif à l'importation des produits animaux et la hausse des prix de ces produits.

En 2015, Selon le ministère de l'agriculture et du développement rural (MADR), le cheptel national en Algérie dépasse le cap de 34 millions têtes, tout type de ruminants confondus. La filière bovine ne représente que 6 % de l'ensemble du cheptel national des ruminants avec moins de deux millions de têtes. Le cheptel laitier est estimé à un million de têtes. La part des bovins destinée à la production des viandes rouges ne dépasse pas 900.000 têtes, soit un part de 2.6 % seulement de l'ensemble de la filière d'élevage. Ce déficit de production locale justifie la hausse des prix sur le marché des viandes rouges, et l'importation de bovins vivants qu'a atteint, selon le ministère de l'agriculture, 25.625 têtes jusqu'à fin mars 2015. (MADR, 2015)

L'intégration des sous-produits dans l'alimentation des ruminants est devenue une alternative stratégique pour combler le déficit fourrager. En Algérie, des millions de tonnes des résidus produits par l'industrie agroalimentaire sont rejetés alors qu'ils peuvent être utilisés comme appoint pour l'alimentation des ruminants, grâce à une flore microbienne très dense hébergée dans le rumen. Les ruminants sont capables de tirer profit de cette biomasse lignocellulosique.

Dans notre cadre de travail, nous avons examiné l'effet des sources d'azote organiques (l'extrait de levure, glutamate de sodium) et inorganiques (bicarbonate d'ammonium et nitrate de potassium) sur l'activité métaboliques de la flore ruminale en présence de deux sources d'énergies: résidus d'organes (sous-produit de l'industrie agroalimentaire) et une plante fibreuse (les cardes). Pour cela nous avons réalisé des fermentations *in vitro* de ces sources dans un milieu tamponné réduit inoculé.

Le but de notre étude est d'évaluer la possibilité d'incorporer des sous-produits agroalimentaires et des plantes fibreuses seules ou en mélange avec des sources d'azote organiques et inorganiques dans les rations alimentaire des ruminants locaux dans le but de contribuer à l'amélioration des productions des ruminants.

*Chapitre I Synthèse
Bibliographique*

1 - L'écosystème ruminal

Le rumen est un écosystème favorable au développement des microorganismes qui vivent en symbiose avec le ruminant. Ces microorganismes dégradent à travers des processus d'hydrolyse et de fermentation la plupart des composants de la ration alimentaire (Cuvelier et *al.*, 2014).

1.1 - Les paramètres physico-chimiques du rumen

Le développement et l'activité des micro-organismes du rumen sont directement dépendants des conditions physico-chimiques du milieu. Ces conditions peuvent subir des variations en fonction de l'animal et de la nature de la ration (Théodorou et France, 1993).

1.1.1 - L'anaérobiose

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose où les apports d'oxygène sont très faibles (Zende, 2011). Le milieu ruminal est de fait très réducteur, et le métabolisme des microorganismes qu'il héberge donc donne lieu à des fermentations qui entraînent la libération des acides organiques comme l'acétate, le lactate, le butyrate, et le propionate, (Belbis, 2007).

1.1.2 - L'humidité

L'humidité est en moyenne élevée de l'ordre de 85 %; cette valeur est néanmoins variable en fonction des apports hydriques réalisés par les aliments, l'eau ingérée et la salive, qui vont former principalement la phase liquide du contenu ruminal (Brugère, 1983).

1.1.3 - Le pH

Le pH est un paramètre important car il influence le type et l'intensité des réactions qui se déroulent dans le rumen. Il est généralement compris entre une large gamme; entre 5,5 et 7,3 (Bonfont, 2008).

Le pH joue un rôle primordial dans la sélection des micro-organismes du rumen et dans l'orientation des fermentations (Zende, 2011).

Les paramètres qui influencent le pH du rumen sont:

- les acides: les AGV et l'acide lactique produits à partir des fermentations glucidiques.
- les bases: l'ammoniac (NH_3) issue de la protéolyse ou de l'uréolyse

Les bicarbonates et les phosphates de la salive qui jouent un rôle de tampon (Zende, 2011).

1.1.4 - La température

La température du rumen est constante de 39 à 40 °C qui correspond à environ 1 °C au-dessus de la température corporelle bovine. Elle peut augmenter jusqu'à 41 °C en fonction de l'intensité des fermentations ruminal, mais aussi elle peut chuter de plusieurs degrés après l'ingestion de grandes quantités d'eau froide de 5 à 10 °C, un délai deux heures est nécessaire afin de regagner la température initiale (Jarrige *et al.*, 1995).

1.1.5 - Le Potentiel d'oxydo-réduction

Le rumen est un écosystème fortement anaérobie, son potentiel d'oxydoréduction est toujours négatif de -200 à -350 millivolts (mV) nécessaire pour la croissance des microorganismes anaérobies stricts (Morjane, 2011). La zone proche de l'épithélium est très vascularisée. Il s'y fixe une population microbienne facultativement aérobie qui contribue à l'élimination des traces d'oxygène ce qui permet de maintenir l'écosystème en anaérobiose (Fonty *et al.* 1994)

1.1.6 - La pression osmotique

Elle est proche de celle du sang, la pression osmotique varie dans un grand intervalle de 200 à 400 mosm/l. (Jarrige *et al.*, 1995).

1.1.8 - La phase gazeuse

Le mélange de gaz est fait principalement de 65% de CO₂ et de 35% de méthane (CH₄). D'autres gaz comme d'hydrogène (H₂), le sulfure d'hydrogène (H₂S) et l'oxygène (O₂) sont présents mais en quantités négligeables (Jouany, 1994).

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

2 - La microflore du rumen

Le rumen est un écosystème microbien complexe composé de plusieurs catégories de populations microbiennes (les bactéries, les archaea, les protozoaires, les champignons, virus etc).

2.1 - Les bactéries

Les bactéries représentent le plus grand nombre des micro-organismes colonisant le rumen. Leur nombre varie entre 10^{10} et 10^{11} bactéries / g de contenu ruminal (Stewart et *al.*, 1997). La majorité des bactéries colonisant le rumen est strictement anaérobie; plus de 200 espèces ont été isolées à ce jour. La biomasse microbienne représente environ 1 kg de matière sèche chez la vache. Les bactéries Gram- sont les prédominantes, les Gram+ sont ainsi présentes, et jouent des rôles très importants (Kamara, 2005).

La classification des bactéries est faite selon leur localisation dans le rumen et selon leur fonction (Briki et Debab, 2009).

2.1.1 - Classification des bactéries selon leur localisation dans le rumen

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

Les bactéries occupent trois biotopes distincts. Elles peuvent être libres dans le liquide de rumen, ou attachées soit à la paroi interne du rumen, soit aux particules alimentaires. Enfin, certaines espèces bactériennes vivent également liées à la surface des protozoaires (Thivend et *al.*, 1985).

- Bactéries libres dans le liquide ruminal

Le 1/3 des bactéries se trouvent à l'état libre dans le jus de rumen (Fonty et Forano, 1999). Ces bactéries sont entourées par une structure fibreuse polyholiosidique (glycocalyx). (Cheng et *al.*, 1977). Ce glycocalyx pourrait avoir un rôle protecteur contre les bactériophages ou d'autres agents antibactériens.

- Bactéries attachées aux particules alimentaires

À la surface des particules alimentaires se forment ainsi un-consortium microbien (biofilm) au sein duquel cohabitent plusieurs espèces de bactéries, de protozoaires et de champignons. (Fonty et Chaucheyras- Durand, 2007).

- Bactéries adhérentes à la paroi du rumen

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

- L'hydrolyse de l'urée qui est diffusée à travers la paroi du rumen (Cheng et Costerton, 1980).
- La dégradation des cellules épithéliales (Dinsdale et *al.*, 1980).
- L'élimination de l'oxygène qui diffuse à travers la paroi du rumen depuis la paroi sanguine (Faye et *al.*, 1995)

- Les bactéries attachées à la surface des protozoaires

Ces bactéries présentent 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 on y trouve principalement: *Streptococcus bovis*, *Ruminococcus albus* (Ogimoto et Imai, 1981), et des bactéries méthanogènes (Krumholz et *al.*, 1983).

2.1.2 - La classification des bactéries selon leur fonction

- Les 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 (Fonty et *al.*, 1988)

Deux types de bactéries cellulolytiques sont trouvés dans le rumen

- Des coques : représentés par *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* Toutes les souches de *R. flavefaciens* et *R. albus* dégradent la cellulose, le cellobiose et le xylane (Guillaume, 2007 ; Graham and Malcolm, 1979).
- Des bacilles: parmi lesquels sont majoritairement isolées *Fibrobacter succinogenes* et *Butyrivibrio fibrosolvans*.

La plupart des bactéries cellulolytiques du rumen produisent des enzymes capables d'hydrolyser les hémicelluloses. Il semble que *Butyrivibrio fibrosolvans* est l'élément essentiel de la dégradation des hémicelluloses (Williams and Withers ,1981)

Tableau 1 - Caractéristiques des principales espèces cellulolytiques du rumen (Keiji and soichi, 1989; Patterson, 1992; Mould et al., 2005).

Espèces	Gram	Forme	Les produits de fermentation
<i>Prevotella Succinogenes</i>	-	Bacille	Succinate, acétate, formiate
<i>Ruminococcus Flavfaciens</i>	+	Cocci	Acétate, lactate, formiate, Ethanol
<i>Ruminococcus Albus</i>			
<i>Butyrivibrio Fibrisolvens</i>	-	Bacille incurvé	Acétate, lactate, formiate, succinate, butyrate
<i>Fibrobacter Succinogenes</i>	-	Bacille	Acétate, formiate, succinate
<i>Eubacterium Cellulosolvens</i>	+	Bacille irrégulières	Acétate, lactate, formiate, succinate, butyrate, propionate
<i>Clostridium Lockeadii</i>	+	Bacille (spore)	Acétate, formiate, buturate, buturate, CO ₂ , H ₂

- Les bactéries hémicellulolytiques

Les principales bactéries hémicellulolytiques sont *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, ainsi que les Ruminococci qui dégradent l'hémicellulose. Elle est 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 (Belbis, 2007).

- Les bactéries amylolytiques

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

Elles sont très tolérantes à l'acidité du milieu; *Prevotella amylophilus*, *Succinimonas amylolytica*, et *Streptococcus bovis* (Gram+) sont les bactéries dominantes dans la dégradation de l'amidon (tableau 2) (Euzéby, 2006).

Tableau 2 - Caractéristiques des principales espèces amylolytiques du rumen (Keiji and soichi, 1989; Patterson, 1992; Mould *et al.*, 2005)

Espèces	Gram	Forme	Le produit de fermentation
<i>Prevotella Amylophilus</i>	-	Bacille	Acétate, succinate, propionate
<i>Succinimonas Amylolytica</i>	-	Bacille court Droit	Acétate, succinate, propionate
<i>Succinivibrio Dextrinosolvans</i>	-	Bacille incurvé ou hélicoïdal	Acétate, succinate, formiate lactate
<i>Selenomonas Ruminantium</i>	-	Bacille incurvé en forme de croissant	Acétate, succinate, propionate, lactate
<i>Veillonella Alcalescens</i>	-	Cocci	Acétate, succinate, propionate

- Les bactéries méthanogènes (les archaea)

Les méthanogènes sont des membres du domaine de archaea. Il s'agit des bactéries anaérobies strictes représentant environ 4 % des micro-organismes des ruminants, *Methanobrevibacter ruminantium* la plus souvent rencontrée chez les bovins (Mordjane, 2011), leur densité atteint généralement 10^8 - 10^{10} cellules de contenu digestif. Elles peuvent être aisément distinguées des autres organismes car elles produisent toutes du méthane comme principale produit de fermentation (tableau 3). (Demeyer et Fievez, 2000).

Les *archaea* occupent différentes localisations dans le rumen. On les trouve dans la phase liquide du contenu digestif mais beaucoup sont fixées sur les protozoaires ciliés sur les particules alimentaires, ainsi que sur l'épithélium ruminal (Tokua *et al.*, 1999).

Tableau 3 - Caractéristiques des principales bactéries méthanogènes (Keiji and soichi, 1989; Patterson, 1992; Mould et al., 2005)

Espèces	Gram	Forme	Les produits de fermentation
<i>Methanobacterium Formicum</i>	+	Bacille long (filament)	CH ₄
<i>Methanobacterium Ruminantium</i>	+	Bacille ovale coccoïde court	CH ₄
<i>Methanomicrobium Mobile</i>	-	Bacille court incurver	CH ₄
<i>Methanosarcina Barkerii</i>		Cellules sphériques irrégulières	CH ₄

- Les bactéries pectinolytiques

Plusieurs espèces bactériennes possèdent une activité pectinolytique par excellence (tableau 4). *Lachnospira multiparus* se présente sous la forme de bacilles incurvés Gram positif, d'autres bactéries pectinolytiques comprenant: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis* et *Succinivibrio dextrinosolvans* (Jouany, 1994).

Tableau 4 - Caractéristiques des principales espèces pectinolytiques du rumen (Keiji and soichi, 1989; Patterson, 1992; Mould et al., 2005)

Espèces	Gram	Forme	Les produits de Fermentation
<i>Prevotella Ruminicola</i>	-	Bacille	Acétate, formiate, succinate
<i>Lachnospira multiparus</i>	+	Bacille Incurvé	Acétate, formiate, lactate, Ethanol
<i>Succinivibrio Dextrinosolvans</i>	-	Bacille incurvé ou hélicoïdal	Acétate, formiate, lactate, Succinate
<i>Treponema Bryantii</i>	-	Bacille hélicoïdal	Acétate, formiate, succinate
<i>Streptococcus Bovis</i>	+	Cocci sphériques ou ovoïdes	Acétate, formiate, lactate

- Les bactéries protéolytiques

Il n'existe pas de bactéries protéolytiques strictes (Dusart, 2014), elles sont majoritairement des bactéries amylolytiques (plus de 40 % de la flore ruminale) et certaines bactéries fibrolytiques parmi lesquelles, *R. amylophilus*, *P. ruminicola*, *B. fibrisolvans*, *S. ruminantium* qui exercent cette fonction (Jarrige *et al.*, 1995). Ces bactéries n'utilisent pas les protéines comme principale source d'énergie, ou même, dans certains cas, comme source principale d'azote (Bourghoud, 1984).

- Les bactéries utilisatrices de glucides simples

Un grand nombre d'espèces bactériennes ruminales sont capables de dégrader les glucides simples. Lorsque l'animal est alimenté avec des aliments riches en glucides rapidement fermentescibles, le milieu devient très acide et c'est dû à la prolifération des lactobacilles en compagnie de *S. bovis* (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007).

Tableau 5 - Caractéristiques des principales bactéries fermentant les sucres simples du Rumen (Keiji and soichi, 1989; Patterson, 1992; Mould *et al.*, 2005)

Espèces	Gram	Forme	Les produits de Fermentation
<i>Treponema Bryantii</i>	-	Bacille Hélicoïdale	Acétate, succinate, Formiate
<i>Lactobacillus Vitulinus</i>	+	Bacille long régulier ou coccobacille	D-lactate, acétate
<i>Lactobacillus Ruminis</i>	+	Bacille long régulier ou coccobacille	D-lactate, acétate

- Les bactéries lipolytiques

Ce sont des bactéries très spécialisées. Elles hydrolysent les lipides alimentaires et produisent du glycérol qui est rapidement fermenté en AGV et en acides gras libres.

Anaerovibrio lipolytica qui est l'espèce la plus importante, n'hydrolyse que les lipides et ne fermente que le glycérol. C'est la bactérie la mieux connue pour son activité lipolytique (tableau 6) (Thivend et *al.*, 1985).

Tableau 6 - Caractéristiques des principales bactéries lipolytiques (Keiji and soichi, 1989; Patterson, 1992; Mould et *al.*, 2005)

Espèces	Gram	Forme	Les produits de fermentation
<i>Anaerovibrio Lipolytica</i>	-	Bacille incurvé ou spiralé	Acétate, propionate
<i>Butyrivibrio Fibrisolvens</i>	-	Bacille	Formaite, acétate, succinate
<i>Treponema Bryantii</i>	-	Bacille Hélicoïdal	Formaite, acétate, succinate
<i>Ruminococcus Albus</i>	+	Cocci	Acétate, éthanol, (formiate lactate)

- Les 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).

- Les bactéries de grande taille

Sont fréquemment détectées lors d'examen au microscope du contenu ruminal. Les principaux organismes détectés sont notamment *Oscillospira guillermondi*. Elles n'ont été que peu ou pas étudiées en culture pure, leur fonction et leur métabolisme sont donc mal connus (Guillaume, 2007).

- Les bactéries utilisatrices des acides

On trouve parmi les bactéries utilisatrices d'acides certaines qui sont capables d'utiliser le lactate (bactéries lacticoles) et la plupart le fermentent à un pH optimum compris entre 6 et 6,5.

2.2 - Les protozoaires

Les protozoaires du rumen sont des organismes eucaryotes unicellulaires microscopiques anaérobies stricts, de taille variable: 20 à 150 μm , ils sont ainsi 20 à 100 fois plus grands en taille que les bactéries mais ils sont 10^4 moins nombreuses, on distingue deux types de protozoaires dans le rumen: les flagellés et les ciliés.

Les ciliés sont en plus grand nombre que les flagellés. Les ciliés sont soit fixés sur des particules alimentaires, soit dans la phase liquide. Ils sont composés de deux groupes appartenant tous les deux à la classe des *Vestibulifera* : les entodiniomorphes et les holotriches (Dusart, 2014).

Les entodiniomorphes ont de fortes capacités à ingérer des particules solides de petites tailles (les grains l'amidon, les chloroplastes, les fibres cellulose) à l'aide de leurs cils et continuellement les bactéries.

Les protozoaires sont en concurrence avec les bactéries car ils participent spécifiquement au métabolisme des glucides. Ils s'attaquent ainsi à tous les constituants des parois des cellules végétales (Jouany, 2000).

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

2.3 - Les champignons

Les champignons sont des eucaryotes anaérobies stricts (Tiret, 2001). Correspondent à environ 8 % de la biomasse microbienne. Trois genres ont été identifiés : *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Caecomyces*.

Ces champignons sécrètent de nombreuses enzymes intervenant dans la digestion des glucides pariétaux. Ils ont une activité protéolytique faible. Leur contribution à la dégradation des glucides cytoplasmiques est peu connue. Cependant, ils peuvent fermenter la plupart des mono- et disaccharides. Les produits terminaux sont le lactate, le formate, le C_2 , le dihydrogène, le dioxyde de carbone et l'éthanol (Dusart, 2014).

2.4 - Les virus

La communauté virale est estimée entre 2.10^7 et 1.10^8 phages se trouvent dans le liquide ruminal. Cette communauté constituée principalement de bactériophage (Mordjane, 2011).

3 - La fermentation dans le rumen

La dégradation ruminale des aliments nécessite la colonisation du bol alimentaire ruminal par les microorganismes. La phase d'adhésion initiale débute rapidement, 10 minutes après l'arrivée du substrat dans le rumen (Koike *et al.*, 2003). Il s'en suit une augmentation du nombre de bactéries attachées s'expliquant par l'adhésion de bactéries qui étaient libres dans le rumen ainsi que par la prolifération des bactéries déjà attachées au substrat (Koike *et al.*, 2003).

3.1 - Le métabolisme énergétique

Les glucides peuvent se classer en deux catégories selon leur localisation au sein des tissus végétaux :

- Les glucides contenus à l'intérieur des cellules végétales, les glucides cytoplasmiques, qui comprennent les sucres solubles (fructose saccharose) et polyosides de réserve tel que l'amidon.
- Les glucides pariétaux correspondant à la cellulose, aux hémicelluloses et à la pectine. On ne les retrouve que dans les aliments d'origine végétale; ils sont les constituants de la paroi végétale (Dusart, 2014).

- La paroi végétale peut aussi contenir des substrats non glucidiques tels que la lignine et les cires (Jarrige *et al.*, 1995). Cette substance, qui s'associe aux glucides pariétaux et dont la teneur augmente avec l'âge de la plante est presque totalement non dégradable dans le tube digestif du ruminant. (Cuvelier, 2014).

3.1.1 - Les glucides cytoplasmiques

Les glucides cytoplasmiques comprennent les glucides hydrosolubles et les polyholosides de réserve (amidon). Les glucides cytoplasmiques peuvent être hydrolysés par des enzymes secrétées par le tube digestif (Simon, 2009).

- Les glucides hydrosolubles

Les glucides hydrosolubles comportent les oses et les diholosides: ils ont une contribution directe au métabolisme de la cellule végétale.

En ce qui concerne les diholosides, le saccharose est un constituant fondamental important de la sève élaborée : C'est une forme de transport du carbone et de l'énergie. (Dusart, 2014)

- L'amidon

L'amidon est considéré comme une source énergétique essentielle aux animaux: il est stocké comme réserve glucidique dans les cellules végétales dans des organes de réserve (les grains, les racines).

L'amidon est un polyholoside constitué de fractions variables d'amylose et d'amylopectine. L'amylose résulte de la polymérisation de molécules de glucose (entre 500 et 20 000) liées par des liaisons de type α (1-4). L'amylopectine est un polymère ramifié en grappe dont la structure est proche de celle du glycogène, c'est-à-dire un polymère de glucose formé par des liaisons de type α (1-4) et α (1-6). Son hydrolyse conduit également à l' α -maltose qui peut être lui-même transformé en glucose. Les amidons rapides sont partiellement dégradés dans le rumen par les amylases salivaires et extrabactériennes (Jouany et *al.*, 1995). Les amidons lents sont dégradés au niveau de l'intestin (Rey, 2012).

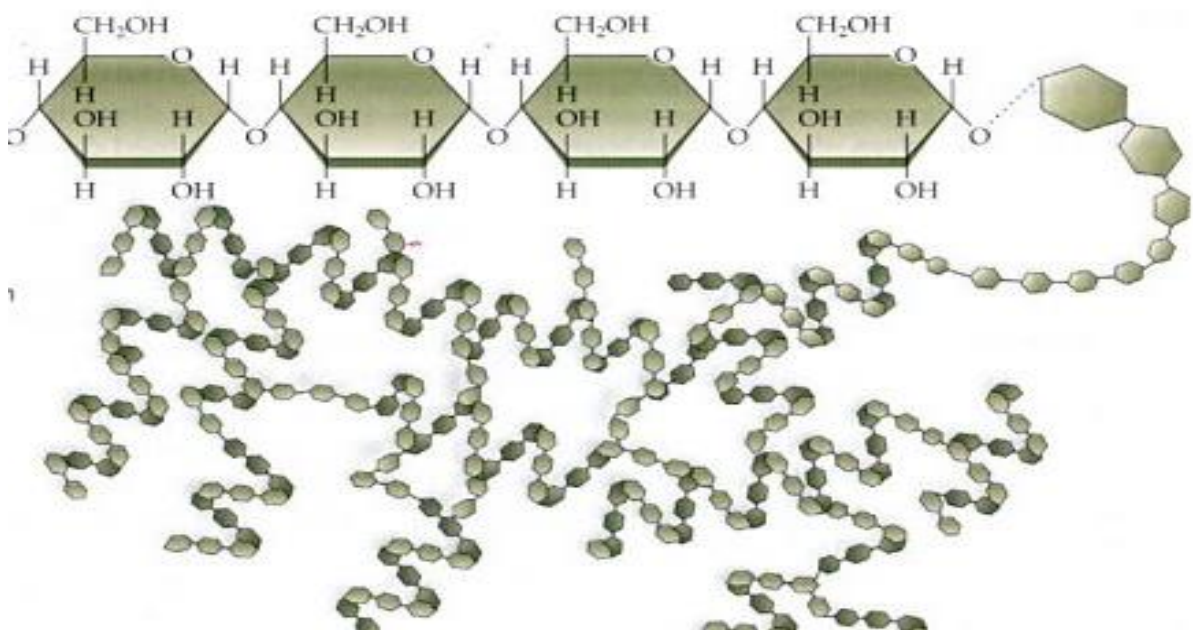


Figure 1 - structure de l'amidon (Anonyme, 2017).

3.1.2 - Les glucides pariétaux

La dynamique de dégradation des glucides pariétaux dépend du type d'aliment. Les glucides pariétaux ne présentent pas de fraction soluble immédiatement dégradable et leur dérivabilité peut parfois comprendre un temps de latence très important (Sauvant and VanMilgen, 1995).

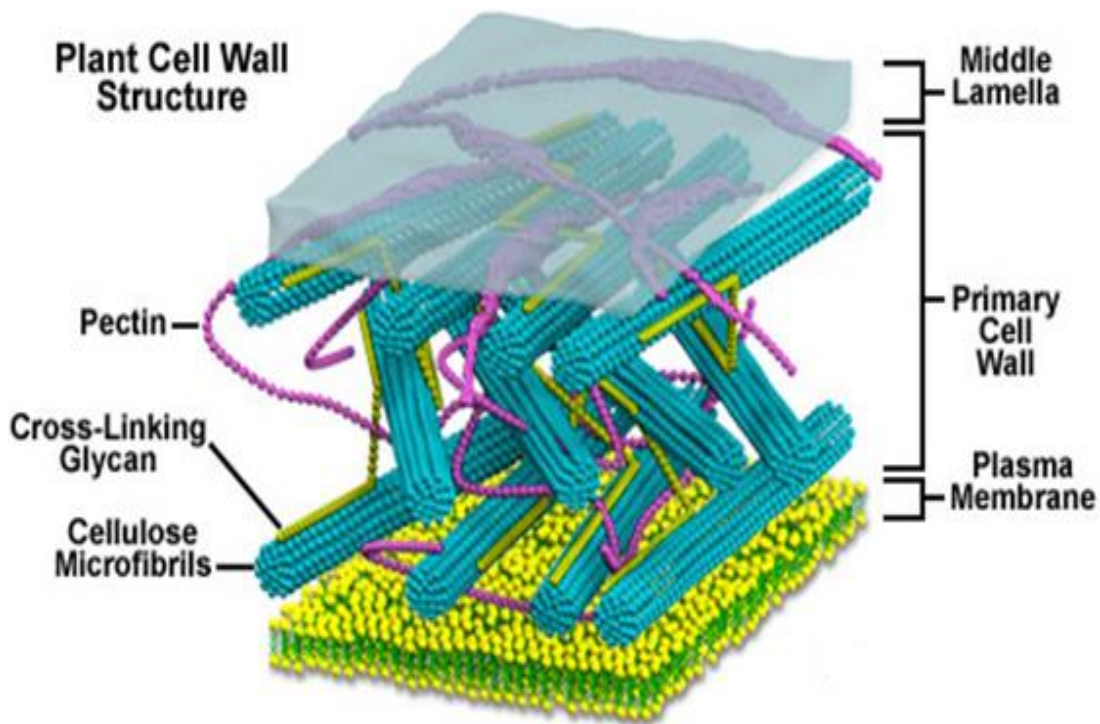


Figure 2 - Polymères des tissus végétaux (Anonyme, 2017).

Dans les parois des cellules végétales, d'autres macromolécules sont associées à la cellule parmi lesquelles les pectines, les hémicelluloses, les glycoprotéines de structure.

Ces trois macromolécules constituent la matrice de la paroi (Reis et al, 2006). Les lignines constituent aussi un matériau de renfort très important (figure 2)

Les polyosides pariétaux

- La cellulose

La cellulose représente le matériel structural de la base des parois cellulaires des végétaux supérieurs, elle représente 32 % à 47 % du poids sec du fourrage (Chenost, 1997). C'est un polymère formé de 10 000 à 25 000 molécules de glucoses, liées en β (1-4). Les chaînes linéaires sont associées par des liaisons hydrogène. C'est le polysaccharide le plus abondant et le plus largement répandu dans la nature, constitué de 25-50 % de matière sèche de la plupart des tissus végétaux.

Les enzymes responsables de l'hydrolyse de la cellulose pour former du glucose sont des cellulases (endoglucanases, exoglucanases et bêta-glucosidases (Forano *et al.*, 1996).

L'action conjuguée de ces enzymes permet l'hydrolyse de la cellulose en cellobiose (dimère de glucose). L'endo-glucanase hydrolyse au hasard les liaisons glucose, alors que l'exo glucanase libère des dimères de cellobiose à partir d'une extrémité de la chaîne du polymère (Fonty et Forano, 1990).

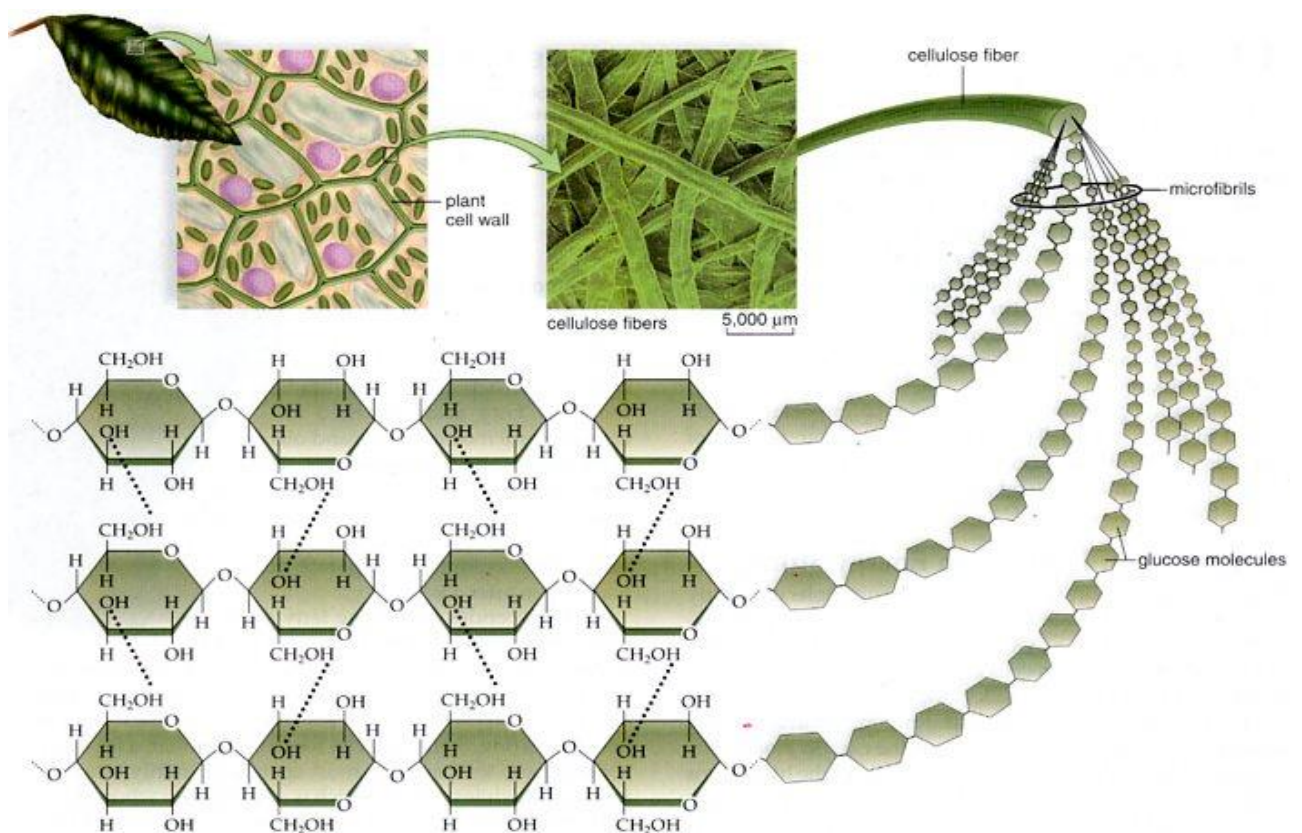


Figure 3 - Structure de cellulose (Anonyme, 2017)

- Les hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent entre 10-25 % de la matière sèche des fourrages (figure 3). Ce sont des polysaccharides solubles dans les solutions alcalines diluées, mais non pas dans l'eau. Ils peuvent être hydrolysés en sucres (pentoses et hexoses) et des unités d'acides, particulièrement l'acide galacturonique (Briki et Debab, 2009)

Les hémicellulases sont hydrolysées par 3 enzymes : les endoxylanases, les exoxylanases et les bêta-xylosidases qui vont permettre la formation de xylose et autres pentoses (Rey, 2012)

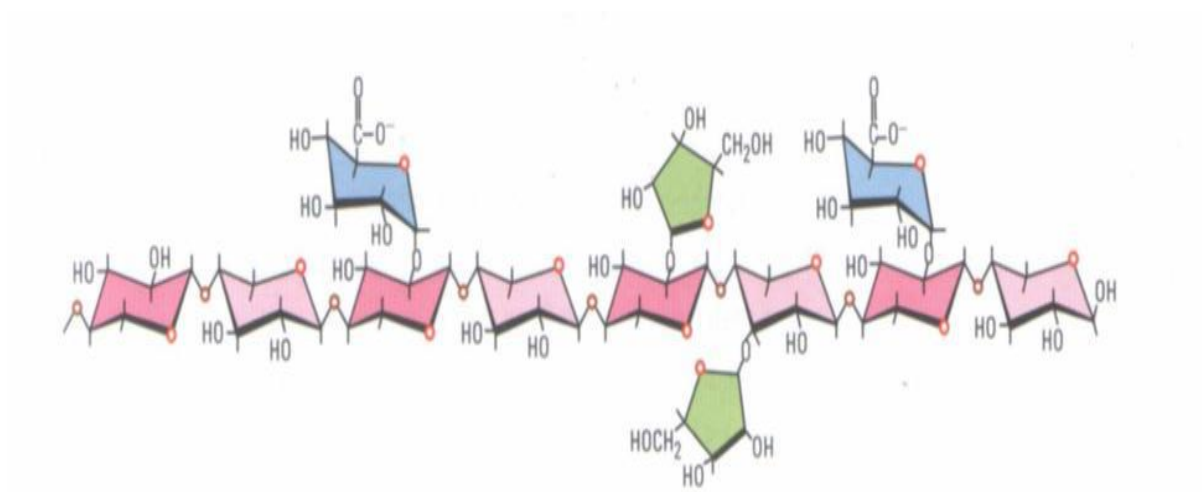


Figure 4 - Structure de l'hémicellulose (Res *et al.*, 2006).

- Les pectines

Les pectines sont des polysaccharides présents dans la paroi primaire, forment l'ensemble des fibres dites solubles. Ce sont des polymères d'acides uroniques et d'oses. Ce sont principalement des polymères d'acide α -galacturoniques et de rhamnose liés par des liaisons α -1-4 (figure 4). Leur hydrolyse par les microorganismes du rumen est donc rapide. (Grenet *et al.*, 1991). (Dusart, 2014). Ce polymère est dégradé grâce à l'intervention de 3 types d'enzyme: pectine lyase, polygalacturonase et pectine estérase (Moustapha, 2000). Les enzymes pectinolytiques sont divisés en deux 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).

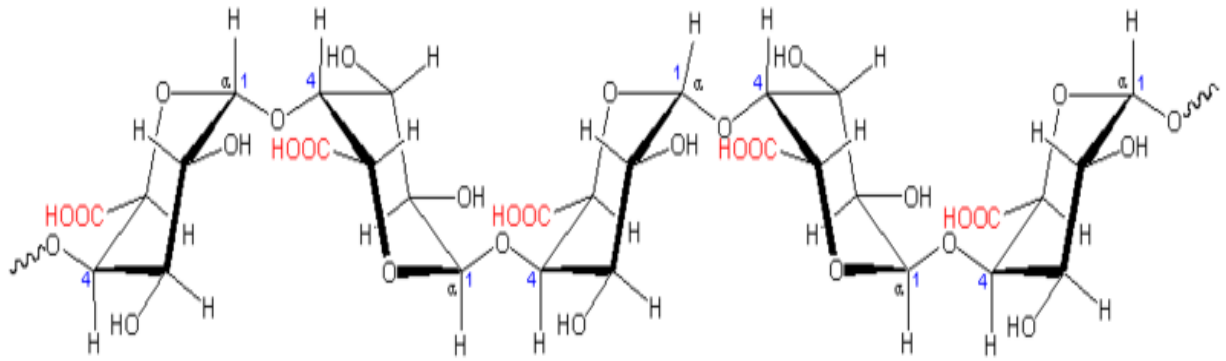


Figure 5 - Structure de la pectine (Bestle et Jouany, 1990)

Les polymères pariétaux non polysaccharidiques

- La lignine

La lignine est une structure polyphénolique. Alors elle n'est pas considérée comme un glucide. Néanmoins, de par son importance dans la paroi végétale, elle est souvent classée dans les fibres végétales. La lignine peut incruster l'ensemble cellulose - hémicellulose de façon variable dans la paroi végétale. Elle offre une plus grande résistance aux parois végétales. La teneur en lignine est un facteur limitant à la dégradation des parois végétales car celle-ci n'est pas digestible. Sa teneur augmente avec l'âge de la plante et son développement. L'ensemble cellulose - hémicellulose - lignine constitue les fibres dites insolubles (Simon, 2009).

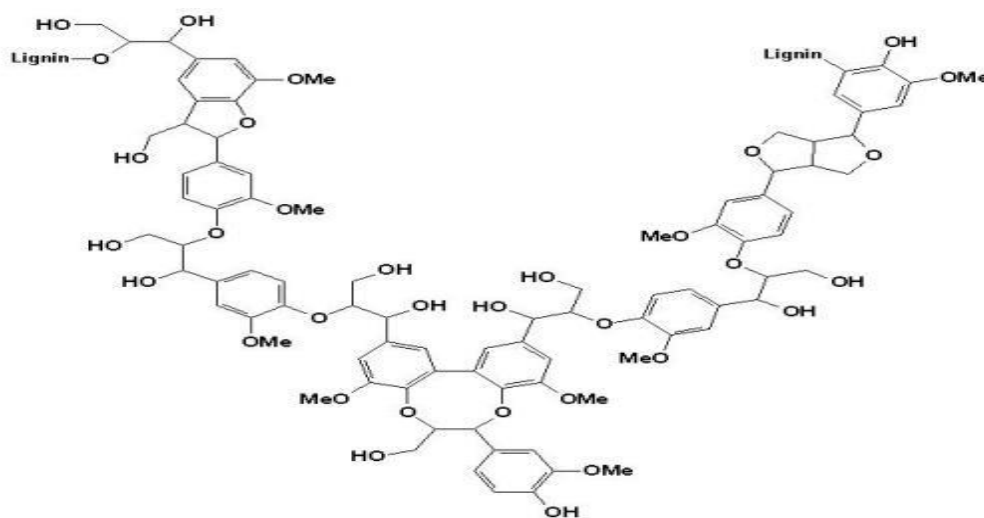


Figure 6 - Structure de la lignine (Anonyme, 2017)

- Les protéines de structure

Les parois cellulaires peuvent également contenir des glycoprotéines – protéines structurales- ainsi que des enzymes, les glycoprotéines, qui sont des composants de la matrice et représentent environ 10 % de poids sec de beaucoup de parois primaires.

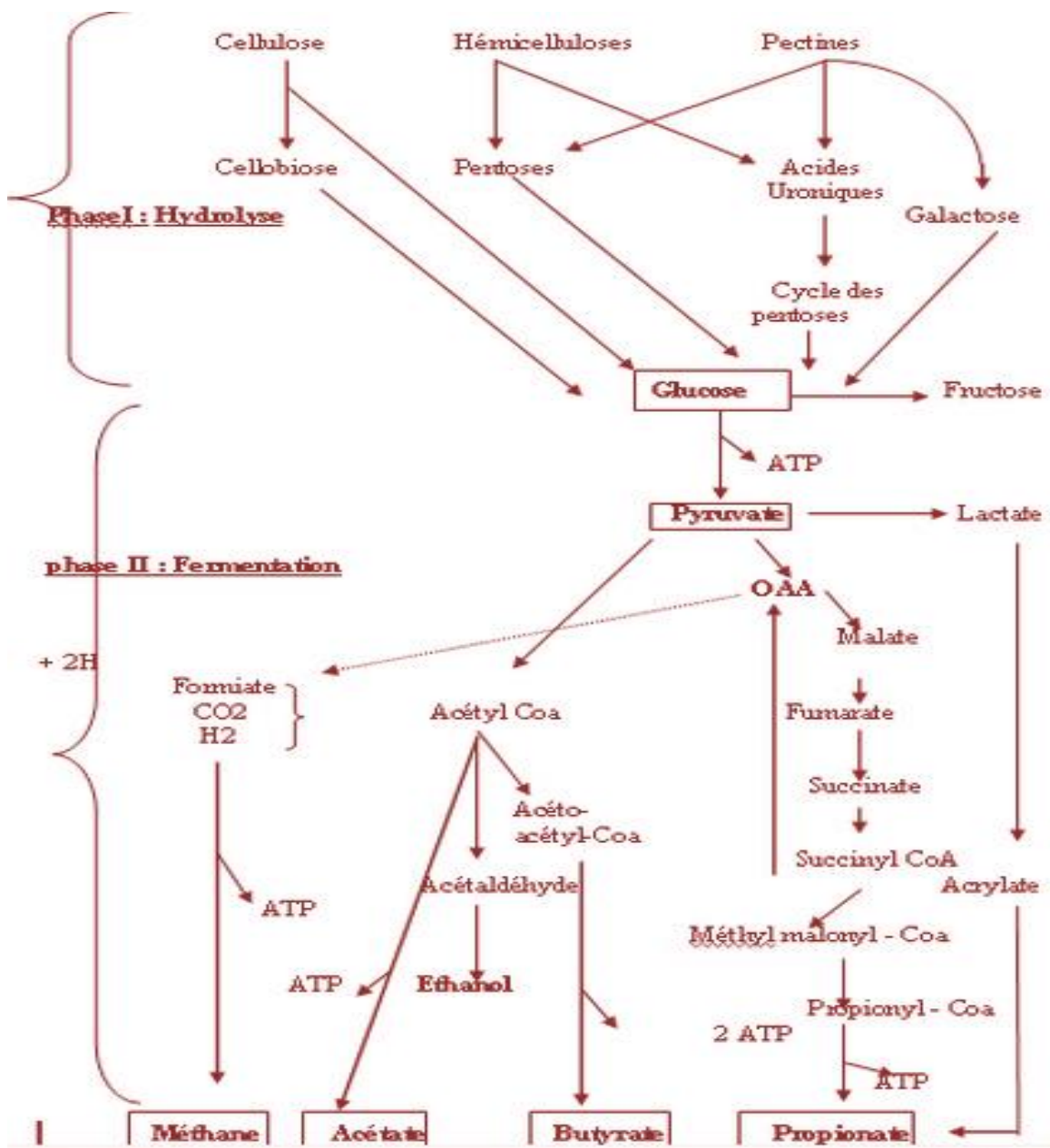


Figure 7 - Principales voies métaboliques des glucides dans les fermenteurs digestifs (Michelland, 2009)

Le mécanisme général de dégradation des polymères

La dégradation ruminale des glucides commence avec l'hydrolyse des polymères glucidiques (amidon, pectine, hémicellulose, cellulose), des parois végétales en oses à cinq ou six atomes de carbone grâce aux enzymes synthétisées par les bactéries vivant dans le rumen.

Les sucres libérés par hydrolyse vont être absorbés et ensuite fermentés en anaérobiose en pyruvate par les voies d'Emden-Meyerhof et des pentoses phosphates. Le pyruvate est un intermédiaire qui est rapidement utilisé. Il est catabolisé en AGV (C_2 , C_3 , C_4 et une faible proportion d'AGV mineurs), dans certains cas en acide lactique, et en gaz (dioxyde de carbone, dihydrogène et méthane). L'énergie libérée sous forme d'adénosine tri-phosphate (ATP), permettra la croissance microbienne.

Les AGV (dont les principaux sont : acide acétique C_2 , acide propionique C_3 et acide butyrique C_4) permettent de synthétiser l'ATP nécessaire pour l'entretien, la croissance et les synthèses microbiennes. Les AGV répondent à environ 70 % des besoins en énergie des ruminants (Bergman, 1990) et sont absorbés, pour la plupart, au niveau de la paroi ruminale (figure 6).

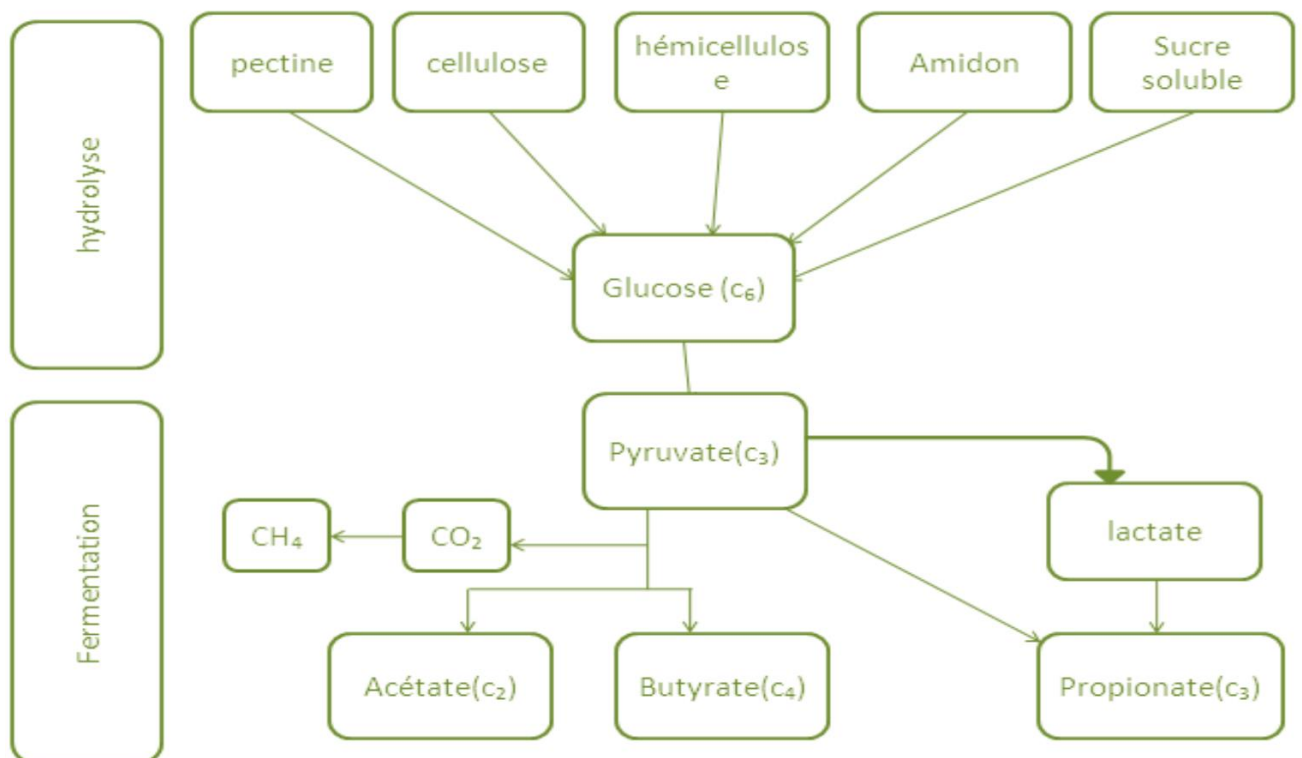


Figure 8 - Résumé des principales voies des fermentations ruminales des polymères glucidiques (Chentli, 2015).

3.2 - Le métabolisme azoté

On peut séparer les matières azotées alimentaires en deux catégories: Les protéines, qui peuvent être solubles ou non, constituent 75-85 % de l'azote total et l'azote non protéique ou plus précisément non protéinique (ANP), constitue 15-25 % de l'azote total. En effet, l'ANP regroupe des amides et des acides aminés libres (50% environ), ainsi que des bases azotées, des amines, du NH_3 , de l'urée et des nitrates.

a - la protéolyse

Dans cette phase, les protéines ingérées par l'animal sont dégradées en peptides et en acides aminés via des réactions d'hydrolyse catalysées par des enzymes (protéases, peptidases) produites par les microorganismes ruminiaux 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.

Les acides aminés sont ensuite désaminés majoritairement par les protozoaires pour former l'ammoniac (NH_3) sous forme d'ammonium, ainsi que de chaînes carbonées. Ces dernières sont ensuite fermentées, ce qui entraîne la formation d'AGV (Boye, 2014), alors que l'ANP est directement transformé en NH_3 . Cette dégradation génère la production d'une faible quantité d'énergie.

Le NH_3 ruminal peut aussi être acheminé jusqu'au foie où il sera transformé en urée.

Il existe un phénomène de recyclage de l'urée en NH_3 via la salive ou la paroi ruminale qu'est essentiel lorsque les animaux consomment des aliments pauvres en protéines ou en azote dégradable. Quand ces voies sont saturées l'urée est éliminée par l'urine ou le lait : ainsi, il existe une relation linéaire entre le NH_3 ruminal et l'urée du lait ou du sang

(Sauvant *et al.*, 2001)

b - la synthèse des protéines microbiennes

Les microorganismes du rumen utilisent essentiellement l'ammoniac, et l'acide aminé pour synthétiser leurs propres protéines, appelées protéines microbiennes. Cette synthèse ne peut cependant avoir lieu qu'en présence d'une quantité suffisante d'énergie disponible pour les microorganismes. Donc pour qu'il y ait synthèse de protéines microbiennes, deux éléments doivent être présents en même temps: des matières azotées et de l'énergie. Si l'un est présent en

quantités plus faibles que l'autre, il sera le facteur limitant et déterminera la quantité de protéines microbiennes formées (Cuvelier, 2014)

Les protéines microbiennes produites dans le rumen subissent une digestion enzymatique dans la caillette par des protéases et des peptidases, ce qui engendre la formation d'acides aminés (Cuvelier, 2014). Ces acides aminés sont transportés dans les cellules intestinales, puis libérés dans le sang afin d'être absorbés par d'autres tissus (Berg *et al.*, 2013).

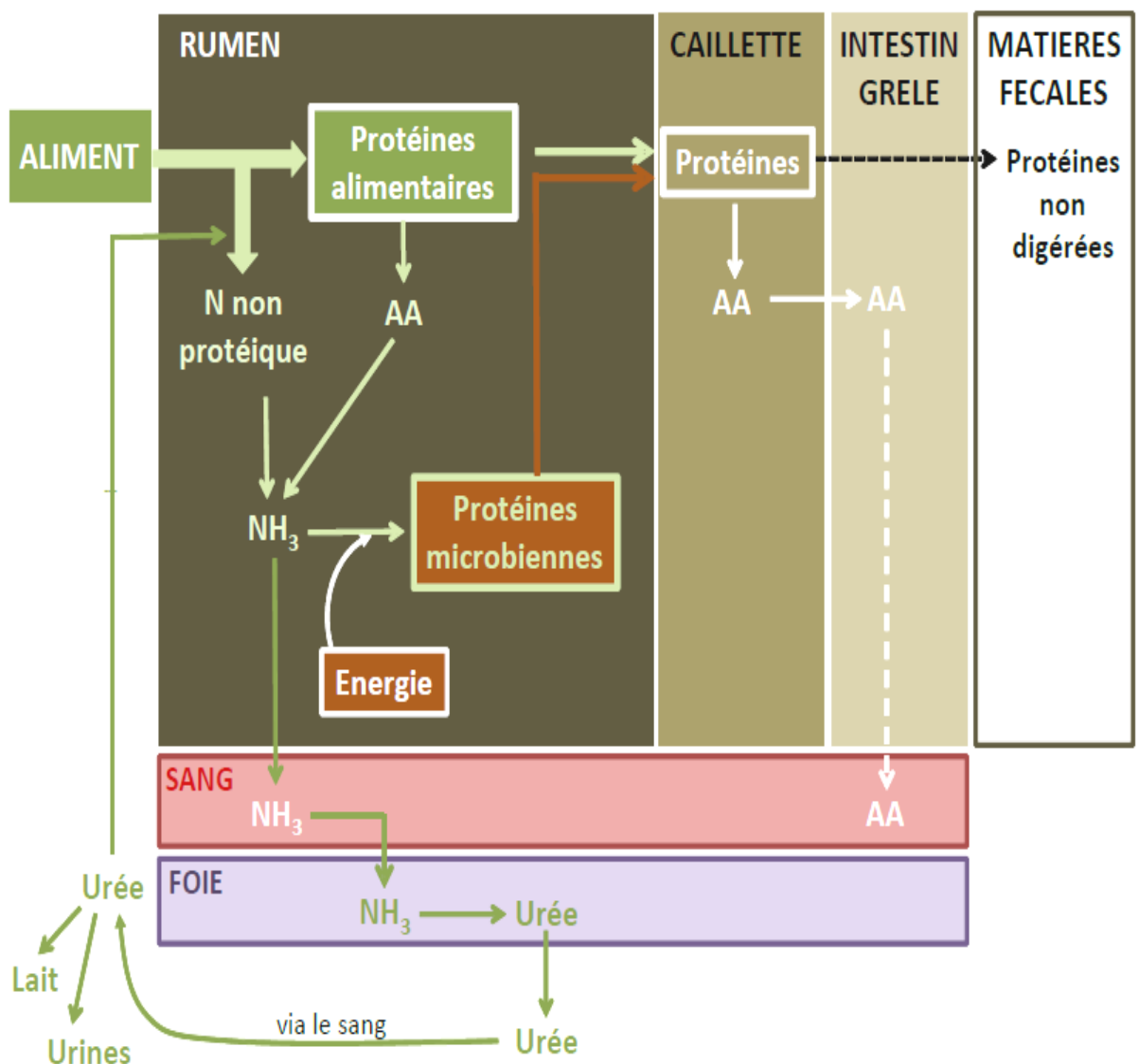


Figure 9 - Digestion des matières azotées chez les ruminants (Cuvelier *et al.*, 2014).

4 - Le recyclage des résidus de l'industrie agro-alimentaire dans l'alimentation des ruminants

4.1 - Les sous-produits de l'industrie agroalimentaires

Les sous-produits agroalimentaires sont des produits résidus qui apparaissent lors de processus de la fabrication ou bien pendant la distribution des produits finis. Un exemple peut être les résidus d'orange lors de la fabrication des produits fini tel que les boissons et les jus (Ademe, 2000).

Différents sous-produits sont considérés comme des aliments essentiels parce qu'ils possèdent une valeur alimentaire très importante pour les animaux.

Ils peuvent aussi apporter une amélioration à l'alimentation du bétail. La transformation des cultures commerciales, de l'industrie agroalimentaire et l'industrie des fibres est souvent la source de la majorité de ses sous-produits.

Par rapport aux produit de base, les sous-produits ont des prix compétitive alors ils peuvent être utilisés comme des aliments du bétail. Certain sous-produits alimentaires ont une variabilité de la composition chimique ce qu'est devenu très intéressant ce dernier temps.

En principe, l'évaluation des sous-produits ou déchets pour les ruminants ne diffère pas de l'évaluation des autres aliments du bétail, cependant il se peut qu'ils possèdent quelques inconvénients: ils contiennent souvent des contaminants indésirable d'origine organique ou inorganique, la variabilité dans leur composition et le faite qu'ils soient strictement saisonniers et locaux dans la production (Mirzaei-aghsaghali and Maheri-sis, 2008).

Les résidus d'oranges

Un nombre considérable des sous-produits d'agrumes peuvent être utilisé dans l'alimentation des ruminants en raison de la capacité des ruminants à fermenter les aliments qui sont riche en fibres dans le rumen (Aggoun, 2010).

En Algérie, une grande quantité de résidu est produite annuellement estimé selon le FAO à 1.488.00 tonne/an (2007). Les agrumes comportent plusieurs fruits tel que : l'orange (*Citrus sinensis* : 67.8% de la production mondiale), mandarine (*C. reticulata* : 17.9%), citron (*C. limon* : 6.3%), pamplemousse (*C. paradisi* : 5.0%).

Le sous-produit est obtenu après extraction de jus de fruit d'agrumes. Le sous-produit comporte souvent trois fractions: l'écorce, les pépins et la pulpe riche en sucres, en pectines et en parois peu lignifiées (Rihani, 1991).

L'orange *Citrus sinensis* est un agrume, fruit des orangers, des arbres de différentes espèces de la famille des Rutacées ou d'hybrides de ceux-ci. Elle est cultivée dans les régions chaudes, comme les pays méditerranéens par exemple. Plusieurs types existent et qui sont essentiellement issues de l'espèce *Citrus sinensis* comme les oranges sanguines et les oranges amères produites par le bigaradier. Comestible et considéré comme une source importante de vitamine C, c'est le quatrième fruit le plus cultivé au monde.



Figure 10 - Fleurs et fruits d'un oranger (*Citrus sinensis*)

Tableau 7 - La classification botanique des résidus d'oranges (Anonyme, 2017).

<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Classe</u>	<i>Equisetopsida</i>
<u>Sous-classe</u>	<i>Magnoliidae</i>
<u>Super-ordre</u>	<i>Rosanae</i>
<u>Ordre</u>	<i>Sapindales</i>
<u>Famille</u>	<i>Rutaceae</i>
<u>Genre</u>	<i>Citrus</i>

4.2 - Les aliments fibreux

Dans les pays en voie de développement, les fourrages ont un caractère fibreux et relativement riche en lignocellulose. Ils se caractérisent par une digestibilité souvent très faible et une carence en nutriment substantiels tel que les protéines, l'azote non protéique et les minéraux (Julier et Huyghe, 2010).

4.2.1 - Les cardes

Chardon-Marie (*Silybum marianum*) est une plante fibreuse de la famille Astéracées. Il est facilement reconnaissable à ses feuilles vertes pale brillantes et épineuses marbrées de blanc. Il affectionne particulièrement les lieux secs et ensoleillés, souvent sur sol acide. Très fréquent sur le pourtour méditerranéen, il est pratiquement absent au nord de la Loire (à l'exception des côtes atlantiques) et ne dépasse en principe pas 700 m. d'altitude.



Figure 11 - Cardes en fleurs (*Silybum marianum*)

Tableau - 8 La classification botanique des cardes (Anonyme, 2017).

<u>Règne</u>	<i>Plantae</i>
<u>Division</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe</u>	<i>Magnoliopsida</i>
<u>Ordre</u>	<i>Asterales</i>
<u>Famille</u>	<i>Asteraceae</i>
<u>Genre</u>	<i>Silybum</i>

5 - Les sources d'azote alternatives

5.1 - Le bicarbonate d'ammonium

Le bicarbonate d'ammonium est un composé inorganique, c'est un sel de bicarbonate de l'ammonium, sous forme d'une poudre blanche, qui se dissout entièrement dans l'eau (Loliger, 2000). Il n'est pas toxique pour les êtres vivants, il constitue une source importante de l'azote, 30-50 % des protéines microbiennes du rumen peuvent être recyclé à partir l'ion de l'ammonium (Morrison, 2000).

5.2 - Le nitrate de potassium

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

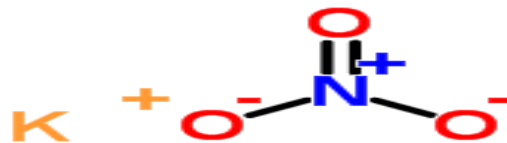


Figure - 12 Structure de nitrate de potassium (Anonyme, 2017)

Le schéma global du métabolisme du nitrate dans le rumen est illustré dans la figure 18. Selon les organismes il existe deux voies: une voie d'utilisation du nitrate et une voie de dégradation du nitrate.

Dans la voie d'utilisation: le nitrate KNO_3 (qui est une source azote non organique), la dissociation de ce sel dans les solutions aqueuses donne les ions potassium (K^+) et les ions nitrates (NO_3^-). Les ions nitrates (NO_3^-) sont réduits en ions nitrites (NO_2^-) par la nitrate réductase puis en hydroxylamine (NH_2OH) grâce à la nitrite réductase, et ensuite en ammoniaque par l'hydroxylamine réductase. Cette ammoniaque est utilisée comme source d'azote par les microorganismes du rumen mais pas comme source d'énergie. L'ammoniaque peut être transformé en acide aminé qui sera utilisé par les microorganismes pour la synthèse des protéines microbiennes (Yang *et al.*, 2016)

L'autre voie de dégradation ne concerne pas les microorganismes du rumen car ces microorganismes n'ont pas la capacité de transformer les nitrites (NO_2^-) en azote atmosphérique (N_2) (figure13).

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

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

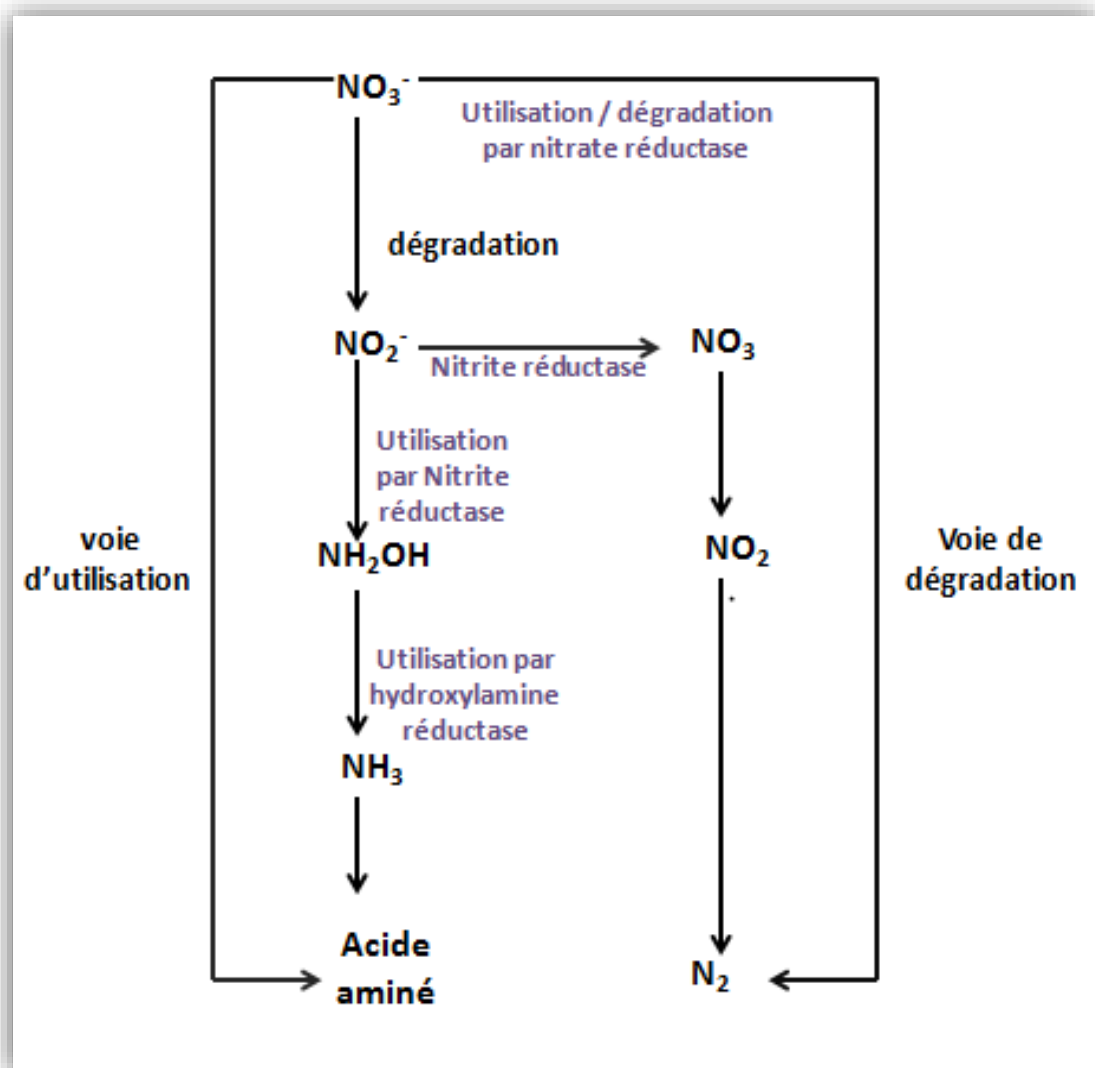


Figure 13 - Utilisation et dégradation de nitrate et nitrite (Yang *et al.*, 2016).

4.3 - Glutamate de sodium

Le glutamate de sodium est un composé organique, est un sel sodique de l'acide glutamique, l'un des acides aminés non essentiels les plus abondants dans la nature.

Le glutamate est un acide aminé comportent deux groupes carboxyliques (figure14) (Berg, 2013).

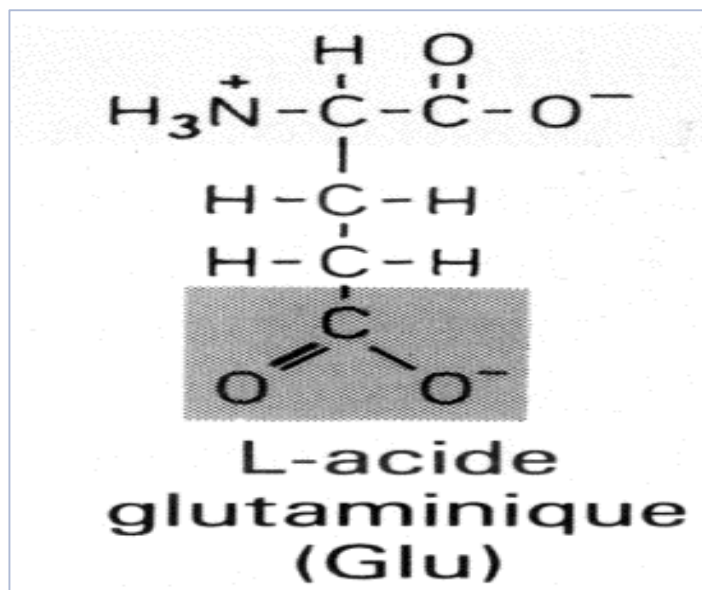


Figure 14 - Structure de l'acide glutamique (Alberts *et al.*, 1986).

5.4 - L'extrait de levure

Les protéines (acides aminés et peptides) constituent le composé majeur des extraits de levure. Bénéfique pour le métabolisme ruminal. 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).

Les levures probiotiques sont largement utilisées chez l'affouragement animal. Le but principal pour l'usage de tels additifs dans des régimes de ruminant est d'empêcher le rumen les désordres de flore et les perturbations, particulièrement ceux se sont associés avec la consommation des concentrés de haute énergie pour soutenir la productivité élevée en lait et viande intensifs. (Fonty and Chaucheyras-Durand, 2006).

Métabolisme des protéines et des acides aminés: l'extrait de levure et le glutamate

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

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

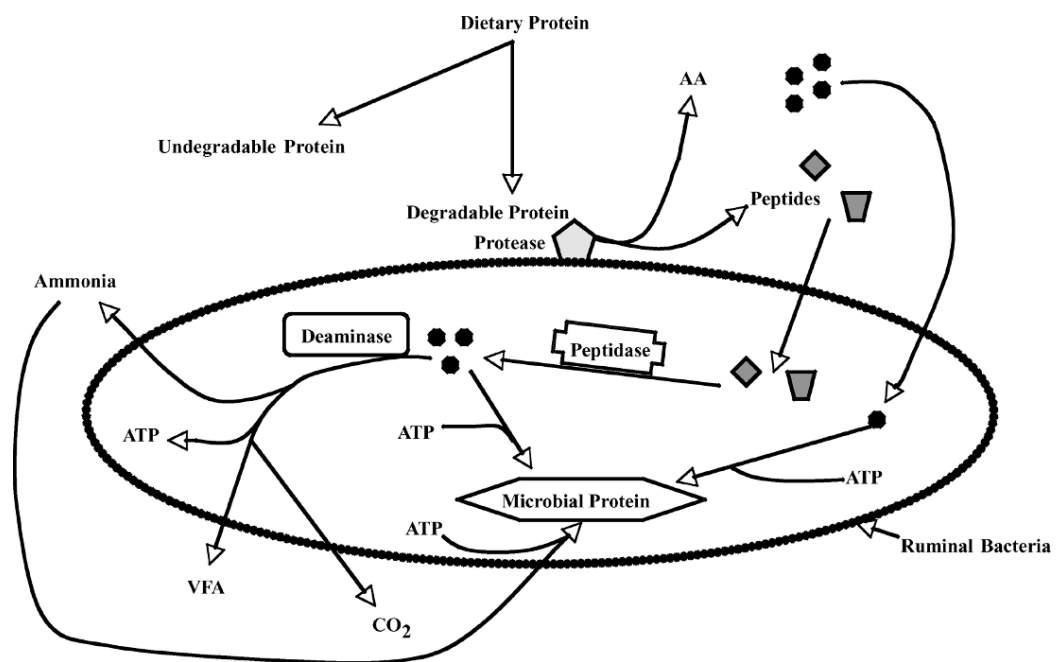


Figure 15 - La dégradation des protéines et leurs produits finaux dans le rumen (Bach *et al.*, 2005).

Tableau - 9 Composition, toxicité et prix des sources d'azote alternatives.

Sources d'azote	Type de la source	Formule	Composition	Toxicité	pH	Prix en Euro/Kg
Bicarbonate d'ammonium	Inorganique	NH ₄ HCO ₃	N.....17,72% H.....6,37 % C.....15,19 % O.....60,71 %	Non toxique	8,8_9,8	503 Euro/Kg
Nitrate de potassium	Inorganique	KNO ₃	N.....13,86 % K.....38,62 % O.....47,52 %	toxique	6,0_8,0	252 Euro/Kg
Glutamate de sodium	Organique	C ₅ H ₈ NNaO ₄	N.....8,28% H.....4,77% Na.....13,59% O.....37,84%	Non toxique	7	5.33 Euro/Kg
Extrait de levure	Organique		N.....11 % Protéine.....27,89 % Calcium.....0,08 % Magnésium.....0,18 % Phosphore.....0,10% Sodium.....36 % Vitamine E.....0,097% Vitamine D.....0,014% Vitamine C.....0,097% Vitamine B.....0,013%	Non toxique	6,8_7,2	63.4 Euro/Kg

6 - Aspects environnementaux

Les oses produits, au cours de la dégradation des polymères pariétaux sont fermentés en anaérobiose et conduisent à la formation d'acides gras à courte chaîne: acides acétique, propénoïque, butyrique, valérique et caproïque, et de gaz (CO₂ et CH₄). La dégradation de la cellulose conduit principalement à la formation de l'acétate et de l'hydrogène qui est utilisé pour la synthèse du méthane. Chez les ruminants, le méthane est un gaz à effet de serre produit au cours des fermentations digestives ce qui permet d'éviter l'accumulation d'hydrogène libre et traduit un bon fonctionnement du rumen. Le méthane est rejeté par éructation dans l'atmosphère ce qui représente à la fois une perte sur la quantité d'énergie fixée par les animaux d'élevage et

une contribution à l'effet de serre. Si l'aspect énergétique a prévalu jusqu'à ces dernières années, c'est plutôt l'impact climatique des rejets qui décide aujourd'hui l'orientation des recherches dans ce domaine (Briki et Debab, 2009).

Donc pour réduire la méthanogenèse ruminale le nitrate de potassium (KNO_3) a été proposé par les chercheurs comme source d'azote qui limite la synthèse du méthane à partir de H_2 et CO_2 dans le rumen. (Haddi, 2017).

Objectif du travail

Notre étude vise à étudier *in vitro* l'effet des différentes sources d'azote organique : glutamate de sodium, extrait de levure et inorganique : bicarbonate d'ammonium, nitrate de potassium sur l'activité métabolique de la flore ruminale en présence de deux sources d'énergie : une source d'énergie non fibreuse (les résidus d'orange) et une source d'énergie fibreuse (les cardes). L'activité métabolique est déterminée par la mesure du volume de gaz dégagé au cours de la fermentation de ces sources d'énergie.

Chapitre II Matériel et Méthodes

1 - Matériel

1.1 - L'inoculum et l'animal donneur

Les animaux utilisés dans cette étude sont des veaux ayant un poids variable entre 300-400 kg. Ils reçoivent, en général, un régime alimentaire d'engraissement riche en maïs.

Le liquide ruminal a été recueilli immédiatement (5 à 10 minutes) après l'éviscération de bovins sacrifiés à l'abattoir d'El Khroub (Constantine) et transporté immédiatement au laboratoire dans des thermos fermés et préalablement aseptisés.

1.2 - Sources d'énergie

Deux substrats de nature végétale ont été utilisés comme sources d'énergie et dont la composition est reportée dans le tableau 10 il s'agit :

- **des résidus d'oranges**, sous-produit de l'industrie agroalimentaire, obtenus par transformation des déchets d'orange selon la procédure décrite par Ferhaoui et Halilef (2013). Ces résidus constituent un substrat énergétique non fibreux.
- **des cardes** (*Sylibum marianum*). Cette plante constitue un substrat énergétique fibreux. Elle a été prélevée au mois de mai à Constantine, en période de la floraison.

Les cardes sont préparées dans notre laboratoire selon la technique suivante :

- On coupe les feuilles, les tiges et les fruits en petites morceaux à l'aide d'un ciseau sur papier aluminium propre.
- On sèche ces morceaux dans une étuve réglée à une température de 75 °C pendant 96 h.
- Ensuite on écrase l'échantillon dans un mortier, puis on tamise le produit (pores de 1 mm)
- les grands morceaux restant dans le tamis sont broyés en particules homogènes à l'aide d'un broyeur électrique puis tamisés à 1mm.
- En dernier lieu, on utilise des sachets de congélation pour conserver les échantillons tamisés (1mm de grosseur).

Tableau 10 - Composition chimique des résidus d'oranges et des cardes. (Tagliapietra, 2015)

substrats	Matière sèche (g/kg)	NDF	ADF	Lignine (sa)	Pectine	Protéine brute (mg/kg MS)	NDICP	ADICP	Extrait d'éther	cencre	NSC	NO ₃ -N (g/kg MS)
Les cardes	881	688	524	86	–	43	19	14	6	130	14	328
Les Résidus d'orange	211	257	117	-	250	57	4	3	6	26	655	-

Le tableau 10 montre la différence entre la composition chimique de deux sources d'énergie: une source d'énergie fibreuse (les cardes), et une source d'énergie non fibreuse (les résidus d'oranges).

Les résidus d'orange sont pauvres en constituants pariétaux, dépourvus de lignine, riches en pectine et en sucres facilement fermentescibles alors que les cardes sont plutôt de nature fibreuse riche en NDF (fibres neutres) et ADF (fibres acides) qui sont difficilement dégradables (Tagliapietra, 2015).

1.3 - Sources d'azote organique et inorganique

Quatre substrats azotés ont été utilisés comme sources d'azote.

Deux sources d'azote organique :

- l'extrait de levure (11% N)
- le glutamate de sodium ($C_5H_8NNaO_4$, H_2O , MM: 187.13 g, 9,52% N)

Deux sources d'azote inorganique :

- le bicarbonate d'ammonium ($NH_4 CO_3$, 17.72 % N, MM: 79.06 g)
- le nitrate de potassium (KNO_3 , 85% N, MM: 101.10 g)

2 - Analyse des caractéristiques physico-chimiques du liquide ruminal

Le contenu ruminal peut être caractérisé par quelques paramètres physico-chimiques: matière sèche, pH, etc. Dans notre travail, seul le pH et la matière sèche ont fait l'objet de mesure.

2.1 – Mesure du pH

Le pH du liquide ruminal est mesuré directement après son arrivée au laboratoire à l'aide d'un pH mètre portable, préalablement étalonné en utilisant des solutions de pH défini à 25 °C

(tableau11). Ces solutions sont utilisées afin de vérifier que le pH mètre donne des valeurs exactes.

Tableau 11 - Composition des solutions étalons

Tampons	Concentration (g/l)	Masse Molaire (g/l)	pH à 25 °C
Phosphate E	KH ₂ PO ₄ = 1.179 Na ₂ HPO ₄ = 4.30	KH ₂ PO ₄ = 136, 09 Na ₂ HPO ₄ = 141,96	7,41
Phosphate D	KH ₂ PO ₄ = 3.39 Na ₂ HPO ₄ = 3.53	KH ₂ PO ₄ = 136,09 gNa ₂ HPO ₄ = 141,96	6,86
Tartrate	KHC ₄ H ₄ O ₆ = 6.398	KHC ₄ H ₄ O ₆ = 188,18	3,56
Phtalate	KHC ₈ H ₄ O ₄ = 10.12	KHC ₈ H ₄ O ₄ = 204,23	4,01
Borate	Na ₂ B ₄ O = 73.8	Na ₂ B ₄ O ₇ = 201,22	9,18

2.2 – Mesure de la température

La température est mesurée à l'aide d'un thermomètre à mercure elle est exprimée en °C.

3 - Le taux de matière sèche du liquide ruminal

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

Protocole expérimental: méthode dite de la double pesée

Une prise d'essai de 5 g du liquide ruminal frais est placée dans un creuset en porcelaine, préalablement taré (P1) et mis à l'étuve à 105 °C pendant 12 heures jusqu'à un poids constant. A la sortie de l'étuve le creuset est rapidement placé dans un dessiccateur pendant 30 mn pour le refroidir dans une atmosphère sèche afin d'éliminer tout risque d'absorption de l'humidité extérieure. Il est pesé une deuxième fois (P2).

Tout le matériel utilisé est lavé au détergent et l'eau de robinet, puis rincé à l'eau distillée et séché dans l'étuve à 104° C.

Expression des résultats

Le pourcentage de matière sèche (% MS) et % d'humidité est calculé de la manière suivante :

Le taux de la matière sèche:

$$\% MS = 100 \times MS / MF$$

MS: la matière sèche est calculée comme suit: MS = P₂-P₀

MF: la matière fraîche, est calculée comme suit: $MF = P_1 - P_0$

P₀: le poids du creuset vide (tare).

P₁: le poids du creuset avant séchage.

P₂: le poids du creuset après séchage + tare.

Le taux d'humidité:

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

Les valeurs obtenues sont la moyenne de trois répétitions.

4 - Les taux des matières organique et minérale du liquide ruminal

La matière sèche est placée dans un four à moufle réglé à 550 °C pendant 12 h. La perte de poids correspond à la matière organique et le reste représente la matière minérale.

Protocole expérimental : Méthode dite ‘Perte au feu’

La quantité de matière sèche déjà obtenue dans le même creuset en porcelaine est mise dans un four à moufle à 550°C pendant 12 heures. Après, refroidissement à l'intérieur du four puis dans dessiccateur pendant 30 mn (figure 11).

Expression des résultats :

La matière minérale (MM) est calculée par la relation suivante:

$$\% MM = 100 \times MM / M$$

MS: la matière sèche est calculée comme suit : $MS = P_2 - P_0$

MM: la matière minérale est calculée comme suit : $MM = P_3 - P_0$

P₀: le poids du creuset vide

P₂: le poids du creuset après dessiccation.

P₃: le poids du creuset après incinération.

La matière organique est donnée par la relation suivante:

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

Les valeurs obtenues sont la moyenne de trois répétitions.



Figure 16 - Matière organique dans le dessiccateur après incinération.

5 - Evaluation de la teneur en matières sèche, organique et minérale des résidés d'oranges et des cardes.

Pour ce qui est du résidu d'oranges et des cardes nous avons suivi les mêmes procédures que pour l'évaluation des différentes matières (MS, MM, MO) du liquide ruminal.

La seule différence réside dans la prise d'essai (2 g pour les résidus d'orange et 5 g pour les cardes).

6 - Etude des caractéristiques microbiologiques du liquide ruminal

6.1 - Coloration de Gram et évaluation du rapport Gram+/Gram-

L'étude des caractéristiques microbiologiques du liquide ruminal passe par un examen microscopique de quatre types de frottis chacun correspondant à:

- frottis du liquide ruminal tel quel dès son arrivée (LRTQ).
- frottis du liquide ruminal filtré à travers deux couches de tissus en mousseline (LRF).
- frottis du liquide ruminal mélangé avec le milieu tamponné réduit inoculé après épuisement.
- frottis après fermentation du liquide ruminal mélangé avec le milieu tamponné réduit inoculé dont on a ajouté les sources d'azote et d'énergie.

Protocole expérimental

-A l'aide d'une pipette Pasteur, chaque type de frottis est étalé à plat sur trois lames et séché à la flamme d'un bec bunsen pour le fixer.

-Les frottis sont soumis à la coloration de Gram des anaérobies selon Kopeloff (tableau 12)

Tableau 12 - Procédure de la coloration de Gram selon Kopeloff

Préparation des solutions :	Procédure de coloration :
<p><i>Cristal violet alcalin :</i></p> <p>Solution A: On dissout 10 g de cristal violet dans 1000 ml d'eau distillée</p> <p>Solution B : on dissout 50 g de NaHCO₃ dans 1000 ml d'eau distillée.</p>	<p>On fait agir le cristal violet (solution A) sur la préparation, puis on ajoute 5 gouttes de la solution B pendant 30 sec.</p> <p>On rince à l'eau de robinet pendant 2 à 3 secondes.</p>
<p><i>Solution d'iodo-ioduré:</i></p> <p>On dissout 4 g de NaOH dans 25 ml d'eau distillée, on ajoute 20 g d'iode et 1 g de KI bien dissoudre, on ajoute graduellement 975 ml d'eau distillée, en agitant correctement à chaque ajout</p>	<p>On couvre le frottis avec la solution du mordant (KI+I) pendant 60 secondes.</p> <p>On rincer à l'eau de robinet pendant 2 à 3 seconds.</p>
	On éponge l'eau avec un buvard propre.
<p><i>Solution de mélange décolorant:</i></p> <p>On mélange de 300 ml d'alcool acétone + 700 ml d'alcool éthylique 95%</p>	<p>On décolore au maximum pendant 15-20 seconds.</p> <p>On rince à l'eau immédiatement.</p>
	On éponge l'eau en excès.
<p><i>Solution de contre colorant:</i></p> <p>On dissout complètement 20 g de safranine dans l'alcool à 95 %, ensuite on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée.</p>	<p>On recouvre de la solution de contre colorant pendant 20 secondes.</p>
	<p>On rince à l'eau de robinet</p> <p>On sèche avant d'examiner le résultat pour éliminer les traces d'eau.</p>

6.2 - Etude morphologique de la flore bactérienne du liquide ruminal

Pour l'étude morphologique de la flore bactérienne du liquide ruminal, on analyse cinq champs microscopiques au grossissement de 1000x, pour chaque lame. Les différentes formes bactériennes existantes avec le mode de regroupement ont été observées dans le liquide ruminal tel quel, filtré et mélange avec le milieu d'épuisement réduit et le milieu d'épuisement réduit inoculé après fermentation des différentes sources d'azote et d'énergie dans le milieu tamponné réduit et inoculé.

7 - Épuisement de l'azote et de l'énergie résiduels dans l'inoculum

Le liquide ruminal contient inévitablement des débris végétaux qui sont des sources d'énergie et d'azote. Afin d'éliminer au maximum ces deux sources, le liquide ruminal est d'abord filtré puis un épuisement de l'azote et l'énergie résiduels est réalisé dans un milieu tamponné contenant 0.5 g/l du cellobiose. Ce dernier est ajouté comme source d'énergie supplémentaire pour que les bactéries de l'inoculum continuent à utiliser l'azote résiduel. L'incubation dure 24 h à 39 °C et à pression constante.

Pour déterminer l'effet des différents substrats azotés seuls ou bien combinés avec les deux sources d'énergie (qui sont les résidus d'oranges et les cardes) sur la flore ruminale, nous avons effectué des fermentations *in vitro*. Un épuisement de l'azote et de l'énergie résiduels est nécessaire avant chaque fermentation. Durant cette phase la flore ruminale va utiliser la source d'énergie et d'azote ramenée avec le liquide ruminal filtré.

L'absence de production de gaz indique que le milieu est totalement épuisé.

La durée d'épuisement est déterminée en fonction de la nature de l'inoculum et de l'alimentation de l'animal:

- S'il s'agit des bovins engraisés par des rations riches en maïs, beaucoup d'énergie sera ramené dans l'inoculum. L'épuisement peut atteindre une durée de 24 heures.

-S'il s'agit des bovins ayant reçu des rations à base d'herbe ou paille, ce qui veut dire que la ration est riche en fibre, faible en énergie. La durée d'épuisement sera limitée à environ 6 heures (Haddi, 2017).

Dans notre expérience nous avons travaillé avec des bovins engraisés par des rations à base de maïs (amidon). La phase d'épuisement est égale à 24 heures.

8 - Utilisation des sources d'azote comme source d'énergie

Pour évaluer si les sources d'azote sont également utilisées comme source d'énergie par la flore ruminale, un épuisement, suivi d'un ajout séparément de chaque source d'azote au milieu avec l'inoculum épuisé est réalisé. Il s'agit du bicarbonate d'ammonium, du Na-glutamate, du nitrate de potassium et de l'extrait de levure. L'incubation anaérobie à 39 °C à pression constante et qui dure 96 heures.

9 - Etude des caractéristiques fermentatives des différentes sources d'azote et d'énergie *in vitro*

9.1 - Préparation de la verrerie et du matériel

La stérilisation et l'aseptisation du matériel sont une étape importante pour diminuer tout risque de contamination.

- La stérilisation

Tout le matériel utilisé -flacons en verre stérilisable, pipettes, entonnoir, tuyauterie de transfert, tissus de mousseline, spatule- est préalablement lavée au détergent pour vaisselle et à l'eau de robinet. Le matériel est ensuite rincé à l'eau distillée. Puis il est couvert avec du papier aluminium pour une stérilisation à l'autoclave à 120 pendant 15 min, Après la stérilisation, les flacons sont immédiatement placés dans l'étuve à 105 °C pendant 15 min pour un séchage complet.

- L'aseptisation

Les douze bouchons, le thermos, préalablement lavés au détergent sont aseptisés avec de l'eau distillée stérile chaude et quelques gouttes d'eau de javel, puis rincés avec de l'eau distillée stérile chaude pour éliminer toute trace d'eau de javel.

La paille et les bains-marie sont aseptisés par l'eau distillée, quelques gouttes d'eau de javel, puis rincés à l'eau distillée.

Les bouchons qui sont liés à l'appareil de mesure de gaz doivent être secoués afin de les débarrasser de toute goutte d'eau pour éviter que l'eau n'entre dans la canalisation de l'appareil de mesure de gaz.

9.2 - La réalisation des conditions d'anaérobiose.

- Phase liquide

La stérilisation des milieux se fait dans l'autoclave afin de chasser l'O₂ de ces derniers.

Dans la phase liquide l'O₂ soit sous forme gazeuse, soit sous forme dissoute. Pour enlever l'O₂ qui est sous forme non-dissoute, on chasse ce dernier avec barbotage. Le barbotage avec du CO₂ se fait comme suit: la colonne de réduction comporte des copeaux de cuivre. Elle est reliée à deux bouteilles de gaz, l'une contenant de l'hydrogène et l'autre du dioxyde de carbone (CO₂).

La colonne de cuivre est chauffée à 300 C°. Lorsque le CO₂ traverse la colonne, le cuivre piège l'O₂ pour former l'oxyde de cuivre (CuO, réaction d'oxydation). Ensuite on ouvre la bouteille

d'hydrogène pour enlever toute trace d'oxygène, on ferme, puis on ouvre celle du CO₂. Les milieux sont saturés en CO₂ pour assurer l'anaérobiose.

Concernant la partie dissoute, on élimine l'O₂ par l'ajout de Na₂S qui piège les molécules d'O₂. La réduction est assurée par le virage de l'indicateur du potentiel d'oxydoréduction (résazurine) du bleu au rose avant de devenir incolore.

- La phase gazeuse

Dans la phase gazeuse qui se trouve dans la partie supérieure du flacon. Cette phase comporte tous les gaz d'air (O₂, N₂, H₂). Pour réduire cette phase, on élimine l'O₂ par l'injection du CO₂ pure. Donc tout l'air sera remplacé par le CO₂. La phase gazeuse devient réduite.

9.3 - Préparation de l'inoculum

Après sa collecte, le liquide ruminal est filtré à travers deux couches de gaze stérilisée à l'autoclave. Le filtrat est récupéré directement à travers un entonnoir en verre dans une fiole contenant les milieux tamponnés déjà réduits. L'opération se passe sous atmosphère d'anaérobiose et dans un ballon maintenu à 39 °C dans un bain-marie thermostaté à pression constante.

9.4 - Préparation des milieux

9.4.1 - Le milieu d'épuisement et de fermentation

La composition de ce milieu est donnée dans le tableau 13

9.4.1.1 - Inoculation et incubation du milieu d'épuisement

Protocole expérimental

- 20 g de bicarbonate d'ammonium sont introduits dans une fiole stérilisée contenant un volume d'eau stérilisée. Un indicateur de virage, la résazurine est ensuite ajoutée. On complète le milieu avec l'eau distillée stérile.

Le tout est homogénéisé à l'aide d'un barreau magnétique et placé dans l'autoclave pour une stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes pour chasser le maximum d'O₂.

- Après stérilisation, le milieu est refroidi dans un bain marie jusqu'à 39 °C avec barbotage sous flux continu de CO₂ pour empêcher la pénétration de l'O₂.

- La solution réductrice du milieu d'épuisement est préparée avec 16 ml de NaOH (1N), une quantité suffisante pour réduire de Na₂S, 40 ml d'eau distillée stérile, cette solution est ajoutée au milieu tamponné. La réduction est suivie par le virage de l'indicateur du potentiel d'oxydoréduction (résazurine) du bleu au rose avant de devenir incolore.
- Le pH est ajusté à 6,80 avec HCl 5 N ou NaOH 5 N.
- on enlève 200 ml du milieu tamponné réduit, puis on ajoute 200 ml du liquide ruminal filtré à travers 2 couches de mousseline dans le milieu à l'aide d'un entonnoir.
- Une quantité de 0.5 g de cellobiose/l est ajoutée à la fin.
- On incube le milieu à 39 °C pendant 24 heures à pression constante.
- la fiole contenant le milieu de fermentation est reliée par un tuyau, à une fiole qui contient déjà de l'eau distillée stérile. Le tuyau doit plonger dans l'eau ce qui permet la détection du gaz produit lors de la fermentation. Au niveau de l'ouverture de la fiole le tuyau est bloqué par une pince de Mohr. Après deux heures, on agite la fiole (qui contient le milieu de fermentation) trois fois vers la gauche et trois fois vers droite pour arriver à une bonne homogénéisation. Puis on ouvre la pince de Mohr légèrement pour permettre le passage du gaz produit à travers le tuyau. Une fois la production du gaz dans la fiole est détectée, on laisse le gaz se libérer pendant 24 heures d'épuisement.



Figure 17 a - Le milieu tamponné réduit inoculé avant épuisement



Figure 17 b - Le milieu tamponné réduit inoculé après épuisement

Tableau 13 - Composition du milieu d'épuisement et de fermentation

Milieu d'épuisement	Composition
	NaHCO ₃20 g/l Eau distillé.....760 ml Résazurine..... 124 ml Solution réductrice : NaOH (1N)..... 8 ml Na ₂ S.....une quantité suffisante pour réduire Eau distillé..... 40 ml
	liquide ruminal filtré.....200 ml
	Cellobiose.....0,5 g



a- milieu tamponné oxydé.



b c- milieu tamponné au cours de réduction.



d- milieu tamponné réduit.

Figure 18 - virage de couleur lors de réduction du milieu tamponné.

9.4.2 - L'ajout des sources d'énergie et des sources d'azote

La répartition des différents substrats azotés (bicarbonate d'ammonium, glutamate de sodium, nitrate de potassium et extrait de levure) et de la source d'énergie (résidus d'oranges) dans les douze flacons est illustrée dans le tableau 14.

- Les huit premiers flacons (du 1 à 8) qui comportent les différentes sources d'azote et d'énergie qui sont utilisés pour étudier l'effet des sources d'azote et d'énergie sur l'activité métabolique de la microflore ruminale.

- Les flacons 9 et 10 servent comme milieu de contrôle qui ne comporte pas une source d'azote. Ce milieu de contrôle est utilisé pour suivre la dégradation de la source d'énergie sans apport d'azote.

- Les flacons 11 et 12 servent aussi comme milieu de contrôle (blanc) qui ne comporte ni source d'azote ni source d'énergie. Il est utilisé pour vérifier si la source d'azote et de l'énergie résiduels de l'inoculum ont été totalement épuisés.

Tableau 14 - Répartition des différentes sources d'azote et d'énergie dans les flacons

Flacons (250 ml)	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12.
Sources d'azote (g)	Bicarbonate d'ammonium 0.056	Glutamate de sodium 0.115	Nitrate de potassium 0.012	Extrait de levure 0.091	Sans azote	Sans azote
Sources d'énergie (g)	0.10 de résidus d'oranges ou de cardes					Sans énergie

9.4.2.1 - Incubation après l'ajout des sources d'énergie et des sources d'azote

Protocole expérimental:

- Avant le transfert du milieu tamponné réduit inoculé vers les flacons, l'appareil de mesure de gaz et l'ordinateur sont allumés pour qu'ils soient prêts à détecter le gaz évacué pendant la fermentation.

- Les douze flacons stériles de 250 ml contenant la source d'énergie et les différentes sources d'azote (préalablement pesées dans du papier aluminium stérile) sont fermés avec des bouchons aseptisés et reliés aux canaux de l'appareil de mesure de production de gaz, puis placés dans un bain-marie réglé à 39 °C à pression constante.

- Dans chaque flacon, 100 ml du milieu d'épuisement inoculé sont transférés à l'aide d'un tuyau. Un autre tuyau assure l'injection d'un flux continu de CO₂ pour assurer l'anaérobiose durant tous les transferts.

- A chaque fois qu'un flacon est inoculé, il est hermétiquement fermé avec le bouchon en caoutchouc qui le lie directement à l'appareil de distribution de gaz pour garder les conditions d'anaérobiose. Il est ensuite agité pour arriver à une bonne homogénéisation. En dernier lieu, on place les flacons dans un bain à 39 °C pendant une durée d'incubation de 96 heures.

Les cinq essais que nous avons réalisés dans notre étude sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 15 - Tableau récapitulatif des différents essais

Les essais	Essai 1 22/04/2017	Essai 2 13/05/2017	Essai 3 19/05/2017	Essai 4 17/05/2017	Essai 5 10/06/2017
Phase d'épuisement	Sans épuisement	Avec épuisement	Avec épuisement	Avec épuisement	Avec épuisement
Les sources d'énergie	Résidus d'orange	Résidus d'orange	Les cardes	Sans énergie	Résidus d'orange
Les sources d'azote		bicarbonate d'ammonium, glutamate de sodium, nitrate de potassium et extrait de levure			

Ces essais ont été conduits selon les tableaux en annexe (annexe 1, 2, 3, 4, 5)

9.5 - Mesure du pH final après fermentation

Après 96 heures de fermentation, le pH final de chaque flacon est mesuré dans le but d'évaluer les changements de pH avant et après la fermentation.

10 - Suivi de l'activité métabolique de la flore ruminale

L'activité métabolique de la flore ruminale se traduit par la production de gaz (CO₂, H₂, CH₄, H₂O). Ce gaz est capté par un appareil de mesure de production de gaz en anaérobiose. L'appareil permet de mesurer la quantité de gaz produite dans chaque flacon donnant à chaque fois un signal lumineux (0,3 ml). Les signaux sont enregistrés et reportés graphiquement en fonction du temps d'incubation.

11 - Acquisition des données

L'activité métabolique de la flore ruminale est suivie par la mesure du volume de gaz produit. Au cours des fermentations, tous les spots émis lors de l'incubation en fonction du temps (96 heures) sont enregistrés grâce à une caméra.

Les temps exacts de tous les spots émis sont relevés. Chaque spot indique un volume de gaz dégagé de 0,3 ml. A l'aide du logiciel Excel, on reporte les données sur un feuillet Excel, ensuite on trace la courbe de la production de gaz en fonction de temps d'incubation.



Figure 19 - Appareil de mesure de gaz *in vitro*.

*Chapitre III Résultats et
discussion*

1 - L'analyse des caractéristiques physico-chimiques de l'inoculum

Le pH, la température, la matière sèche (MS), la matière organique (MO) et la matière minérale (MM) des différents liquides ruminiaux des bovins après leur abattage ont été mesurés. Les valeurs sont présentées dans les tableaux 16, 17, 18, 19, 20 et 21.

1.1 - pH

1.1.1 - Le pH avant la fermentation

Tableau 16 - pH du LRTQ, milieu tamponné réduit et milieu tamponné réduit inoculé, après épuisement.

Essais	LRTQ	milieu tamponné réduit	milieu tamponné réduit inoculé	Après épuisement
1 22/04/2017	6,01	6,87	=	=
2 13/05/2017	5,99	6,84	6,8	6,75
3 19/05/2017	4,80	6,87	=	6,66
4 27/05/2017	5,86	6,80	6,5	6,26
Moyenne	5,67	6,85	6,65	6,56
Ecart type	0,58	0,03	0,21	0,26

- Le pH du liquide ruminal dans les différents essais varie entre 4,80 et 6.01 selon le régime alimentaire des animaux et la période de collecte, avec une moyenne de 5.67 et un écart type de 0.58 (tableau 16) ce qui correspond à un pH favorable au développement des microorganismes du rumen vu que le pH optimal du rumen se situe dans une fourchette comprise entre 4.7 et 6.3 (Demarquilly *et al.*, 2002 ; Jouany, 1994).

- Le pH du milieu tamponné réduit dans les différents essais se situe entre 6.80 et 6.87 avec une moyenne de 6.85 et un écart type de 0.03 (tableau 16). Cette moyenne est ainsi optimale pour l'activité microbienne. Notre résultat est similaire à ceux rapportés par Amokrane (2010) qui a enregistré une valeur de pH du milieu tamponné réduit égale à 6.85.

- Après l'addition du liquide ruminal filtré au milieu tamponné réduit, une légère diminution dans les essais 2 et 4 est constatée, avec une moyenne de 6.65 et un écart type de 0.21 (tableau 16). Ce résultat peut être expliqué par l'effet du liquide ruminal filtré, mais il est toujours compatible avec l'activité métabolique de la microflore.

- Après 24 h d'épuisement de l'inoculum, les valeurs du pH dans les différents essais (2,3,4,5) sont comprises entre 6.26 et 6.75 avec une moyenne de 6.56 et un écart type de 0.26 (tableau 16). On observe que le pH diminue, cette baisse est due à la production d'acides gras volatils au cours de la fermentation après avoir ajouté 0.5 g/litre de cellobiose au milieu tamponné réduit comme source d'énergie supplémentaire pour que les bactéries de l'inoculum continuent à utiliser l'azote résiduel et d'autres substrats résiduels.

1.1.2 - Le pH après la fermentation des substrats

- Le pH après fermentation des différentes sources d'azote seules après épuisement de l'inoculum

Selon le tableau 17 on remarque une augmentation du pH dans tous les essais tous de 0,13 à 0,24 unités de pH. Cette augmentation résulte de l'accumulation d'ammoniaque qui provient de la dégradation des protéines microbiennes après la lyse cellulaire durant la phase stationnaire.

Tableau 17 - Variation du pH après 96 h de fermentation des différentes sources d'azotes après épuisement de l'inoculum

Flacons	Energie ajoutée	Source d'azote 100 mg/l	pH initial	pH final	Δ pH
1-2-3	0,0	Bicarbonate d'ammonium	6.29	6,52	0,24
4-5-6		Glutamate de sodium		6,42	0,13
7.8.9		Nitrate de potassium		6,46	0,17
10.11		Extrait de levure		6,43	0,15
12		0,0		6,42	0,13

L'augmentation la plus importante du pH est notée dans le cas du bicarbonate d'ammonium, car ce sel libère des ions ammonium qui alcalinisent le milieu quand l'énergie résiduelle est épuisée.

- Le pH après fermentation des sources d'énergie

- pH après fermentation des cartes après épuisement de l'inoculum

Tableau 18 - variation du pH après 96 h de fermentation des cartes après épuisement de l'inoculum

Flacons	Source d'énergie 1 g/l	Source d'azote 100 mg/l	pH initial	pH final	Δ pH
1-2	Cartes	Bicarbonate d'ammonium	6,66	6,75	0,095
3-4		Glutamate de sodium		6,75	0,09
5-6		Nitrate de potassium		6,78	0,12
7-8		Extrait de levure		6,75	0,09
9-10		0,0		6,73	0,07
11-12	0,0	0,0		6,83	0,17

Dans le cas des cartes une légère augmentation des pH finaux par rapport aux pH initiaux est observée. Cette augmentation est plus visible dans le cas du nitrate de potassium qui présente une certaine toxicité qui peut provoquer la lyse des cellules microbiennes due aux ions nitrites surtout où l'activité du nitrite réductase est faible ou absente.

L'absence d'azote et d'énergie dans le cas de l'inoculum épuisé seul (contrôle ou blanc), ne permet pas la croissance des cellules microbiennes de la microflore ruminale. Ces cellules donc s'autolysent, et l'ammoniaque libérée assure une très légère alcalinisation du milieu.

- pH après fermentation des résidus d'oranges après épuisement de l'inoculum

En ce qui concerne l'utilisation des résidus d'oranges comme source d'énergie, on remarque dans le tableau 19 une augmentation un peu plus importante du pH finaux par rapport à l'augmentation observée avec les cartes. Cette augmentation du pH est due à l'épuisement total de l'inoculum. Par contre, dans le cas des cartes l'inoculum a légèrement gardé l'énergie et l'azote résiduels parce que son épuisement n'était pas total.

Tableau 19 - Variation du pH après 96h de la fermentation des résidus d'orange après l'épuisement de l'inoculum

Flacons	Source d'énergie 1 g/l	Source d'azote 100 mg/l	pH initial	pH final	Δ pH
1-2	Résidus d'oranges	Bicarbonate d'ammonium	6,63	6,78	0,15
3-4		Glutamate de sodium		6,75	0,12
5-6		Nitrate de Potassium		6,79	0,16
7-8		Extrait de levure		6,73	0,10
9-10		0,0		6,80	0,17
11-12	0,0	0,0		6,8	0,17

Les pH finaux du l'inoculum seul (blanc) et inoculum avec les résidus d'oranges ont augmenté par rapport aux autres à cause de la lyse cellulaires et à la libération de l'ammoniaque (NH₃).

1.2 - Température

Les températures du liquide ruminal tel quel, du milieu tamponné réduit et du milieu tamponné réduit inoculé, ont été mesurées dans les différents essais et sont reportées dans le tableau 20.

Tableau 20 - Température (°C) du LRTQ, milieu tamponné réduit et du milieu tamponné réduit inoculé

Essais /date	LRTQ	Milieu tamponné réduit	Milieu tamponné réduit inoculé
1 26/04/2017	-	-	-
2 13/05/2017	31,7	39,0	38,7
3 19/05/2017	32,3	39,0	38,7
4 27/05/2017	31,5	39,0	38,7
5 10/06/2017	32,44	39,0	38,7
Moyenne	31,99	39,0	38,7
Ecart type	0,46	0,0	0,0

Alors que la température du liquide ruminal tel quel dans tous les essais varie de 31.5°C à 32.3°C, avec une moyenne de 31.8°C, et un écart-type est de 0.4. Cette température diminue au cours du transport de l'inoculum vers le laboratoire. Cette diminution n'est pas létale pour les

microorganismes du rumen mais elle n'est pas optimale pour leur croissance. Notre résultat est similaire aux résultats rapportés par Abba et Bouchaar (2016) qui ont noté une température du liquide ruminal tel quel égale à 32 °C.

La température du milieu tamponné réduit est la même dans tous les essais, avec une valeur de 39 °C, cette température est l'optimale pour la microflore ruminal (Brugère, 1983). Aussi la température du milieu tamponné réduit inoculé est identique (38,7 °C), ces températures sont maintenues grâce au bain-marie thermostaté. La température optimale est entre 39 à 40,5 °C (Dusart, 2014).

- Les caractéristiques physico-chimiques du liquide ruminal

1.3 - Les taux de la matière sèche, de la matière organique et de la matière minérale du liquide ruminal

La matière sèche, la matière organique et la matière minérale du liquide ruminal tel quel, ont été déterminées dans le dernier essai dans le but d'avoir une idée sur le régime alimentaire. Les valeurs sont présentées dans le tableau 21

Tableau 21 - Le pourcentage de la matière sèche, organique et minérale du liquide ruminal tel quel :

Creusets	Matière Sèche (% MF)	Humidité (% MF)	Matière Minérale (% MS)	Matière Organique (% MS)
1	23,23	76,77	4,24	97,76
2	24,51	75,49	6,34	93,66
3	25,63	74,37	6,82	93,18
<i>Moyenne</i>	<i>24,46</i>	<i>75,54</i>	<i>5,80</i>	<i>94,20</i>
<i>Ecart type</i>	<i>1,20</i>	<i>1,20</i>	<i>1,37</i>	<i>1,37</i>

Le contenu en matière sèche du liquide ruminal varie de 23,23 à 25,63 % dans le dernier essai, avec une moyenne de 24,46 % et un écart type de 1,20 du contenu ruminal. Ceci révèle un contenu ruminal assez liquide.

En ce qui concerne la matière organique et la matière minérale, le contenu ruminal est riche en matière organique et pauvre en matière minérale. La matière organique varie de 93,18 à 97,96 % avec une moyenne de 97,91 et un écart type de 2,02, alors que la matière minérale varie entre de 4,24 à 6,82 avec une moyenne 5,80 de et un écart type de 1,37.

2 - Analyse des caractéristiques microbiologiques de l'inoculum

2.1 - Analyse du rapport Gram+/Gram-

L'analyse microscopique de la microflore totale chez les bovins, après coloration de Gram et observation microscopique des lames révèle une dominance totale des bactéries Gram négatif par rapport aux bactéries Gram positif dans le liquide ruminal du bovin dans tous les essais (figure 15). Après filtration on remarque que le nombre des bactéries Gram + diminue parce que ces bactéries sont attachées soit aux particules alimentaire soit aux protozoaires, après filtration ces bactéries sont éliminées (figure 15). Après addition du milieu tamponné réduit au liquide ruminal filtré, on remarque dans tous les essais une nette diminution des bactéries Gram - et une grande quantité des bactéries Gram+ (figure 16). On remarque que les bactéries Gram - sont pratiquement disparues après la phase d'épuisement et de fermentation (figure 17, figure 18).

2.2 - Analyse morphologique de la flore ruminal

Après une analyse microbiologique on observe que le liquide ruminal du bovin est riche en formes microbiens (cocci, bacille et vibrion) avec différents modes de regroupement: cocci isolés en diplocoques, en chainettes, en amas et aussi cocci en tétra, des coccobacilles, des vibrions incurvés (figure 20). Après filtration on observe les mêmes formes que les précédents mais avec moins de densité (figure 21). On observe que les formes bactériennes sont pratiquement disparues, après la phase d'épuisement et de fermentation, due à la lyse cellulaire (figure 22, figure 23).

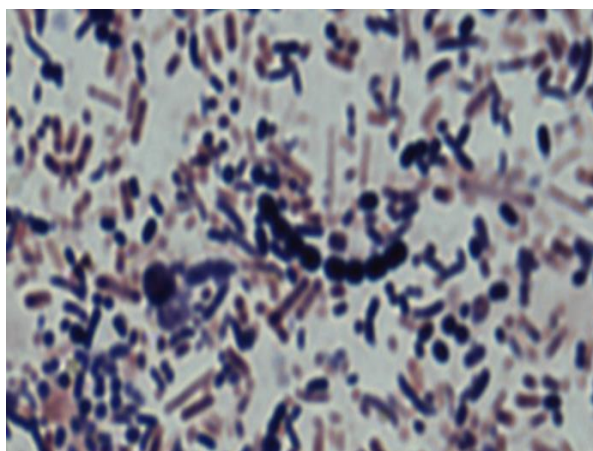


Figure 20 - Observation microscopique du liquide ruminal tel quel



Figure 21 - Observation microscopique du liquide ruminal filtré

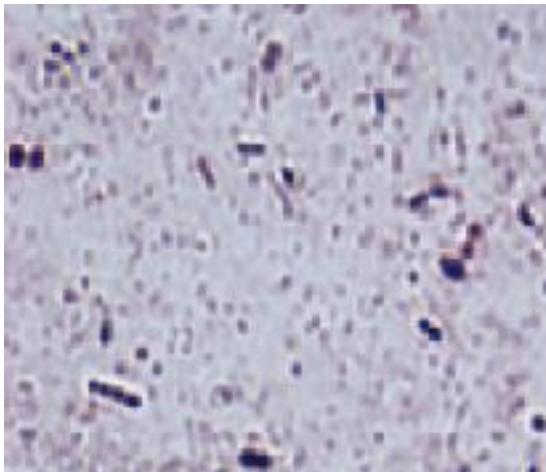


Figure 22 - Observation microscopique du liquide ruminal mixte

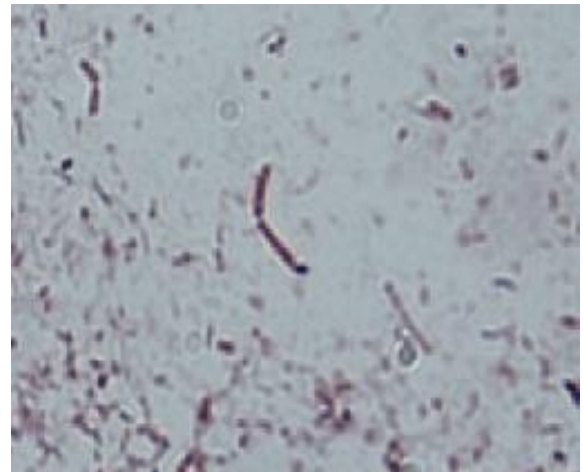


Figure 23 - Observation microscopique du liquide ruminal après filtration

3 - Analyse des caractéristiques des sources d'énergie

3.1 - Les caractéristiques des sources d'énergie : les résidus d'oranges et les cardes

Le tableau montre les résultats obtenus pour les taux de matière sèche, organique et minérale des résidus d'oranges et des cardes

Tableau 22- Taux de matière sèche résiduelle, organique et minérale des résidus d'orange et de cardes

	Matière Sèche résiduelle (% MF)	Humidité (% MS)	Matière Organique (% MS)	Matière minérale (% MS)
Résidus d'orange	89,19±0,62	10,81±0,62	95,66±0,48	4,34±0,48
Cardes	92,38±0,79	7,61±0,79	87,98±0,93	12,02±0,93

Le taux de la matière sèche résiduelle (MS) pour le résidu d'orange et les cardes est élevé avec une moyenne de 89.19 et 92.38 respectivement, et il se caractérise par un faible taux d'humidité de 10.81 et 7.61 respectivement. Ce ci révèle un contenu assez sec parce qu'il a été conservé après séchage dans des flacons ou sachets de congélations hermétiquement fermés. Les deux substrats étudiés (résidu d'oranges, cardes) présentent des taux élevés en matière organique où la valeur la plus élevée est observée chez les résidus d'oranges (95.66 % de MO) ; un taux moins élevé est observé chez les cardes (87.98 de MO) ; et par conséquent les deux substrats sont pauvres en matière minérale avec une moyenne de 4.34% pour le résidu d'orange et 12.02% pour les cardes.

4 - Cinétique de la dégradation des sources d'azote organiques et inorganiques

4.1 - Utilisation des sources d'azote comme source d'énergie

Est-ce que les microorganismes du rumen utilisent les sources d'azote comme source d'énergie ? Pour répondre à cette question, nous avons effectué des fermentations qui concernent uniquement les sources d'azote après 24 heures d'épuisement de l'inoculum dans le milieu tamponné réduit.

Durant cette fermentation l'extrait de levure donne un meilleur résultat (figure 15), il a démarré avec une phase de latence de 23 minutes et il a produit le plus grand volume de gaz (9,6 ml pour 10 mg de N/100 ml de milieu tamponné réduit inoculé épuisé), suivi du glutamate de sodium avec 6.6 ml, du bicarbonate d'ammonium (2.5 ml) et enfin du nitrate de potassium (1.5 ml). La production de gaz dans le milieu de contrôle (ne contenant ni source d'azote ni source d'énergie) est nulle et ne présente aucune activité métabolique. Ceci confirme que l'épuisement de l'azote et de l'énergie résiduel a été totalement achevé dans cet essai.

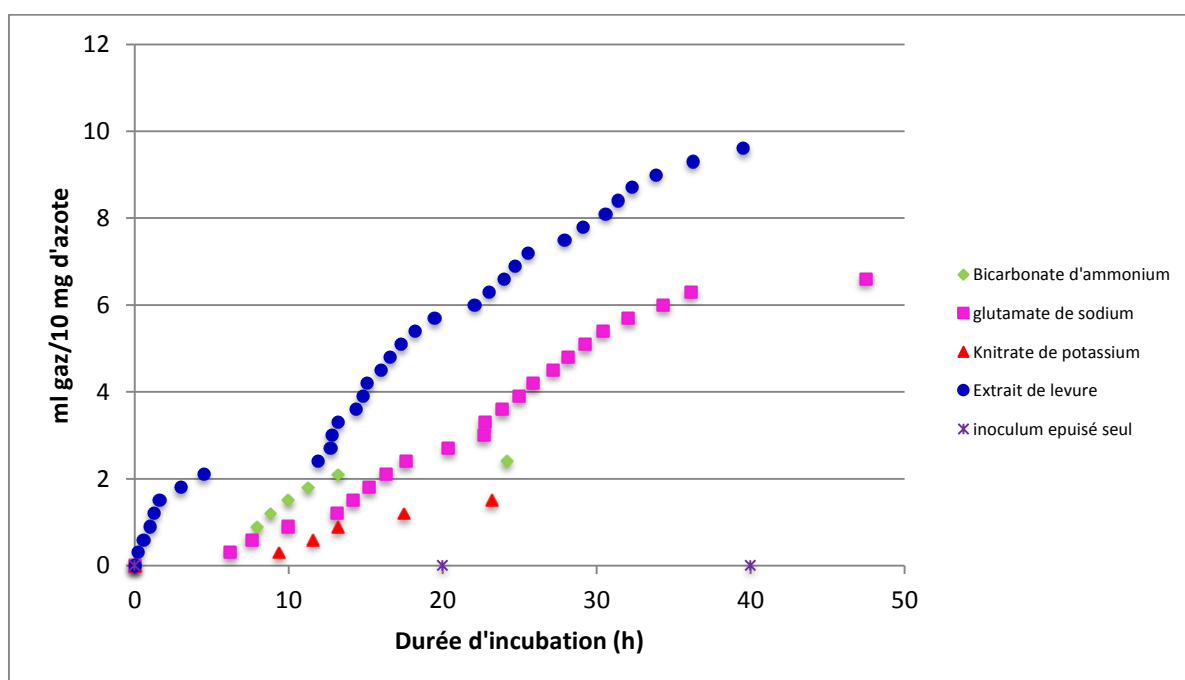


Figure 24 - Production de gaz par les sources d'azote (10 mg/100 ml du milieu tamponné réduit inoculé) comme source d'énergie.

Tableau 23 - Caractéristiques de la cinétique de l'utilisation des sources d'azote comme source d'énergie.

Type d'azote	Sources d'azote alternatif	Temps de latence (h)	Volume maximal de gaz (ml)
organique	Extrait de levure	10,16	5,1
	Glutamate de sodium	6,21	6,6
inorganique	Nitrate de potassium	9,38	1,5
	Bicarbonate d'ammonium	8,82	2,4

Le tableau 23 montre que les formes d'azote organique (extrait de levure, glutamate de sodium) produisent une quantité de gaz plus importante que les formes d'azote inorganique (nitrate de potassium, bicarbonate d'ammonium).

a - Le cas des sources d'azote organique

L'extrait de levure est une source d'azote organique, riche en protéines, peptides, acides aminés, acides organiques, glucides, vitamines etc. les cellules bactériennes dégradent les protéines exogènes à l'extérieur de la cellule en peptides et en acides aminés par des protéases attachées à la surface de la cellule bactérienne. Les acides aminés sont transportés à l'intérieur de la cellule et utilisés pour fabriquer des protéines microbiennes (Bach et *al.*, 2005).

Les peptides sont aussi transportés à l'intérieur de la cellule bactérienne, ils sont attaqués par des peptidases qui donnent des acides aminés. Ces acides aminés soit incorporées directement dans les protéines microbiennes, ou bien désaminés pour donner les AGV, l'ATP, CO₂ et l'ammoniac qui peut être utilisée par la cellule bactérienne pour fabriquer des protéines microbiennes (Bach et *al.*, 2005).

Par contre le glutamate de sodium est un acide aminé amphotère ayant deux groupements chimiques, (l'un carboxylique, et l'autre aminique) et une chaîne carbonée. La désamination du glutamate de sodium par la désaminase libère de l'ammoniac (NH₃) qui sert comme source d'azote pour certains microorganismes du rumen. Le squelette carboné (C₅) peut être utilisé comme source d'énergie (Bach et *al.*, 2005).

Par conséquent, les microorganismes du rumen favorisent l'utilisation de l'extrait de levure en raison de sa richesse aux composées azotées (protéines et peptides). Cela explique une production plus élevée de gaz.

b - Le cas des sources d'azote inorganique

- Dans le cas de nitrate KNO_3 (qui est une source azote non organique), la dissociation de ce sel dans les solutions aqueuses donne les ions potassium (K^+) et les ions nitrate (NO_3^-). Les ions nitrate (NO_3^-) sont réduits en ions nitrite (NO_2^-) par la nitrate réductase puis en hydroxylamine (NH_2OH) grâce à la nitrite réductase, et ensuite en ammoniacque par l'hydroxylamine réductase. Cette ammoniacque est utilisée comme source d'azote par les microorganismes du rumen mais pas comme source d'énergie.

- Le bicarbonate d'ammonium (qui est une source d'azote non organique) est un sel qu'est dissocie dans les solutions aqueuses et qui libère des ions ammonium (NH_4^+). Ces derniers sont utilisés par la flore bactérienne ruminale comme source d'azote. Le bicarbonate d'ammonium libère également des ions carbonates HCO_3^- qui peuvent être utilisés comme source d'énergie.

La dégradation des sources organiques (glutamate et extrait de levure) donne de l'ATP et du carbone. De ce fait, ces substances peuvent être utilisées comme source d'azote et d'énergie. Par contre la dégradation des sources inorganiques (bicarbonate d'ammonium, nitrate du sodium) ne produit pas d'ATP. Ces sources inorganiques ne sont pas des sources d'énergie, ce qui est traduit par une faible production de gaz.

5 - Cinétique de la dégradation des sources d'énergie en présence de différente source d'azote

5.1 - Les sources d'énergie fibreuses: les cardes

Après 96 h de fermentation, les cardes produisent le maximum de gaz avec l'extrait de levure 51,3 ml (pour 10 mg d'azote et 100 mg des cardes/100 du milieu tamponné réduit inoculé et épuisé) ; suivi de glutamate de sodium avec une production de gaz de 33,3 ml. Les sources d'azote organiques donnent des meilleurs résultats.

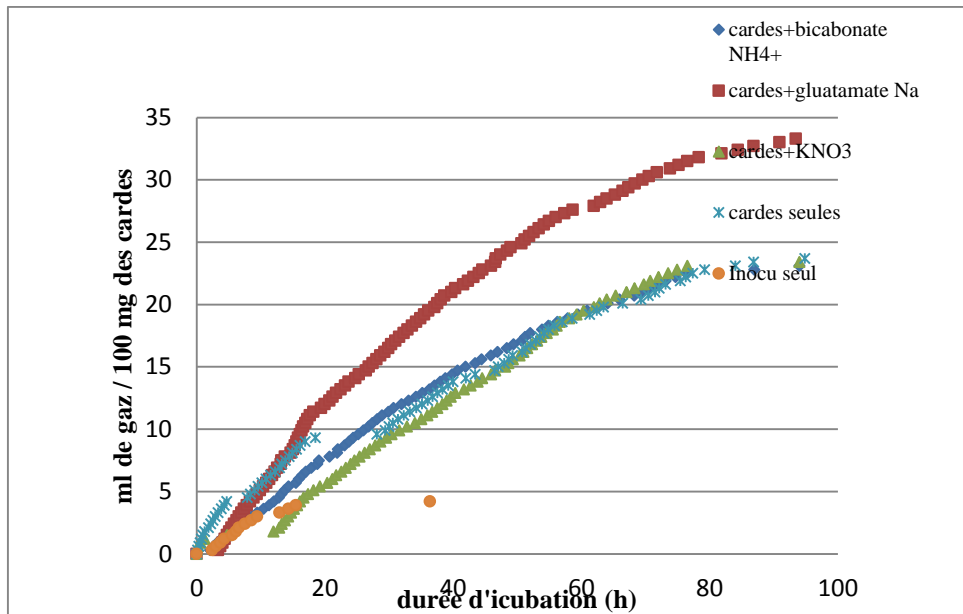


Figure 25 - Production de gaz par la fermentation des cardes (100 mg/100 ml) en présence des différentes sources d'azote (O E O N : pas d'énergie ni d'azote ajoutés à l'inoculum épuisé).

Les cardes soit seules, soit mélangées avec les sources organiques bicarbonate d'ammonium et nitrate ont donné pratiquement les mêmes résultats ; les courbes superposées reflètent ces résultats. Les cardes seules donnent le plus grand volume de gaz au départ, suivi du bicarbonate de sodium. Le nitrate de potassium, en dernier lieu, ralentit la production de gaz à cause de l'effet inhibitrice sur certains groupes bactériens (les bactéries méthanogènes). Après 24 h, les 3 courbes (Les cardes soit seules, soit mélangées avec les sources organiques bicarbonate et nitrate) sont apparues similaires avec une production de gaz de 23 ml. Donc l'ajout des sources d'azote inorganique aux cardes n'améliore en rien leur production de gaz parce que tous les trois donnent la même production finale de gaz.

En ce qui concerne l'inoculum seul (blanc), il a produit 4.2 ml de gaz. Ce résultat est obtenu même après 24 h d'épuisement. Cela prouve que l'épuisement n'est pas totalement achevé parce que l'inoculum que nous avons utilisé possède une consistance pailleuse.

Les formes d'azote organique stimulent la production de gaz contrairement aux autres formes d'azote inorganique qui n'ont aucun effet sur la cinétique de la production de gaz.

6.2 - Les source d'énergie non fibreuses: les résidus d'oranges

96 h après l'ajout de différentes sources d'azote et d'énergie au milieu tamponné réduit inoculé, on constate selon la figure 17 que ces sources commencent presque toutes au même temps une production de gaz considérable par rapport au blanc qui ne produit aucun gaz. Ceci est dû à l'épuisement total du milieu.

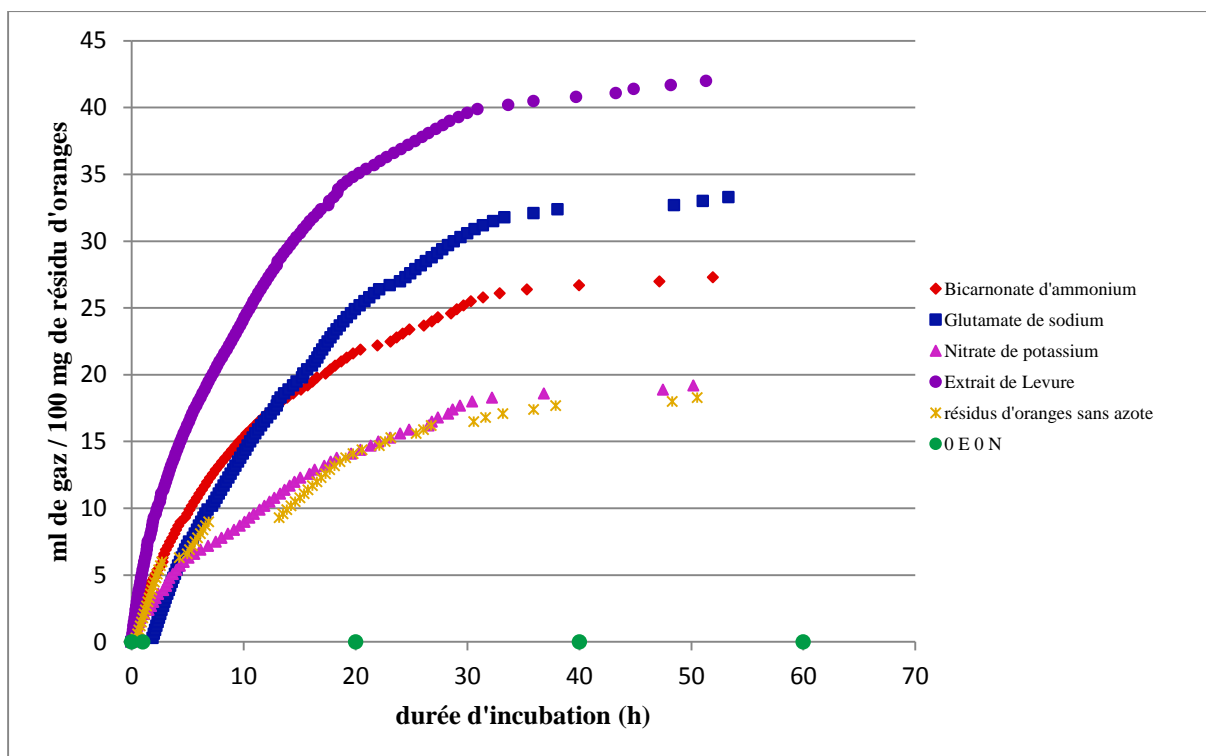


Figure 26 - Production de gaz par la fermentation des résidus d'oranges (100 mg/100 ml) en présence des différentes sources d'azote. (O E O N : pas d'énergie ni d'azote ajoutés à l'inoculum épuisé).

Durant cette fermentation, les résidus d'oranges combinés avec l'extrait de levure donnent également une production de gaz plus élevée de 42 ml ; suivi par le glutamate de sodium avec une production de 33.3 ml comme dans le cas de cardes. Donc les sources d'azote organique améliorent la production de gaz même si les sources d'énergie sont différentes.

Le bicarbonate de sodium stimule aussi la production de gaz dans le cas des résidus d'oranges contrairement aux cardes, ceci est due à leur composition chimique différente: les résidus d'oranges sont riches en sucres solubles et surtout en pectine contrairement au cardes (tableau 10).

Le nitrate de potassium donne une production de gaz de 19,2 ml qui est pratiquement semblable à la production de gaz des résidus d'oranges seuls (18,3 ml). On peut conclure que la quantité de nitrate de potassium qu'on a ajouté aux résidus d'orange ne tue pas les microorganismes mais n'améliore pas leur activité métabolique.

Conclusion

D'après nos résultats nous avons constaté que les sources d'azote organique (extrait de levure et glutamate de sodium) donnent la production de gaz la plus élevée par rapport aux sources d'azote inorganique (bicarbonate d'ammonium, nitrate de sodium, Donc les sources d'azote organique peuvent d'être utilisées comme une source d'énergie. Ces sources donneront des meilleurs résultats si elles sont accompagnées avec les sources d'énergie (les cardes et les résidus d'orange).

Conclusion

Conclusion

Dans le but d'évaluer l'effet des sources d'azote organique (extrait de levure, glutamate de sodium) et inorganique (bicarbonate de sodium, nitrate de potassium) sur la dégradation des sous-produits de l'industrie agroalimentaire (les résidus d'oranges) et des plantes fibreuses (les cardes) par la flore ruminale de bovins, nous avons effectué des fermentations *in vitro* de ces sources dans un milieu tamponné réduit.

Nous avons noté après 96 h de fermentation que les résidus d'oranges et les cardes produisent plus de gaz avec l'extrait de levure, suivi du glutamate de sodium, puis du bicarbonate de sodium qui produit plus de gaz dans le cas des résidus d'oranges et en dernier lieu du nitrate de potassium qui donne une faible quantité de gaz à cause de son effet inhibiteur sur l'activité métabolique de certains groupements bactériens. On constate que les sources d'azote organique stimulent l'activité métabolique de la flore ruminale plus que les sources d'azote inorganique.

Nous pouvons conclure qu'il y a une possibilité d'intégrer les résidus d'oranges et les cardes seuls ou en mélange dans l'alimentation ruminale. Ces sources d'énergie donneront des meilleurs résultats de dégradation par la flore ruminale s'ils sont accompagnés avec des sources d'azote organiques qui sont disponibles et qui sont moins chères. Nous pensons que cela va certainement contribuer à l'amélioration de l'élevage des ruminants.

Annexes

Annexe 1 - Essai 01 (la fermentation des résidus d'orange sans épuisement de l'inoculum)

Date: 22/04/2017

Canal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	bicarbonate NH ₄ ⁺	bicarbonate NH ₄ ⁺	glutamate Na	glutamate Na	KNO ₃	KNO ₃	Extrait de levure	Extrait de levure	0 N + 1g RO	0 N + 1g RO	0 N + O énergie	0 N + O énergie
Source d'azote	(g N/100 ml) 0.0566	(g N/100 ml) 0.0565	(g N/100 ml) 0.1159	(g N/100 ml) 0.1156	(g N/100 ml) 0.128	(g N/100 ml) 0.129	((g N/100 ml) 0.911	(g N/100 ml) 0.912	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote
Source d'énergie	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1047	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1042	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1049	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1042	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1042	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1047	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1043	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1042	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1045	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1047	pas d'énergie	pas d'énergie
Inoculum	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml	24 ml
Milieu tamponné	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Volume total	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml	124 ml
Code de lames	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9	F 10	F 11	F 12
pH final	6.95	6.93	6.92	6.94	6.93	6.92	6.91	6.93	6.93	6.92	7.04	7.04
Durée d'épuisement	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h	0 h

- Code lame LRTQ: LRTQ 1 - 2017

LRTQ 2 - 2017

LRTQ 3 - 2017

- Code lame LRF: LRF 1 - 2017

LRF 2 - 2017

LRF 3 - 2017

- Code lame LRM: LRM 1 - 2017

LRM 2 - 2017

LRM 3 - 2017

Annexe 2 - Essai 02 (la fermentation des résidus d'oranges après épuisement de l'inoculum)

Date: 13/05/2017

Canal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Glutamate Na	Glutamate Na	KNO ₃	KNO ₃	Extrait de levure	Extrait de levure	0 N + 1g RO	0 N + 1g RO	0 N + O énergie	0 N + O énergie
Source d'azote	(g N/100 ml) 0.0566	(g N/100 ml) 0.0565	(g N/100 ml) 0.1159	(g N/100 ml) 0.1156	(g N/100 ml) 0.0128	(g N/100 ml) 0.0129	(g N/100 ml) 0.0911	((g N/100 ml) 0.0912	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote
Source d'énergie	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1047	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1042	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1049	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1042	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1047	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1047	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1043	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1042	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1050	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1047	pas d'énergie	pas d'énergie
Inoculum	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Milieu tamponné	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml
volume total	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Code de lames	'F 1	'F 2	'F 3	'F 4	'F 5	'F 6	'F 7	'F 8	'F 9	'F 10	'F 11	'F 12
pH final	6.81	6.80	6.49	6.80	6.81	6.81	6.81	6.80	6.85	6.77	6.84	6.85
Durée d'épuisement	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h

- Code lame LRTQ: 'LRTQ 1

'LRTQ 2

'LRTQ 3 - 2017

- Code lame LRF: 'LRF 1

'LRF 2

'LRF 3 - 2017

- Code lame LRM: 'LRM 1

'LRM 2

'LRM 3 - 2017

Annexe 3 - Essai 03 (la fermentation des cartes après épuisement de l'inoculum)

Date: 19/05/2017

Canal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Glutamate Na	Glutamate Na	KNO ₃	KNO ₃	Extrait de levure	Extrait de levure	0 N + 1g RO	0 N + 1g RO	0 N + O énergie	0 N + O énergie
Source d'azote	(g N/100 ml) 0.0568	(g N/100 ml) 0.567	(g N/100 ml) 0.1157	(g N/100 ml) 0/1158	(g N/100 ml) 0.0121	(g N/100 ml) 0/0122	(g N/100 ml) 0.0918	(g N/100 ml) 0.0920	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote
Source d'énergie	Cardes (g/ 100ml) 0.1016	Cardes (g/ 100ml) 0.1028	Cardes (g/ 100ml) 0.1014	Cardes (g/ 100ml) 0.1014	Cardes (g/ 100ml) 0.1015	Cardes (g/ 100ml) 0.1020	Cardes (g/ 100ml) 0.1019 g	Cardes (g/ 100ml) 0.1016	Cardes (g/ 100ml) 0.1015	Cardes (g/ 100ml) 0.1016	pas d'énergie	pas d'énergie
Inoculum	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Milieu tamponné	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml
volume total	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
code lame	‘‘F 1	‘‘F 2	‘‘F 3	‘‘F 4	‘‘F 5	‘‘F 6	‘‘F 7	‘‘F 8	‘‘F 9	‘‘F 10	‘‘F 11	‘‘F 12
pH final	6.75	6.76	6.74	6.76	6.80	6.76	6.76	6.74	6.68	6.78	6.81	6.85
Durée d'épuisement	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h

- Code lame LRTQ: ‘‘LRTQ 1

‘‘LRTQ 2

‘‘LRTQ 3

- Code lame LRF: ‘‘LRF 1

‘‘LRF 2

‘‘LRF 3

- Code lame LRM: ‘‘LRM 1

‘‘LRM 2

‘‘LRM 3

Annexe 4 - Essai 04 (l'utilisation des sources d'azote comme sources d'énergie)

Date: 27/05/2017

- Code lame LRTQ: ‘’’LRTQ 1 - E 4

‘’’LRTQ 2 - E 4

‘’’LRTQ 3 - E 4

Canal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Glutamate Na	Glutamate Na	Glutamate Na	KNO ₃	KNO ₃	KNO ₃	Extrait de levure	Extrait de levure	12
Source d'azote	(g N/100 ml) 0.0569	(g N/100 ml) 0.0567	(g N/100 ml) 0.0566	(g N/100 ml) 0.1153	(g N/100 ml) 0.1153	(g N/100 ml) 0.1158	(g N/100 ml) 0.0129	(g N/100 ml) 0.0124	(g N/100 ml) 0.0128	(g N/100 ml) 0.915	(g N/100 ml) 0.912	pas d'azote
Source d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie	pas d'énergie
Inoculum	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Milieu tamponné	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml
volume total	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Code de lames	‘’’F 1 E 4	‘’’F2 E 4	‘’’F 3 E3	‘’’F 4 E 4	‘’’F 5 E 4	‘’’F 6 E 4	‘’’F 7 E 4	‘’’F 8 E 4	‘’’F 9 E 4	‘’’F 10 E 4	‘’’F 11 E 4	‘’’ 12 E 4
pH final	6.58	6.49	6.51	6.42	6.42	6.43	6.45	6.43	6.10	6.44	6.49	6.42
Durée d'épuisement	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h

- Code lame LRF: ‘’’LRF 1 - E 4

‘’’LRF 2 - E 4

‘’’LRF 3 - E 4

- Code lame LRM: ‘’’LRM 1 -E 4

‘’’LRM 2 - E 4

‘’’LRM 3 - E 4

Annexe 5 - Essai 05 (la fermentation des résidus d'oranges après épuisement de l'inoculum)

Date: 10/06/2017

Canal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Bicarbonate NH ₄ ⁺	Glutamate Na	Glutamate Na	KNO ₃	KNO ₃	Extrait de levure	Extrait de levure	0 N + 1g RO	0 N + 1g RO	0 N + O énergie	0 N + O énergie
Source d'azote	(g N/100 ml) 0.0568	(g N/100 ml) 0.0566	(g N/100 ml) 0.1152	(g N/100 ml) 0.1153	(g N/100 ml) 0.0122	(g N/100 ml) 0.0126	(g N/100 ml) 0.0918	(g N/100 ml) 0.0916	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote	pas d'azote
Source d'énergie	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1018	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1031	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1028	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1023	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1029	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1025	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1014	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1028	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1026	Résidus d'oranges (g/ 100ml) 0.1025	pas d'énergie	pas d'énergie
Inoculum	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml	20 ml
Milieu tamponné	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml	80 ml
Volume total	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Code de lames	'F 1 E 5	'F 2 E 5	'F 3 E 5	'F 4 E 5	'F 5 E 5	'F 6 E 5	'F 7 E 5	'F 8 E 5	'F 9 E 5	'F 10 E 5	'F 11 E 5	'F 12 E 5
pH final	6.80	6.76	6.76	6.74	6.75	6.83	6.75	6.71	6.85	6.76	6.79	6.81
Durée d'épuisement	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h

- Code lame LRTQ: LRTQ 1 - E 5

LRTQ 2 - E 5

LRTQ 3 - E 5

- Code lame LRF: LRF 1 - E 5

LRF 2 - E 5

LRF 3 - E 5

- Code lame LRM: LRM 1 - E 4

LRM 2 - E 5

LRM 3 - E 5

Références

Références bibliographiques

1. **Abla F., Bouchaar H. 2016.** Effet de la source d'azote sur l'activité métabolique des principaux groupes bactériens du rumen de bovin cas du bicarbonate d'ammonium et du nitrate de potassium
2. **Ademe R. 2000.** Les coproduits d'origine végétale des industries agroalimentaire. Ademe Edition, 76 p
3. **Aggoun A. 2010.** bilan de l'azote et efficacité dans la synthèse protéique des résidus d'agrumes incubés avec différentes sources d'azote en présence de la flore ruminale bovine. Mémoire de master. Université de Constantine. P 33
4. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P., 1986.** Biologie Moléculaire de la cellule. Flammarion. Paris. 4: pp 114-1204.
5. **Amokrane S. 2010.** Etude des prétraitements microbiologiques des résidus agroalimentaires lignocellulosiques en vue de leur valorisation en alimentation animale. Mémoire de magister. Université de Constantine. pp 11-21.
6. **Bach A., Calsamiglia S. and Stern M. D. 2005.** Nitrogen Metabolism in the Rumen. *American Dairy Science Association*. 88: pp 9-21.
7. **Belbis G.H. 2007.** Flore du Rumen : origine, composition, évolution, conséquences physiopathologiques. Thèse doctorat vétérinaire. École nationale vétérinaire d'Alfort. pp 17-135.
8. **Berg G.M., Tymoczko J. L., Stryer L. and Gatto G.J. 2013.** Biochimie. *Médecine Science publications*. Lavis (Italie). pp 674-680.7
9. **Bergman E. 1990.** Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.*, 70, 567-590.
10. **Besle J.M. et Jouany J P. 1990.** La biomasse pariétale des fourrages et sa valorisation par les herbivores. INTRA. *Pro. Anim*, 3 (1):39-50
11. **Bonnefont C. 2008.** Le potentiel Redox et le milieu ruminal. Mémoire de Master. Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse. Pp 7-10.
12. **Bourghoud N. 1984.** Etude comparative de la flore du rumen de deux types d'agneaux algériens. Thèse de Magistère en biochimie appliquée. Université de Constantine.
13. **Boye M. 2014.** Etude *in sacco* de la dégradation ruminal des fibres et des matières azotées de fourrages fertilisés avec du fumier traité ou non par les bacteriolit. Thèse de doctorat. Université Toulouse. p 119.

14. **Briki K. and Debab S. 2009.** Etude microbiologique de la microflore ruminale des ovins, Méthanogènes et additifs alimentaires. Mémoire en ligne. Université Mohamed Boudiaf, Msila, Algérie.
15. **Brugère H. 1983.** Biochimie du rumen : Aspect physiologique. Bull. GTV Group. Tech. Vétérinaire doss.Tech.Veterinaire.
16. **Cheng K. J. and Costerton J. W. 1980.** Adherent rumen bacteria-their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In: Ruchebusch Y, Tyivend P, editors. Digestive physiology and metabolism in ruminants. Pp 227-250.
17. **Cheng K. J., Akin D. E. and Costerton J. W. 1977.** Rumen bacteria: interaction with particulate dietary components and response to dietary variation. *Fed. Proc* 36: pp 193-197.
18. **Chenost K.1997.** Utilisation des fourrages grossiers en régions chaudes. In Etude FAO Production et Santé Animales. ED FAO(Rome). 153.
19. **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, p34.
20. **Cuvelir C., Dufrasne I. and Dehority B. A. 2014.** Livret de l'agriculture. L'alimentation de la vache laitière: Aliments, calculs de ration, indicateurs d'évaluation des déséquilibres de la ration et pathologies d'origine nutritionnelle. p 105.
21. **Demarquilly C., Fevrier C. et Lessire M. 2002.** Valorisation par les animaux des coproduits des IAA. In: Gestion des problèmes environnementaux dans les industries agroalimentaires. Moletta R. (Eds.), Technique& Documentation, Paris, pp.379-404
22. **Demeyer D. et Fievez V. 2000.** Ruminants et environnement : la méthanogènes. INRA.EDP science, *Annales de Zootechnie*, 49 : pp 95-112.
23. **Dinsdale D., Cheng K. J., Wallace R.J. and Goodlad R.A. 1980.** Digestion of epithelial tissues of the rumen wall by adherent bacteria in infused and conventionally fed sheep. *Applied and environmental microbiology* 39. pp 1059-1066.
24. **Dusart C. 2014.**La digestion ruminale: mise en place d'un modèle d'étude in vitro à long terme en culture batch. Thèse doctorat en Sciences Vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. pp 33- 40.
25. **Euzéby J. P. 2006.** Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire [en-ligne], [<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/garde.html>]).

- 26. FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1991.**
25 mai 2016. <http://www.fao.org/>.
- 27. Ferhaoui N., Halilef k.2013.** Effet des extraits de déchets d'oranges sur la flore ruminale mixte des bovins et sur ses principaux groupes bactériens fonctionnel. Mémoire de master. Université de Constantine. pp 07-14
- 28. Fonty G. and Chaucheyras-Durand F. 2006.** Effects and mode of action of live yeasts in the rumen. *Biologia, Bratislava*. 61: pp 741-750.
- 29. Fonty G. and Chaucheyras-Durand F. 2006.** Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia, Bratislava*. 61: pp 741-750.
- 30. Fonty G., Chaucheyras-Durand F. 2007.** Les écosystèmes digestifs. Eds, Technique & Documentation, Paris, pp: 79.
- 31. 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.
- 32. Forano E., Broussolle V. and Duraud D. 1996.**Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria and fungi. *Annales de Zootechnie*. 45: pp 291-295.
- 33. Graham L .P. and Malcolm J.L. 1979.** Characteristics of enzymes produced by *Ruminococcus flavefaciens* which degrade plant cell walls. *Journal of General Microbiology*, 110: 21-27.
- 34. Guillaume H.B. 2007.** Flore du Rumen: Origine, Composition, Evolution, Conséquence Physiopathologiques. Thèse Med. Vet, Alfort, pp. 21-47.
- 35. Jarrige R., Grenet E., Demarquilly C. and Besle. 1995.** Les constituants de l'appareil végétatif des plants fourragers. In : Nutrition des ruminants Domestiques: Ingestion et Digestion. INRA Edition Quae. Pp 25-81.
- 36. Jouany J.P., Daridllat C., Kayouli C. 1995.** Microbial cell wall digestion in camelides. Elevage et alimentation du dromadaire. *Option méditerranéennes* : 33-42.
- 37. Jouany J.P.1994.** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions animales*. <https://www6.inra.fr/productions-animales/>. pp 207-225.
- 38. Jouany J.P.2000.** La digestion chez les camélidés: comparaison avec les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 13, pp 165-176.
- 39. Julier B. et Huyghe C. 2010** .Quelles légumineuses fourragères (espèces et variétés) et quelles conduites pour améliorer l'autonomie protéique des élevages herbivores .*Innovation agronomique*. 11 :101-114.
- 40. Kamara D.N. 2005.** Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, 89 (1), pp: 124-131.

41. **Keiji O. and soichi I. 1981.** Atlas of microbiology. Japan scientifique societies. Press. Tokyo, pp 56-85
42. **Koike S. P., Kobayashi Y. and Tanaka K. 2003.** Kinetics of *in sacco* fiberattachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive. *PCR. Journal of dairy Science* 86: pp 1429-1435.
43. **Krumholz L. R., Forsberg C. W. and Veira D.M. 1983.** Association of methanogenic bacteria with rumen protozoa. *Canadian journal of Microbiology* 29: pp 676.
44. **Loliger J., 2000.** Function and importance of Glutamate and bicarbonate d'ammonium for Savory Foods. *Journal of Nutrition, vol. 130, no 4s Suppl:* 915s–920s.
45. **Mebirouk L. 2014.** Nutrition animale. Edition office des publications Universitaire. Alger. pp 27-53.
46. **Michelland. 2009.** Caractérisation moléculaire des procaryotes et facteurs de variation des écosystèmes digestifs chez deux mammifères herbivores: approche comparée vache/lapin. *Thèse de doctorat: pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition.* France l'université de Toulouse ; 361p
47. **Mirzaei- Aghsaghali A. and Maheri- Sis N. 2008.** Nutritive value of some agroindustriel by-product for ruminants- A Review. *World Journal of Zoology*, 3 (2: 40-46.
48. **Mordjane S. 2011.** Effet de l'ajout des résidus d'oranges seuls ou en mélange avec les fourrages naturels fibreux, chrysanthème (*Chrysanthemum coronarium*) et cardes (*Silybum marianum*), sur la microflore ruminale de dromadaire et sa composant bactérienne. Mémoire de master. Université de Constantine. pp 5-6.
49. **Moustapha Nedjema.2000.** Nouvelles perspectives de l'utilisation des enzymes en oenologie - Impact des enzymes dans la production des productions des vins de qualité. Laboratoire de recherche et Développement Pascal biotech.
50. **Mould, F.L., Keliem, k.E. Morgen,R..Mauricio,R.M, 2005.** *In Vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anin. Feed Sci. Technol.*123-124:31-50
51. **Morrison M. 2000.** The Microbial Ecology and Physiology of Ruminant Nitrogen Metabolism. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction.* University of Nebraska. USA. p 103.
52. **Ogimoto K. and Lmai S. 1981.** Atlas of rumen microbiology. Japanese Society Press. Tokyo. p 231.
53. **Patterson J.A. 1992.** Rumen microbiology. In: Lederberg J. *Encyclopedia of microbiology.* (Eds), Academic press, vol 3 M-R, pp.458-470.

54. **Res D., Vian B. and Bajon C. 2006.** Le monde des fibres. *Ed. Belin*. Paris, pp 323-334.
55. **Rey M. 2012.** Implantation du microbiote et mise en place des fonctions du rumen chez le veau de race laitière et l'effet de la supplémentation en levures vivantes. Thèse de doctorat, Université INP Toulouse. p 323.
56. **Rihani N. 1991.** Valeur alimentaire des sous-produits des agrumes en alimentation animale. *Options méditerranéennes*. Série séminaires, 16 pp:113-117.
57. **Sauvant D. et Bas P. 2001.** La digestion des lipides chez le ruminant. *INRA. Prod. Anim.* 14., 23 pp : 333-342.
58. **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.
59. **Simon M. 2009.** les parois végétales www.actualités-pharmacie.com consulté le 19/05/2017.
60. **Stewart C.S, Hobson P.N. 1997.** The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic and professional. London. Weinheim. New York. Tokyo. Melbourne. Mesras.
61. **Tagliapietra F., Cattani M., Guadagnin M., Haddi M.L., Sulas L., Muresu R., Squartini A., Schiavon S and Bailoni L. 2015.** Associative effects of poor-quality forages combined with food industry by products determined in vitro with an automated gas-production system. *Animal Production Science*, 55(9), pp 1117–1122.
62. **Thivend P., Fonty G., Jouany J.P., Durand M. and Gouet P. 1985.** Le Fermenteur rumen. *Reprod. Nutr.* pp 729-753.
63. **Theodorou M.K., France J. 1993.** Rumen microorganisms and their interactions. *In:* J.M. Forbes and J. France (ed.): Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, *CAB International* .pp 145-163.
64. **Tiret L. 2001.** Physiologie de la digestion. Polycopié, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Unité Pédagogique de Physiologie et Thérapeutique. p 69.
65. **Toutain. PL. 2008.** Cours sur la digestion microbienne chez les ruminants. Ecole nationale vétérinaire de Toulouse.
66. **Tokua M., Chagan T., Ushida K. and Kojima I. 1999.** Phylogenetic study of mthanogens associated with rumen ciliates. *Curr. Microb*, 39 pp: 123-128.
67. **Williams A. G. and Withers S.E. 1981.** The Production of plant cell wall polysaccharides-degrading enzymes by hemicellulolytic rumen bacterial isolates grown

on a range of carbohydrate substrates. *Journal of Applied Bacteriology*, 52 pp : 377-387.

68. **Yang C., Rooke J. A., Cabeza I. and Wallace R. J. 2016.** Nitrate and Inhibition of Ruminant Methanogens: Microbial Ecology, Obstacles, and Opportunities for Lowering Methane Emissions from Ruminant Livestock. *Front Microbial* 7: pp 1-132.
69. **Zened A. 2011.** Particularités du microbiote et son activité lors de déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10. Thèse doctorat. Institut Nationale Polytechnologique de Toulouse. pp 32-34.

Les sites d'internet

1. **Anonyme, 2017.** <https://fr.wikipedia.org/wiki/Oranger>. Consulté le 19 juin 2017.
2. **Anonyme, 2017.** <https://fr.wikipedia.org/wiki/Chardon-Marie>. Consulté le 19 juin 2017.
3. **Anonyme. 2017.** Hémicellulose: <http://breuilletnature.blogspot.com/2015/11/les-energies-renouvelables-2-les.html> .Consulté le 03-07-2017. Web.
- 4.
5. **Anonyme. 2017.** Lignine: <http://breuilletnature.blogspot.com/2015/11/les-energies-renouvelables-2-les.html>.Consulté le 03-07-2017. Web.
6. **Anonyme. 2017.** Nitrate de potassium: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.22843.html>. Consulté le 03-07-2017. Web.
7. **Anonyme.2017.** Polymère: <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html>. Consulté le 03-07-2017. Web.
8. **Anonyme.2017.** Amidon: <http://www.joostdevree.nl/shtmls/amidon.shtml>.Consulté le 03-07-2017. Web.
9. **Anonyme.2017.** Cellulose:<http://www.joostdevree.nl/shtmls/cellulose.shtml>.Consulté le 03-07-2017. Web.
10. **Anonyme.2017.** Glutamate:<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23672308#section=Top>. Consulté le 03-07-2017. Web.

Matériel non-publié

Haddi. M.L. Laboratoire de mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne. Université Mentouri Constantine.

Résumé

Résumé

Au cours de nos expériences nous avons l'effet des différentes sources d'azote organique et inorganique sur l'activité métabolique de la microflore ruminale des bovins en présence des sources d'énergie (cardes et résidus d'oranges). Nous avons examiné la capacité de la flore ruminale à utiliser les sources d'azote comme sources d'énergie. Pour cela, nous avons procédé à des fermentations *in vitro* de ces sources dans un milieu tamponné réduit inoculé par le liquide ruminal filtré. Le suivi de la fermentation est effectué par la mesure volumétrique de la production de gaz. L'analyse des caractéristiques physico-chimiques du liquide ruminal a donné un pH de 5,67, et une température optimale de 31,99 °C. L'analyse des caractéristiques microbiologiques du liquide ruminal révèle une dominance absolue des bactéries Gram négatif par rapport aux bactéries Gram positif.

La cinétique de production de gaz des différentes sources d'azote et d'énergie indique que les sources d'azote organique (extrait de levure et glutamate de sodium) produisent plus de gaz avec les cardes: 51,3 ml/100 mg de MS, 33.3 ml respectivement et les résidus d'orange: 42 ml, 33.3 ml respectivement, contrairement aux sources d'azote inorganique qui produisent moins de gaz. Le bicarbonate d'ammonium produit plus de gaz avec les résidus d'oranges (27.3 ml) et uniquement 23.1 ml avec les cardes, suivi du nitrate de potassium 19.2 ml avec les résidus d'oranges et 23.4 ml avec les cardes. On constate que les sources d'azote organique stimulent l'activité métabolique des microorganismes du rumen plus que les sources d'azote inorganiques.

La cinétique de production de gaz des différentes sources d'azote indique la capacité de la flore ruminale à utiliser les sources d'azote organique comme une source d'énergie (9,6 ml pour l'extrait de levure et 6,6 ml de gaz pour le glutamate de sodium); contrairement aux sources d'azote inorganique qui ont montrés leur incapacité d'être utilisées comme une source d'énergie (2,5 ml pour le bicarbonate d'ammonium et 1,5 ml pour le nitrate de potassium). En conclusion, les sources d'azote organique peuvent être intégrées avec les résidus d'oranges et les cardes dans l'alimentation des ruminants dans le but d'améliorer la production animale.

Summary

Through our experience, we have studied the physico-chemical characteristics of the rumen fluid (pH, temperature, dry matter, mineral matter and organic matter), and the microbiological aspects of the rumen fluid. We have studied also the effects of different sources of organic and inorganic nitrogen on the metabolic activity of the rumen microbial of bovine in the presence of energy sources; fibrous (Chard: *Silybium marianum*) and non-fibrous (oranges residue). We have examined the capacity of the rumen flora in using nitrogen sources as energy sources. To do so, we have proceeded with IN VITRO fermentation of these sources inside a buffered reduced and inoculated milieu with the filtered rumen fluid. The monitoring of the fermentation is carried out through the volumetric measure of the gas production. The analysis of physico-chemical characteristics of the rumen fluid had given a pH of 5.67 and an optimal temperature of 31.99 °C. The analysis of the microbiological characteristics of the rumen fluid reveals an absolute dominance of the negative Gram bacteria compared to the positive Gram bacteria.

The Kinetics of gas production of the different sources of nitrogen and energy indicates that the organic nitrogen sources (yeast extract and sodium glutamate) produce more gas with the oranges residue and the chard: 42 ml/100mg of DM respectively; for the oranges residue; 51.3 ml respectively for the chards. Contrary to the inorganic nitrogen sources which produce less gas. The ammonium bicarbonate produces more gas: 27.3ml with the oranges residue and only 23.1 ml with the chard; followed by potassium nitrate 19.2 ml with the orange residue, and 23.4ml with the chards. We notice that the organic nitrogen sources stimulate the metabolic activity of the rumen microorganisms more than the inorganic nitrogen sources.

The Kinetics of gas production of the different nitrogen sources indicates the capacity of the rumen flora to use the organic nitrogen sources (9.6 ml of yeast extract, 6.6 of sodium glutamate); contrary to the inorganic nitrogen sources which have shown their incapacity to be used as energy sources (2.5 ml for the ammonium bicarbonate, 1.5 ml for the potassium nitrate). To sum up, the organic nitrogen sources can be integrated with the oranges residue and the chard in the nutrition of ruminants in order to improve the animal production.

ملخص

قمنا في تجربتنا هذه بدراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية لسائل كرش الأبقار (درجة الحموضة، درجة الحرارة، مادة جافة، مادة معدنية، مادة عضوية)، الخصائص الميكروبيولوجية لسائل كرش الأبقار. كما قمنا بدراسة تأثير مختلف المصادر النيتروجينية العضوية وغير العضوية على النشاط الأيضي للكائنات الدقيقة لكرش الأبقار في وجود مصادر الطاقة (السليين المريمي وبقايا البرتقال)، وقمنا باختبار قدرة الكائنات الدقيقة لكرش البقرة على استخدام المصادر النيتروجينية كمصدر طاقة، لأجل ذلك أجرينا عملية التخمر مخبريا لهذه المصادر في وسط حافظ مرجع ومطعم بسائل كرش الأبقار. تتم مراقبة عملية التخمر عن طريق القياس الحجمي للإنتاج الغازي. وضح تحليل الخصائص الفيزيائية والكيميائية لسائل كرش الأبقار أن درجة الحموضة تساوي 5,67 ودرجة الحرارة المثالية هي 31,99. كشف تحليل الخصائص الميكروبيولوجية لسائل كرش الأبقار كثافة واضحة للبكتيريا غرام - مقارنة بالبكتيريا غرام +

حركية إنتاج الغاز لمختلف المصادر النيتروجينية والطاقوية بينت أن المصادر النيتروجينية العضوية (مستخرج الخميرة، غلوتامات الصوديوم) أنتجت كمية كبيرة من الغاز في وجود بقايا البرتقال 51,3 مل/100 مغ للمادة الجافة، 33,3 مل على التوالي، وبقايا البرتقال: 42 مل، 33,3 مل على التوالي على عكس المصادر الأزوتية غير العضوية التي أنتجت كمية قليلة من الغاز. بيكاربونات الأمونيوم أنتج كمية أكبر من الغاز تقدر ب 27,3 مل بالنسبة لبقايا البرتقال أما بالنسبة لسليين المريمي فقد أنتجت 23,1 مل فقط، تليه نترات البوتاسيوم 19,2 مل مع بقايا البرتقال و 23,4 مل مع السليين المريمي. نخلص إلى أنّ المصادر النيتروجينية العضوية حفزت النشاط الأيضي للكائنات الدقيقة لكرش الأبقار أكثر من المصادر النيتروجينية غير العضوية.

حركية إنتاج الغاز لمختلف المصادر النيتروجينية بينت قدرة الكائنات الحية الدقيقة لكرش الأبقار على استعمال المصادر النيتروجينية العضوية (9,6 مل لمستخرج الخميرة 6,6 مل لغلوتامات الصوديوم) كمصادر طاقوية على عكس المصادر النيتروجينية غير العضوية التي أوضحت عدم قدرتها على استخدامها كمصدر طاقة (2,5 مل 6,6 مل لغلوتامات الصوديوم و 1,5 مل لبيكاربونات الأمونيوم). كاستنتاج نستطيع إدخال المصادر النيتروجينية العضوية مع بقايا البرتقال والسليين المريمي في تغذية المجترات بهدف تحسين الإنتاج الحيواني.

Comparaison entre azote organique et inorganique portant sur la dégradation *in vitro* des sources alternatives d'énergie par la microflore ruminale: cas des résidus d'oranges

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Général et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Au cours de nos expériences nous avons étudié l'effet des différentes sources d'azote organique et inorganique sur l'activité métabolique de la microflore ruminale des bovins en présence des sources d'énergie (cardes et résidus d'oranges). Nous avons examiné la capacité de la flore ruminale à utiliser les sources d'azote comme sources d'énergie. Pour cela, nous avons procédé à des fermentations *in vitro* de ces sources dans un milieu tamponné réduit inoculé par le liquide ruminal filtré. Le suivi de la fermentation est effectué par la mesure volumétrique de la production de gaz. L'analyse des caractéristiques physico-chimiques du liquide ruminal a donné un pH de 5,67, et une température optimale de 31,99 °C. L'analyse des caractéristiques microbiologiques du liquide ruminal révèle une dominance absolue des bactéries Gram négatif par rapport aux bactéries Gram positif.

La cinétique de production de gaz des différentes sources d'azote et d'énergie indique que les sources d'azote organique (extrait de levure et glutamate de sodium) produisent plus de gaz avec les cardes: 51,3 ml/100 mg de MS, 33.3 ml respectivement ; et les résidus d'oranges: 42 ml, 33.3 ml respectivement, contrairement aux sources d'azote inorganique qui produisent moins de gaz. Le bicarbonate d'ammonium produit plus de gaz avec les résidus d'oranges (27.3 ml) et uniquement 23.1 ml avec les cardes, suivi du nitrate de potassium 19.2 ml avec les résidus d'orange et 23.4 ml avec les cardes. On constate que les sources d'azote organique stimulent l'activité métabolique des microorganismes du rumen plus que les sources d'azote inorganiques.

La cinétique de production de gaz des différentes sources d'azote indique la capacité de la flore ruminale à utiliser les sources d'azote organique comme une source d'énergie (9,6 ml pour l'extrait de levure et 6,6 ml de gaz pour le glutamate de sodium); contrairement aux sources d'azote inorganique qui ne sont pas utilisées comme une source d'énergie (2,5 ml pour le bicarbonate d'ammonium et 1,5 ml pour nitrate de potassium). En conclusion, les sources d'azote organique peuvent être intégrées avec les résidus d'oranges et les cardes dans l'alimentation des ruminants dans le but d'améliorer la production animale.

Mots clés: microflore ruminale, sources d'énergie, sources d'azote organique et inorganique, résidus agroalimentaires, plantes fibreuses.

Laboratoire de recherche: Laboratoire de Mycologie, de biotechnologie et de l'activité microbienne.

Jury d'évaluation:

Président du jury : *M. Kadem Dhaou El Djabine* (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : *Haddi Mohamed-Laid* (Professeur - UFM Constantine 1)

Examineur : *Bellil Ines* (Maitre de Conférences- UFM Constantine 1).

Date de soutenance: 09/07/2017