



HAL
open science

Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 chez le ruminant

Jean-Philippe Marden

► **To cite this version:**

Jean-Philippe Marden. Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 chez le ruminant : Approche thermodynamique chez la vache laitière. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique (Toulouse), 2007. Français. NNT : 2007INPT005A . tel-04622240

HAL Id: tel-04622240

<https://ut3-toulouseinp.hal.science/tel-04622240>

Submitted on 24 Jun 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 2502

THÈSE

présentée

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : **SEVAB**

Spécialité : **QUALITÉ ET SÉCURITÉ DES ALIMENTS**

Par

Jean-Philippe MARDEN

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MODE D'ACTION DE LA
LEVURE *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 CHEZ LE RUMINANT :
APPROCHE THERMODYNAMIQUE CHEZ LA VACHE LAITIÈRE**

Soutenue le 13 juillet 2007 devant le jury composé de :

MM. PEYRAUD Jean-Louis	Président
SAUVANT Daniel	Rapporteur
NEWBOLD Charles James	Rapporteur
AUCLAIR Eric	Examineur
Mlle BAYOURTHE Corine	Examineur
MONCOULON Raymond	Examineur



**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU MODE D'ACTION
DE LA LEVURE *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47
CHEZ LE RUMINANT :
APPROCHE THERMODYNAMIQUE
CHEZ LA VACHE LAITIÈRE**

Jean-Philippe MARDEN

Travail réalisé

à

l'École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse

Sous la responsabilité scientifique conjointe de C. Bayourthe et de R. Moncoulon

Equipe "Nutrition Ecosystème Digestion"

Au sein de l'Unité Mixte de Recherche INRA-ENSAT-ENVT-TANDEM

En partenariat avec Lesaffre Feed Additives, Marquette-Lez-Lille, France

A ma famille

REMERCIEMENTS

Avant d'exposer mon travail, je tiens à remercier chaleureusement Monsieur Raymond Moncoulon à qui je dois l'orientation scientifique de cette thèse. Sa grande disponibilité, ses capacités d'écoute ont grandement contribué à mener à terme cette thèse. J'ai été très touché par ses mots d'encouragements qui durant toute la durée de la thèse m'ont motivé et rassuré.

A Mademoiselle Corine Bayourthe pour son encadrement et ses qualités scientifiques et pédagogiques qui m'ont poussé à mieux structurer ma pensée. Elle s'est également attachée à m'assurer d'excellentes conditions matérielles au sein du laboratoire qui m'ont permis de travailler dans un environnement favorable.

Je suis très reconnaissant envers la Société Lesaffre Feed Additives qui a assuré le financement de cette thèse, et je remercie particulièrement son directeur Monsieur David Kalkhoven ainsi que son directeur R&D Monsieur Eric Auclair.

Je remercie le Professeur Jamie Newbold de l'Université d'Aberystwyth du Pays de Galles et le Professeur Daniel Sauvant de l'INA de Paris, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Merci à Monsieur Jean-Louis Peyraud de l'INRA de Rennes pour sa participation dans mon travail et d'avoir accepté de participer à ce jury.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe de l'UMR TANDEM et du Domaine de Borret, qui ont touché de près ou de loin à ce travail. Je leur suis très reconnaissant de la confiance qu'ils m'ont témoignée en m'accueillant au sein du laboratoire et de l'opportunité qu'ils m'ont offerte de me former à la recherche.

A L'ensemble de mes collègues, collaborateurs (stagiaires) et amis pour leur gentillesse, leur serviabilité et leur important appui dans les moments difficiles.

Enfin, je ne remercierai jamais assez les gens de ma petite île, mes parents, mon frère, chop, ainsi que toutes les personnes que j'ai laissé pendant ces trois années. Un grand merci pour votre soutien de tous les jours malgré la distance.

LISTE DES ARTICLES, COMMUNICATIONS ET POSTERS

- **TROEGELER A., J. P. MARDEN, C. BAYOURTHE, R. MONCOULON, F. ENJALBERT (2006).** Effects of live yeast on the fatty acids biohydrogenation by ruminal bacteria. *In: 5th Biennial Meeting Gut Microbiology Symposium, Research to Improve Health, Immune Response and Nutrition, Aberdeen, Scotland. (Poster)*
- **MARDEN J. P., C. BAYOURTHE, F. ENJALBERT, R. MONCOULON (2005).** A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cow. *Journal of Dairy Science 88: 277-281. (Article)*
- **MARDEN J. P. and C. BAYOURTHE (2005).** Live Yeast-ruminal oxygen scavenger and pH stabiliser. *FEED MIX. Vol 13 (5): 2-6. (Article)*
- **MARDEN J. P. (2005).** Probiotics for ruminants: Action, effects. *In: 3rd Probiotics & Prebiotics New Foods organised by the European Probiotic Association, 6th September. Università Urbaniana, Rome, Italy. (Communication)*
- **MARDEN J. P. (2005).** Mode of Action of the live yeast BIOSAF Sc 47, a feed additive for ruminants. *In: Lesaffre Symposium organised by Lesaffre Feed Additives, 7th September. Università Urbaniana, Rome, Italy. (Communication)*
- **MARDEN J. P. (2005).** Effet du BIOSAF[®] sur le pH ruminal et le potentiel redox chez la vache laitière. Elu Lauréat du “Prix Jules Tournut” par l’Association Européenne de Probiotiques, Italie. *(Communication)*

SOMMAIRE

Remerciements

Liste des articles, communications et posters

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1^{ère} PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1 : Particularités Digestives Chez le Ruminant : <i>Un Rappel</i>	4
Chapitre 2 : La levure probiotique <i>Saccharomyces cerevisiae</i> chez le ruminant	18
Chapitre 3 : L'approche thermodynamique	39
2^{ème} PARTIE : MÉTHODOLOGIE	
Chapitre 1 : Matériel et méthodes	55
Chapitre 2 : Validation d'une méthode de prélèvements et de mesures "<i>ex vivo</i>"	62
3^{ème} PARTIE : MODÈLE "VACHE TARIE"	
Chapitre 1 : Effet d'un apport de levure probiotique sur le pH ruminal chez la vache tarie	71
Chapitre 2 : L'effet d'un apport d'oxygène sur la microflore ruminale en présence ou non de levures	86
4^{ème} PARTIE : MODÈLE "VACHE EN LACTATION"	
Chapitre 1 : Effet de deux niveaux d'apport de la levure <i>S. cerevisiae</i> Sc 47 chez la vache en production	100
Chapitre 2 : Comparaison entre 3 souches de levures probiotiques chez la vache en lactation	118
Chapitre 3 : Effets d'un apport de levure et de substance tampon chez la vache en production	129
DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	145
RÉFÉRENCES	157
ANNEXES	176
<i>Liste des Abréviations</i>	<i>183</i>
<i>Liste des Figures & Tableaux</i>	<i>184</i>
<i>Résumé & Abstract</i>	<i>188</i>
<i>Table des matières</i>	<i>190</i>

« La vie n'est induite que par des électrons, de l'énergie dissipée à la suite de leur excitation photonique, lors du retour au niveau d'énergie basal. Un électron en mouvement est comme un petit courant. Ainsi le moteur de la vie est un petit courant électrique, généré et maintenu par le soleil. Toutes les complexités du métabolisme intermédiaire ne sont que des fioritures autour de ce fait élémentaire. »

— ALBERT SZENT-GYÖRGYI —

INTRODUCTION

La levure *Saccharomyces cerevisiae*, depuis longtemps utilisée empiriquement par des éleveurs désireux de valoriser leurs résidus de brasserie, a été remarquée pour son effet bénéfique sur les fonctions digestives des animaux. Reconnue comme probiotique et alternative aux antibiotiques facteurs de croissance depuis plus d'une dizaine d'années, la levure et son emploi sont crédibilisés dans les systèmes de production modernes au vu du nombre important de travaux qui leur est consacré. L'apport de levures dans le régime alimentaire chez le ruminant domestique, a mis en évidence des effets variables sur les performances zootechniques. L'effet levure se traduit chez le bovin de boucherie par une augmentation du poids vif (Mutsvangwa *et al.*, 1992 ; Mir and Mir, 1994) et chez la vache laitière par une augmentation de la production et du taux butyreux du lait (Piva *et al.*, 1993 ; Ali-Haimoud Lekhal, 1999) alors que l'effet levure est absent dans certaines études (Arambel and Kent, 1990 ; Swartz *et al.*, 1994).

La levure est généralement commercialisée sous la forme revivifiable caractérisée par un taux élevé de cellules vivantes ou comme culture de levures, composée du milieu de fermentation avec un nombre limité en levures vivantes (Lynch and Martin, 2002). Bien que la plupart des études *in vitro* et *in vivo* se soient principalement focalisées sur les cultures de levures (Martin and Nisbet, 1992 ; Girard and Dawson, 1994), l'utilisation des additifs à base de levures actives connaît actuellement un regain d'intérêt depuis ces dernières années.

Les travaux récents relatifs à l'effet de *S. cerevisiae* ont intégré la biologie, la chimie et la microbiologie pour préciser les cibles (espèces microbiennes) à atteindre par l'additif. L'état actuel des recherches et les résultats obtenus, ont conduit les spécialistes (Newbold *et al.*, 1996 ; Koul *et al.*, 1998 ; Fonty et Durand-Chaucheyras, 2006) à suggérer que la stabilisation du pH ruminal est l'effet principal de la levure probiotique. Plusieurs hypothèses ont été émises pour comprendre le mode d'action de la levure dans le rumen mais elles n'autorisent pas à tirer de conclusions claires. Certains auteurs suggèrent un effet de compétition entre la levure et les bactéries utilisatrices de lactate alors que d'autres voient la levure comme un réservoir de métabolites responsables d'une activité accrue des bactéries utilisatrices de lactate. Dans les deux cas, la levure provoquerait une diminution de la teneur en lactate responsable de la stabilisation du pH ruminal. En revanche pour Newbold *et al.* (1993), l'effet de la levure résiderait principalement dans la captation de l'oxygène qui entre dans le rumen par le biais de l'alimentation. Cet oxygène toxique diminuerait l'anaérobiose du milieu inhibant ainsi l'activité des bactéries anaérobies strictes. La présence de levures dans le milieu ruminal impliquerait une utilisation de l'O₂

permettant une stimulation d'une part de l'activité des bactéries utilisatrices de lactate évitant une accumulation de lactate et d'autre part de l'activité des bactéries cellulolytiques favorisant une meilleure utilisation digestive de la ration grâce à un milieu ruminal plus réducteur. En raison du bas niveau de l'O₂ dans le rumen qui est indétectable avec les sondes les plus performantes, nous avons utilisé les notions de la thermodynamique afin d'exprimer les valeurs de la pression partielle en O₂ (PO_2) du rumen par le biais de la relation de Nernst en intégrant les valeurs de pH et de potentiel redox. Les données obtenues sont traduites en unité logarithmique et montrent d'infimes teneurs ruminales en O₂ caractérisant un état réducteur du rumen. Bien qu'elles aient une signification mathématique, les valeurs calculées de log (PO_2) restent néanmoins difficiles à interpréter sur un plan biologique.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein de l'UMR INRA/ENSAT/ENVIT TANDEM dans l'équipe Nutrition et Ecosystème Digestif (NED), dans le cadre d'une des thématiques abordées par cette équipe à savoir l'étude "*des facteurs de modulation de l'écosystème digestif microbien*". Il s'insère dans un programme de recherches portant sur l'étude de l'impact de flores exogènes sur la stabilité des écosystèmes digestifs et avait comme principal objectif de comprendre, chez la vache laitière, le mode d'action d'un probiotique *i.e. Saccharomyces cerevisiae* par le biais de la thermodynamique. Ce travail a été conduit en partenariat avec la société Lesaffre, leader mondial dans la production de levures, qui a développé un concentré thermostable de levures revivifiables. Sélectionnée et produite par Lesaffre Feed Additives (LFA), cette souche de levure, commercialisée sous le nom de BIOSAF[®], est destinée à l'alimentation des monogastriques (porcelets, truies, lapins) et des ruminants (bovin viande, jeune bovin, vache laitière, ovin, caprin) et les chevaux.

Ce manuscrit se divise en quatre grandes parties :

- la première est une synthèse bibliographique rappelant les particularités digestives du ruminant mais centrée sur les effets de la levure probiotique chez ces animaux et sur l'approche thermodynamique des fermentations ruminales.
- la deuxième, d'ordre méthodologique, met surtout en évidence la mise au point et la validation d'une méthode "*ex vivo*", indispensable pour les mesures en continu de deux paramètres physico-chimiques du rumen, le pH et le potentiel redox,

- la troisième rapporte les essais relatifs à une supplémentation en levures et à un apport d'oxygène, conduits selon un modèle "vache tarie",
- enfin, la dernière partie est consacrée à l'étude des effets, 1) de deux niveaux d'apport de BIOSAF[®] et 2) de différentes souches de levures probiotiques selon un modèle "vache en lactation". La comparaison entre BIOSAF[®] et une substance tampon a aussi été abordée au cours d'un dernier essai.

1^{ère} PARTIE

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Particularités Digestives

Chez le Ruminant : *Un Rappel*

Les herbivores, et particulièrement les ruminants, occupent dans le monde une place prépondérante parmi les animaux domestiques élevés à des fins de production. Leur contribution à la satisfaction des besoins alimentaires de l'humanité, par le lait et la viande qu'on leur fait produire, revêt une importance capitale. Le ruminant présente par rapport aux monogastriques l'avantage de pouvoir extraire et utiliser l'énergie contenue dans une biomasse végétale non-utilisable directement par l'homme, à cause de sa trop grande richesse en lignocellulose. A ce titre, le ruminant ne peut être considéré comme un concurrent direct de l'homme vis-à-vis de sa biomasse alimentaire. Le ruminant doit cette spécificité à quelques particularités digestives et à un tube digestif (TD) qui n'est pourtant pas fondamentalement différent de celui des monogastriques (Barone, 1984).

Anatomiquement l'originalité réside dans la présence en amont du TD, d'un estomac volumineux et compartimenté (Figure 1). Les deux premiers réservoirs, le rumen et le réticulum constituent un vaste réservoir pouvant être comparé à un fermenteur fonctionnant en continu dans lequel se déroule une véritable digestion biologique des aliments. L'abomasum est le 4^{ème} compartiment, c'est le véritable estomac du ruminant semblable à celui des monogastriques et c'est là que commence la digestion des résidus non hydrolysés dans le rumen (à l'exception des glucides pariétaux enrichis des synthèses microbiennes).

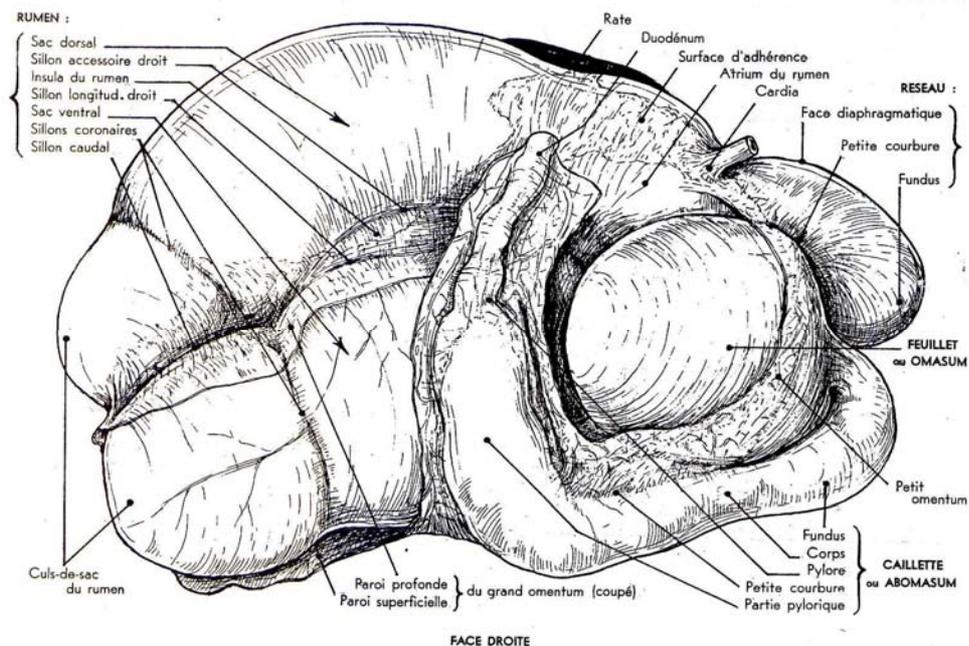


Fig. 1. Conformation extérieure de l'estomac du bœuf (D'après Barone, 1984).

La physiologie digestive propre du ruminant se distingue de celle des monogastriques par la rumination. Pendant la prise de nourriture qui est rapide, les aliments sont mastiqués sommairement et immédiatement déglutis dans le rumen où ils subissent une imbibition et un ramollissement. Après un temps de séjour dans le rumen qui varie selon la nature de la ration entre 30 et 70 min chez la vache (Kolb, 1975), les aliments sont régurgités et subissent une seconde mastication. Au cours de la mastication mérycique, le contenu de la panse subit une comminution intense, accompagnée d'une nouvelle et importante insalivation. La fragmentation qui en résulte, et la production de tampons salivaires favorisent les fermentations.

Un petit historique ...

Le réticulo-rumen est chez le ruminant un fermenteur efficace qui joue un rôle majeur dans la dégradation des constituants de la ration. Il participe à la dégradation des glucides (Cheng *et al.*, 1991), des matières azotées (Broderik *et al.*, 1991) et dans une moindre mesure à celle des matières grasses (Prins *et al.*, 1975). Il autorise par la protéosynthèse bactérienne la transformation de l'azote amidé en azote aminé (Raynaud, 1959) et participe à la synthèse des vitamines hydrosolubles (Massengo, 1976).

Les productions issues des ruminants et la capacité particulière de ces animaux à valoriser la biomasse végétale, est un enjeu économique et alimentaire si grand qu'un nombre considérable de travaux leur a été, et leur est encore consacré. De très nombreuses revues bibliographiques et de très nombreux ouvrages spécialisés confirment si besoin était l'importance du rumen et des fermentations ruminales dans la fonction digestive du ruminant.

Avant l'ère pastorienne mais après les travaux de Réaumur et de Spalanzani, il était convenu d'admettre que le rumen n'avait d'autre rôle que celui de favoriser la macération des aliments et leur ramollissement par une action purement mécanique. Les connaissances actuelles s'appuient bien évidemment sur les découvertes de Pasteur, car dès 1900 le rumen est considéré comme un réservoir de fermentation où les bactéries sont reconnues comme étant à l'origine de la cellulolyse et de la protéosynthèse (Raynaud, 1959). Depuis, d'innombrables travaux n'ont cessé d'apporter des éléments nouveaux pour aider à la compréhension, et à la maîtrise du fonctionnement complexe de l'organe. La modélisation mathématique qui traduit à la fois compréhension et maîtrise, a été maintes fois mise en œuvre (Baldwin *et al.*, 1970 ; Dijkstra, 1998 ; Petrucci *et al.*, 2002 ; Offner and Sauvart, 2006). Au fil du temps, ces modèles ont été affinés par la prise en compte des nouveaux

apports de la recherche, tels que la dynamique microbienne, les acides aminés de synthèse, la dynamique des particules fibreuses ou la thermodynamique. Malgré cela, il reste que certaines orientations métaboliques et leurs conséquences ne sont pas toujours bien expliquées par ces modèles (Offner and Sauvant, 2004) et cela justifie l'intérêt qui est encore aujourd'hui porté à la compréhension des fermentations ruminales.

I. L'ACTIVITÉ FERMENTAIRE RUMINALE

Chez le ruminant, encore plus que tout autre animal, le rôle de la flore digestive dans la fonction de nutrition est capital. Il existe une relation de dépendance très forte entre la micropopulation du rumen et l'animal hôte (Gouet *et al.*, 1986). Cette relation est majoritairement de nature symbiotique. La biomasse qui arrive dans le rumen pour satisfaire aux besoins de l'animal, et en fait d'abord mise à disposition de cette micropopulation qui l'utilise comme substrat pour se multiplier. Lorsqu'un ruminant s'alimente, il satisfait d'abord aux besoins de la microflore et seuls les éléments non fermentés, les produits terminaux des fermentations et les corps microbiens sont digérés, et participent alors à la satisfaction du besoin propre de l'animal hôte.

La symbiose flore/hôte est si forte que toute entrave au développement de la flore porte un préjudice à l'animal et inversement toute stimulation de l'activité de la flore lui est bénéfique.

I. 1. L'écosystème ruminal

Le rumen est un biotope ouvert, qui échange avec l'extérieur, dont les caractéristiques sont favorables au développement d'une biocénose anaérobie et diversifiée (Theodorou and France, 1993). Dans ces conditions les microorganismes extraient et captent l'énergie en mettant en œuvre une respiration anaérobie, c'est-à-dire un échange d'électrons où l'accepteur final n'est pas l'oxygène mais un produit issu du métabolisme fermentaire microbien (Doelle, 1969). Le rumen est un fermenteur, dont la régularité des processus est entretenue malgré un contenu qui varie en fonction de l'animal et de la ration. Le contenu ruminal peut être caractérisé par quelques paramètres physico-chimiques :

La teneur en eau : la teneur en eau du contenu ruminal est comprise entre 85 et 90%. L'eau, apportée par les aliments, l'eau de boisson et la salive, est le support des molécules en solution et des particules en suspension avec lesquelles elle constitue la phase

liquide du rumen. Celle-ci est caractérisée par une pression osmotique comparable à celle du sang et comprise entre 200 et 300 mOsm/L chez l'animal sain.

La température : une température assez constante comprise entre 39 et 41°C, c'est-à-dire sensiblement supérieure à la température corporelle. Cette température peut varier avec l'intensité des fermentations ruminales aux cours desquelles se produit une perte inéluctable d'énergie lors du transfert des électrons dans les réactions couplées.

Le pH et le pouvoir tampon : il est généralement admis que le pH optimal du rumen se situe dans une fourchette comprise entre 6 et 7. Dans les conditions normales, le rumen sain et en fonctionnement est caractérisé par un pH légèrement acide. Le pH du milieu ruminal est la résultante des productions acides, des tampons salivaires et des tampons propres de la ration (Giger-Reverdin *et al.*, 2002). Les mesures du pH faites dans les conditions de terrain conduisent souvent à établir des gammes beaucoup plus larges allant des valeurs parfois inférieures à 5 (état d'acidose ruminale qui sera abordée et développée plus loin) à des valeurs supérieures à 7,5 (état d'alcalose). De telles déviations du pH qui sortent de la zone dite de normalité, sont la conséquence de déviations fermentaires générées elles-mêmes par des déséquilibres alimentaires. Le pouvoir tampon est cependant une caractéristique de la phase liquide ruminale faisant intervenir les sels d'AGV, les bicarbonates, les phosphates et l'ammoniac afin de stabiliser les équilibres acido-basiques (Sauvant *et al.*, 1999).

Le potentiel d'oxydo-réduction : les réactions et les espèces chimiques impliquées dans les fermentations et qui font du rumen un milieu réducteur, ne sont pas encore parfaitement connues. Le potentiel redox (E_h) d'un rumen sain et en fonctionnement est négatif et varie de - 150 mV à - 260 mV (Broberg, 1957 ; Barry *et al.*, 1977 ; Marden *et al.*, 2005) lorsqu'il est normalement mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène. C'est par son activité fermentaire que la micropopulation du rumen maintient le caractère très réducteur de ce milieu approché par la valeur du E_h , lequel conditionne en retour le fonctionnement de cette biocénose (Baldwin and Emery, 1960a). Les valeurs négatives du E_h enregistrées dans le rumen traduisent le caractère hautement réducteur d'un milieu appauvri en O_2 . Quelques auteurs pourtant (Mac Arthur and Multimore, 1962 ; Czerkawski, 1969 ; Barnes *et al.*, 1983 ; Hillman *et al.*, 1985) mettent en évidence la présence d'air ou d' O_2 dans le rumen. L'air pénètre dans le rumen lors de l'ingestion des aliments, lors de la mastication mérycique et avec l'eau de boisson ; l' O_2 diffuse aussi à partir de la circulation sanguine. Par son activité, la flore semble capable de faire

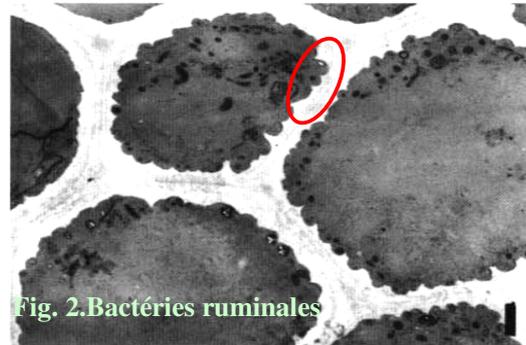
disparaître rapidement l'oxygène arrivant dans le milieu (Broberg, 1957a ; Scott *et al.*, 1983). L'effet de ces entrées d'O₂ dans le rumen sera envisagé et discuté ultérieurement.

I. 2. Les microorganismes du rumen

La microflore et la microfaune spécifiques de la panse des ruminants adultes s'installent progressivement au sevrage. Alors, le rumen héberge une biocénose composée de bactéries, de protozoaires et de champignons unicellulaires, remarquable de complémentarité.

I. 2. 1. Les bactéries

Les bactéries sont la composante principale de la biocénose ruminale (Figure 2*), et sont indispensables au ruminant en raison de la part qu'elles prennent dans la digestion des parois végétales et les synthèses protéiques (Bryant and Burkey, 1953 ; Hungate, 1966). Une quarantaine de



genres et plus de 60 espèces ont été décrites en qualité de populations spécifiques au rumen. Leur concentration globale dans le milieu ruminal peut atteindre 10¹⁰ voire 10¹¹ cellules vivantes par ml (Fonty *et al.*, 1995). Une telle densité correspond en gros à la présence d'1 kg de MS de matériel bactérien dans le rumen d'un bovin adulte (Jouany, 1978).

Dans le contenu ruminal, la distribution des bactéries est très hétérogène et fortement influencée par la stratification des digesta que l'on observe malgré le brassage continu du contenu (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). Les bactéries associées à la phase solide du rumen et qui adhèrent solidement aux particules alimentaires, représentent de 50 à 75% du total et sont donc plus abondantes que les bactéries libres de la phase liquide ou faiblement associées aux petites particules (Forsberg and Lam, 1977 ; Cheng and Costerton, 1980).

Les bactéries du rumen ont été initialement classées selon leur morphologie, en coques et bacilles et selon leur coloration de Gram (Hungate, 1966), mais progressivement,

* Bactéries ruminales dégradant la paroi secondaire du sclérenchyme d'une tige de blé au microscope électronique à transmission (Grenet, 1997)

elles ont été aussi classées (Tableau 1) selon leur aptitude à dégrader certains substrats (bactéries cellulolytiques, amylolytiques, lipolytiques, protéolytiques, etc.) ou à utiliser comme substrat un métabolite intermédiaire (bactéries utilisatrices de lactate) et enfin à produire certains métabolites spécifiques (bactéries méthanogènes). L'activité fermentaire du rumen découle de celle de l'ensemble des microorganismes de telle sorte qu'une hiérarchisation serait sans fondement. Les activités des espèces se recouvrent parfois largement, ce qui contribue à la stabilité de l'écosystème (Hespell, 1981). Les bactéries cellulolytiques auxquelles on attribue une fonction essentielle en raison de leur capacité de dégrader et de fermenter les polysides pariétaux, bénéficient d'interactions complexes avec l'ensemble de la flore pour parvenir aux produits terminaux dont profite l'animal hôte.

Les principales espèces bactériennes responsables de l'hydrolyse des polysides membranaires (*Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefasciens*) sont des anaérobies strictes, et particulièrement adaptées à une température de 39°C, à une atmosphère composée de CO₂ et CH₄ et à un pH maintenu entre 6 et 6,5 (Russell and Wilson, 1996). Toute modification des conditions ruminales est susceptible d'inhiber leur croissance.

Les bactéries amylolytiques (*Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolytica*) peuvent représenter à elles seules plus de la moitié de la microflore totale lorsque les rations sont à forte proportion de produits amyloacés, notamment des régimes riches en céréales. Moins exigeantes en matière d'anaérobiose (Perry and Briggs, 1955), elles supportent aussi des pH plus bas que les cellulolytiques.

D'autres espèces encore plus spécialisées telles que *Selenomonas ruminantium* et *Megasphaera elsdenii*, jouent par exemple un rôle déterminant sur le maintien d'un pH optimal dans le rumen. De par leur capacité à fermenter le lactate entre autres, ce sont deux bactéries anaérobies strictes. Représentante majoritaire dans certaines conditions et surtout lorsque le pH est très bas (état d'acidose), la bactérie *S. ruminantium* fermente l'acide lactique en succinate puis en propionate dont les intermédiaires clés sont le malate et le fumarate (Sokatch, 1969). La bactérie *M. elsdenii* peut fermenter jusqu'à 97% du lactate présent dans le rumen (Elsden *et al.*, 1956), particulièrement lorsque le régime alimentaire induit une forte acidité dans le milieu ruminal. La bactérie utilise préférentiellement au glucose, le lactate comme substrat (Hino *et al.*, 1994). Elle fermente le lactate grâce aux enzymes *lactate déshydrogénase* et *lactate racemase* (Hino and Kuroda, 1993) qu'elle

transforme en propionate par la voie de l'acrylate (Baldwin *et al.*, 1962 ; Counotte *et al.*, 1982).

Dans l'écosystème ruminal vivent aussi des Archaées. Ces microorganismes toujours rencontrés dans des milieux extrêmes sont sans doute les plus vieilles habitantes de la Terre (Prescott *et al.*, 2003). Dans le rumen, ce sont les méthanogènes ; des bactéries capables de réduire dans ce milieu le dioxyde de carbone ou le formiate en méthane. D'une manière générale, il est admis que le rumen compte plus d'espèces méthanogènes que l'on connaît à cause de la grande difficulté qu'il y a de les cultiver. Ces bactéries ont une très grande exigence en matière d'anaérobiose (Thauer *et al.*, 1977).

I. 2. 2. Les protozoaires

Les protozoaires du rumen (Figure 3[▲]) sont essentiellement des ciliés Holotriches, Oligotriches ou entodiniomorphes (de 10^5 à 10^8 par ml de digesta), mais également des flagellés (10^3 à 10^4 par ml de digesta). Bien que moins nombreux, les protozoaires représentent dans le rumen une biomasse équivalente à celle des bactéries. Généralement libres dans la phase



Fig. 3. Un Protozoaire cilié du rumen

liquide, certains peuvent se fixer sur les particules. Ils semblent posséder une activité cellulolytique non négligeable (Cheng and Costerton, 1980 ; Demeyer, 1989). Les protozoaires ciliés jouent un rôle particulièrement important dans la dégradation des protéines alimentaires et bactériennes, qui sont leur principale source azotée (Leng, 1989 ; Hobson, 1989). Malgré leurs évidentes capacités fermentaires, les protozoaires, contrairement aux bactéries, ne sont pas indispensables à la survie des animaux (Jouany *et al.*, 1988). D'ailleurs avec des rations enrichies en céréales, la densité des ciliés s'abaisse significativement lorsque le pH est inférieur à 6 (Jouany and Senaud, 1982).

[▲] *Entodinium simplex*, un protozoaire cilié du rumen en microscopie à balayage (Grenet, 1997)

I. 2. 3. Les champignons unicellulaires

La présence des champignons unicellulaires (Figure 4♦) dans le rumen a été signalée (Orpin, 1975) beaucoup plus tardivement que celle des bactéries et des protozoaires. C'est sans doute la composante de la microflore ruminale la plus difficile à étudier. Leur activité cellulolytique et leur



Fig. 4. Les Champignons du rumen

capacité à hydrolyser les parois végétales a été étudiée (Bauchop and Montfort, 1981 ; Fonty *et al.*, 1987). La connaissance actuelle des facteurs qui influencent la colonisation des particules par les champignons demeure limitée. Les sondes oligonucléotidiques spécifiques des différentes espèces devraient permettre de mieux appréhender qualitativement et quantitativement la population fongique du réticulo-rumen dans les années à venir.

II. LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DES MICROORGANISMES DU RUMEN

Dans le rumen les aliments sont soumis à une digestion essentiellement due à l'activité fermentaire microbienne qui procure aux microorganismes les moyens de synthétiser l'ATP, la monnaie d'échange énergétique indispensable pour mener à bien leurs propres synthèses (Iannotti *et al.*, 1973). Lors du catabolisme des oses et particulièrement la transformation du glucose en pyruvate, l'ATP formé au cours des réactions chimiques où le substrat perd un groupement phosphate, est directement transféré à l'ADP pour régénérer les molécules d'ATP (Lipmann, 1941). Cette voie de synthèse est plus connue sous le nom de PLS (phosphorylation liée au substrat). Dans le rumen, les bactéries n'ont pas toute cette capacité à fermenter des oses, certaines comme les archaebactéries méthanogènes, les bactéries utilisatrices d'acides (*Megasphaera elsdenii*) synthétisent l'ATP par une autre voie métabolique, la PTE *i.e.* phosphorylation par transport d'électrons (Anderson and Wood, 1969). La récupération d'énergie est réalisée par l'établissement d'un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la

♦ Champignon du rumen entourant un vaisseau (Grenet, 1997)

membrane cellulaire chez les bactéries anaérobies (Asghar *et al.*, 1973). Ce gradient est lui-même initié par un transfert de protons de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. Cette 'Force Proton Motrice' est sans doute utilisée par les méthanogènes pour capturer les faibles quantités d'énergie présentes dans le substrat accepteur final d'électrons : le CO₂ dans une réaction où le produit final est le CH₄. Dans la cellule, l'oxydation des cofacteurs réduits (NADH, NADPH, FADH) qui libère des électrons pourrait bien être à l'origine de cette voie de synthèse pour l'ATP.

II. 1. La digestion des glucides dans le rumen

Globalement, l'activité digestive dans le rumen comporte trois étapes complémentaires et concomitantes : d'hydrolyse, de fermentation et de synthèse.

Grâce à un équipement enzymatique très large mais spécifique des groupes bactériens concernés, les microorganismes du rumen sont capables de dégrader tous les constituants glucidiques contenus dans les végétaux (Hungate, 1966). Cette dégradation qui réduit la taille des molécules alimentaires aboutit à libérer dans le milieu ruminal des oses (hexoses ou pentoses). L'hydrolyse des polysides, de nature purement enzymatique, n'autorise aux bactéries et autres protozoaires et champignons aucune récupération d'énergie pour satisfaire des besoins d'entretien ou de croissance.

La fermentation dans le rumen qui utilise comme substrat les produits d'hydrolyse des polysides alimentaires conduit à la production d'acides gras volatils (AGV), de gaz (CO₂, CH₄, NH₃, H₂, etc.) et de la chaleur. Pour les microorganismes, ces produits sont les produits terminaux de leur métabolisme et l'énergie qu'ils contiennent ne peut être ni extraite ni récupérée dans les conditions de l'anaérobiose ruminale par la biocénose présente.

En l'absence d'oxygène, la glycolyse par la voie dite de Embden-Meyerhof-Parnas (voie EMP) transforme une mole de glucose en 2 moles de pyruvate et permet la formation de 2 moles d'ATP (Figure 5). La formation de l'ATP dans ce processus étant couplée à une réduction du NAD en NADH, autorise la fermentation du pyruvate en AGV (acétate, propionate et butyrate), en lactate, en éthanol et permet la régénération du NAD (l'oxydation du NADH).

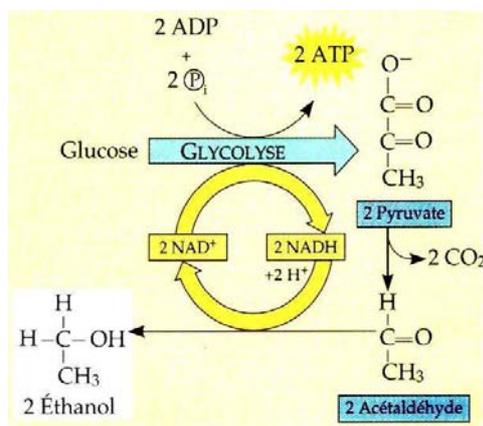


Fig. 5. Régénération du NAD (fermentation)

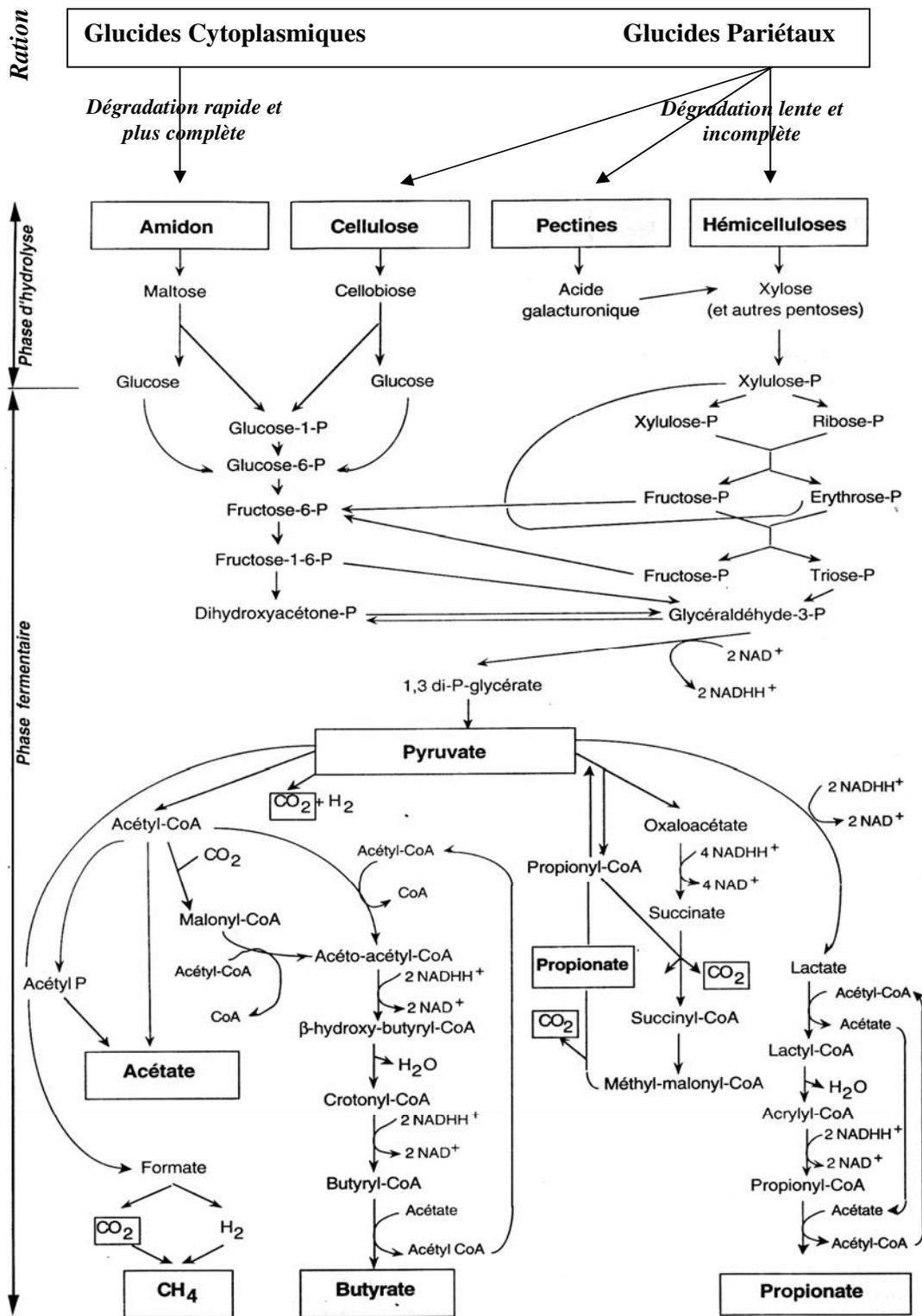


Fig. 6. Voies du métabolisme glucidique dans le rumen (Modifiée de Jouany et al., 1995).

La production des AGV et la formation du méthane permettent en outre aux bactéries d'accroître la formation d'ATP. Dans le rumen, 1 mole d'hexose permet aux microbes de régénérer en moyenne 8,25 moles d'ATP (Owens and Goetsch, 1976).

La fraction glucidique de la ration d'un ruminant (Figure 6) contient en proportions variables, une part de glucides pariétaux (hémicellulose, cellulose et substances pectiques) et une part de glucides de réserve (amidon et sucres solubles). Sous l'effet des enzymes bactériennes (bactéries cellulolytiques), les glucides pariétaux subissent dans la panse une hydrolyse d'autant plus incomplète que les parois végétales renferment de la lignine. A l'opposé, les glucides solubles et l'amidon sont hydrolysés plus rapidement et plus complètement par les bactéries amylolytiques.

II. 2. L'acidose ruminale

L'alimentation est la cause déterminante de l'acidose ruminale sous ses différentes formes. Dans le rumen, la fermentation des glucides alimentaires conduit à la production d'acides organiques qui diffèrent en fonction des substrats fermentés et des conditions de fermentation et sont responsables des évolutions du pH du contenu (Figure 7). Lorsque la part des glucides rapidement fermentescibles (GRF) augmente au détriment des glucides pariétaux, la production des AGV est augmentée, le pH a tendance à baisser et la proportion des différents AGV est fortement modifiée. Le pH qui mesure l'acidité ou l'alcalinité du contenu ruminal, est le principal paramètre d'évaluation du degré d'acidose en raison de ses effets multiples sur la fermentation ruminale : modification des populations microbiennes et de l'épithélium ruminal, déviations fermentaires, chute de la digestibilité des fibres.

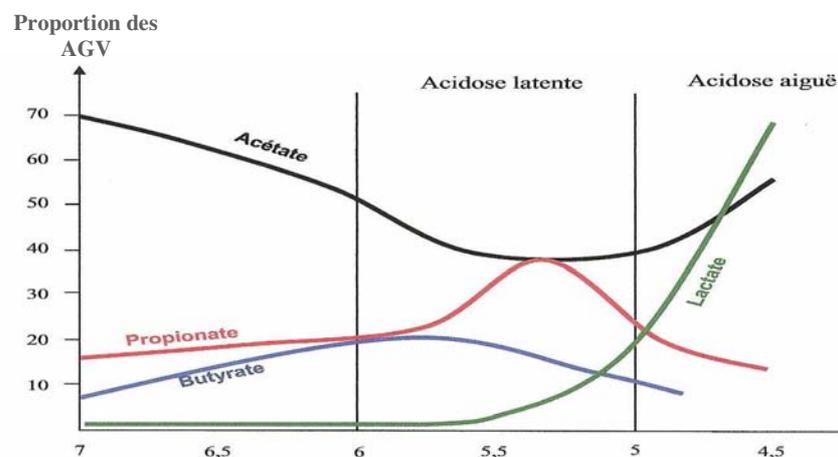


Fig. 7. Evolution des proportions d'acides gras volatils et de la concentration dans le rumen en fonction du pH ruminal (D'après Kaufman et al., 1980)

Lorsque le pH s'abaisse, les proportions d'acétate (C_2) diminuent généralement au profit du propionate (C_3). Le ratio C_2/C_3 peut ainsi dans une certaine mesure être utilisé pour apprécier un état d'acidose ruminale. Un ratio de 3 peut être considéré comme normal alors qu'un ratio de 2,5 est caractéristique d'une acidose latente (Sauvant *et al.*, 2006).

Pour une fermentation ruminale et une dégradation des fibres optimales, le pH doit se situer entre les valeurs de 6,2 et 6,8, la plage la plus favorable à l'activité des bactéries cellulolytiques, bien que chez des vaches en bonne santé il puisse fluctuer et descendre au-dessous de 6 pendant de courtes périodes sans que cela ne pose de véritable problème à la flore. Comme aucun mécanisme particulier d'alcalinisation autre que la production de bicarbonates salivaires n'est sollicité, le maintien du pH dans le rumen résulte de l'équilibre qui s'établit entre la concentration en acides organiques et la capacité tampon du jus de rumen (Giger-Reverdin *et al.*, 2003). Lorsque le rumen doit traiter des quantités accrues de matières organiques fermentescibles, l'intensité des fermentations augmente et provoque des déséquilibres. La digestion dans le rumen est perturbée et s'accompagne d'une acidification de son contenu avec des valeurs de pH inférieures aux valeurs normales.

L'acidose du rumen est pourtant difficile à définir par la seule valeur de pH comparée aux valeurs considérées comme normales. Elle peut évoluer sous différentes formes, de l'acidose latente ou subclinique difficile à diagnostiquer caractérisée par une faible mortalité et une forte morbidité à l'acidose aiguë d'évolution rapide qui provoque généralement la mort de l'animal. Le point commun à toutes ces formes évolutives est la production rapide d'acides organiques dans le rumen, quand l'animal consomme une ration riche en glucides rapidement fermentescibles.

La fermentation de la cellulose produit principalement des acides gras à courte chaîne, les AGV, qui sont après absorption utilisés par l'animal pour satisfaire son besoin énergétique. Dans ces conditions, cette production acide ne crée pas de désordre digestif particulier et ne provoque pas de baisse excessive du pH. Cela pour deux raisons :

- la digestion ruminale de la cellulose est une réaction lente, surtout s'il s'agit de cellulose fortement incrustée de lignine,
- l'étroite association qui existe entre la digestion des fibres ligno-cellulosiques et la sécrétion salivaire qui apporte les bicarbonates capables de neutraliser rapidement cette production acide.

La fermentation de l'amidon (glucide rapidement fermentescible ou GRF) est beaucoup plus rapide et donne naissance à une quantité plus grande d'AGV et la

production intermédiaire d'acide lactique est moins rapidement métabolisée. Comme cette digestion concerne des matériaux à faible fibrosité, la stimulation salivaire n'est pas suffisante pour que les tampons salivaires puissent neutraliser l'excès d'acidité et s'opposer à une baisse du pH.

II. 3. Installation de l'acidose ruminale

Au cours de la digestion d'une ration "normale" avec suffisamment de fourrage et sans excès de concentrés, l'acide lactique est produit en faible quantité (la bactérie produisant majoritairement l'acide lactique est *Streptococcus bovis*). Cet acide est, au fur et à mesure de sa production, utilisé comme substrat par les bactéries utilisatrices de lactate (*Megasphaera elsdenii* et *Selenomonas ruminantium*) qui le transforment en d'autres composés et notamment en acide propionique et secondairement en acide acétique.

L'augmentation de la proportion de GRF dans la ration est précisément à l'origine de la première agression vis-à-vis de l'écosystème ruminal qui déclenche le mécanisme physiologique conduisant à l'acidose. La gravité et l'intensité de l'acidose dépendent de la fréquence, de l'importance et de la durée du déséquilibre alimentaire. Lorsqu'une forte quantité de GRF est

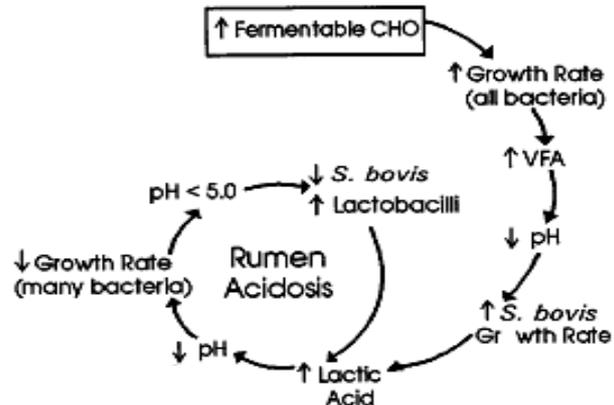


Fig. 8. Evènements des séquences associées à l'installation de l'acidose ruminale (Adaptée de Nocek, 1997)

introduite dans la ration, la production d'AGV augmente et en même temps le pH ruminal commence à diminuer. Le profil microbien évolue et donne un avantage aux bactéries amylolytiques au détriment des bactéries cellulolytiques et des protozoaires. La croissance de *S. bovis* est fortement stimulée par le milieu en début d'acidification. Lorsque le pH diminue, *S. bovis* commence à fermenter le glucose en acide lactique en lieu et place des AGV, mais avec un pK_a de 3,8 l'acide lactique est un acide environ 10 fois plus fort que les AGV. La production d'acide lactique est augmentée sous sa forme racémique (formes L et D). En même temps que le pH commence à baisser, les bactéries utilisatrices de lactate ralentissent fortement leur activité de telle sorte que la flore utilisatrice de lactate et petit à petit dominée par la flore qui produit le lactate ; l'acide lactique s'accumule dans le rumen et contribue à alimenter la spirale d'acidification (Russell and Hino, 1985). Si le pH continue à diminuer ($pH < 5$), c'est-à-dire si la disponibilité des GRF se maintient, *S. bovis*

est à son tour inhibé. Les lactobacilles prennent le relais pour produire essentiellement de l'acide lactique. C'est de scénario "spirale" (Figure 8) qui déclenche une **acidose aiguë** et entraîne généralement la mort de l'animal.

L'acidose latente d'évolution plus lente, s'installe dès que le pH ruminal descend au dessous du seuil physiologique de 6 sous l'influence d'une production accrue d'AGV. Dans la littérature les valeurs de pH recensées pour caractériser une acidose latente varient selon les auteurs qui d'une manière générale retiennent la fourchette $5,5 < \text{pH} < 6$. Plus récemment Sauvart *et al.* (1999) estiment que les conditions sont réunies pour une acidose latente lorsque le pH ruminal moyen se situe entre 5,5 et 6,25. Ces auteurs ont proposé de retenir pour éviter tout risque, la valeur de 6,25 ce qui correspond à un $\text{pH}_{<6,0}$ de 4 heures par jour.

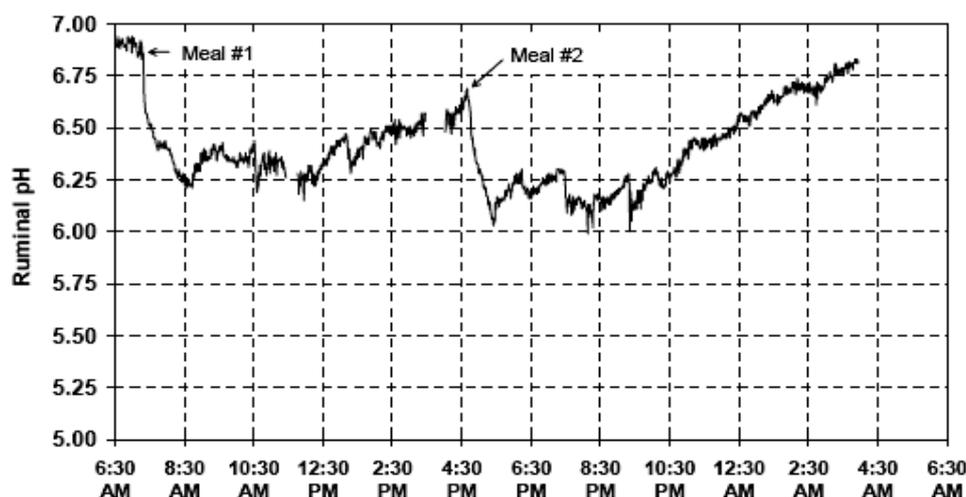


Fig. 9 : Evolution au cours du nyctémère du pH ruminal chez une vache laitière montrant après deux repas d'épreuve (flèches) des périodes d'acidose latente
(d'après Oetzel, 2000)

Le pH ruminal baisse rapidement lors de la prise du repas et amorce une remontée dès la 2^{ème} heure post-prandiale. Généralement plus de 10 heures sont nécessaires pour que le pH ruminal retrouve sa valeur initiale (Figure 9). Dans ces conditions, les AGV produits dans le rumen qui ont un pK_a d'environ 4,9, sont alors sous forme indissociée et leur absorption passive à travers la paroi du rumen est facilitée. Cela a pour effet de limiter l'acidification si les apports de GRF et notamment d'amidon restent à un niveau raisonnable. Les gains en matière d'absorption d'AGV peuvent cependant être contrebalancés par la production d'acide lactique qui peut avoir tendance à s'accumuler légèrement si les bactéries productrices de lactate sont dominantes par rapport à la population des bactéries qui utilisent le lactate. La concentration du lactate est dans ce cas

bien souvent inférieure à 10 mM. Elle est parfois définie comme étant une acidose sans accumulation d'acide lactique (Oetzel, 2000). D'autres signalent ponctuellement des teneurs en lactate de 50 mM. En fait, entre l'acidose aiguë au cours de laquelle les concentrations en lactate peuvent atteindre 100 mM et l'acidose latente où seules des traces de lactate sont trouvées, tous les intermédiaires existent en fonction de l'intensité de l'acidose. Il est bien évident que des traces de lactate dans le rumen (avec un pK_a de 3,8, l'acide lactique est environ 10 fois plus acide que les AGV) qui s'ajoutent aux AGV présents renforcent l'acidité et font baisser le pH.

Lorsque des vaches sont soumises à des régimes acidogènes, leurs réponses en matière d'acidification du rumen et leur pH ruminal sont dépendants de l'équilibre et des régulations qui s'opèrent entre les facteurs acidifiants et les facteurs alcalinisants.

Chapitre 2

La Levure Probiotique

Saccharomyces cerevisiae

chez le ruminant

Après la seconde guerre mondiale, les conditions d'élevage au fil des décennies n'ont cessé d'évoluer pour s'adapter aux attentes et exigences de la société et notamment à une demande croissante en produits animaux. Mais, l'élevage moderne pour s'intensifier, crée des conditions d'élevage (densité des animaux, alimentation, etc.) de moins en moins naturelles qui donnent une image défavorable aux produits et provoquent ce que l'on a coutume d'appeler des crises sanitaires (Gournier-Chateau *et al.*, 1994).

L'industrialisation de l'élevage dont le but majeur est d'augmenter la production et d'en abaisser le coût dans le souci d'une économie compatible, doit se préoccuper de l'état de santé des animaux et respecter les bonnes pratiques vis-à-vis de l'environnement. D'un point de vue purement scientifique, cette préoccupation majeure a fait l'objet de nombreuses recherches (Johnson *et al.*, 1979 ; Nagaraja *et al.*, 1981 ; Nagaraja *et al.*, 1982 ; Bergen et Bates, 1984 ; Schelling, 1984 ; Nagaraja *et al.*, 1985) qui ont œuvré pour la promotion en élevage, de substances médicamenteuses notamment les antibiotiques facteurs de croissance (AFC). Utilisés dans l'alimentation des animaux en tant qu'additifs, ces AFC ionophores (monensine, salinomycine, lasalocide) ou non ionophores (avoparcine), ont fortement contribué à améliorer l'état sanitaire et les performances zootechniques des bovins de boucherie (monensin) et des vaches laitières (avoparcine). Ces antibiotiques, régulièrement administrés à faible dose, ont prouvé leur efficacité pour prévenir les désordres digestifs et métaboliques provoqués par les rations à caractère acidogène marqué (Nagaraja *et al.*, 1985 ; Newbold and Wallace, 1988 ; Russell and Strobel, 1989).

La mise en place d'une réglementation européenne (directive 70/524/CEE) modifiée en 1993 (directive 93/113/CE) relative à l'usage des additifs en alimentation animale a conduit à une régression progressive des AFC, condamnés par une opinion publique soucieuse des risques d'antibiorésistance (Corpet, 1999) puis à une interdiction totale en Janvier 2006 au sein de l'U.E.

La suppression programmée des AFC ionophores ou non ionophores a donné un regain d'intérêt à la recherche de solutions alternatives. Parmi ces solutions, où l'on trouve aussi entre autres les huiles essentielles et les enzymes, l'incorporation de souches vivantes de microorganismes^ψ non commensaux dans les régimes alimentaires des animaux d'élevage semble présenter un intérêt réel, maintes fois mis en évidence au travers des

^ψ Voir Annexe 1

résultats zootechniques. Cela conduit à la promotion d'une nouvelle famille d'additifs, celle des probiotiques.

I. QU'EST-CE QU'UN PROBIOTIQUE ?

Le terme probiotique dérive des deux mots grecs 'pro' et 'bios' et signifie littéralement « *en faveur de la vie* » par opposition au terme antibiotique signifiant « *contre la vie* ». Ce terme a été proposé par Parker (1974) pour désigner les micro-organismes et substances microbiennes qui contribuent au maintien de l'équilibre de la microflore intestinale. Cette définition, qui engloberait les cultures microbiennes mais aussi les métabolites produits par les micro-organismes et par conséquent les préparations d'antibiotiques paraissait trop vaste pour être retenue. C'est pourquoi Fuller (1989), redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additifs alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'animal hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale.

I. 1. Les critères de sélection d'un probiotique

Le probiotique, considéré comme un additif zootechnique de la famille des micro-organismes, est soumis à une législation européenne stricte pour être mis sur le marché de l'alimentation animale. Il doit légalement répondre aux 3 critères initialement retenus pour sélectionner et évaluer son efficacité, c'est-à-dire : la qualité du produit (identification, contrôle, stabilité, etc.), l'efficacité du produit (mode d'action, effet, dose, etc.) et la sécurité c'est-à-dire l'innocuité pour l'utilisateur, pour l'animal, pour le consommateur et pour l'environnement. Le probiotique est donc sélectionné de façon rigoureuse afin de rentrer dans ce cadre. Il est souvent soumis à une série d'études réalisées d'abord *in vitro* avant que son efficacité ne soit validée sur l'animal (Havenaar *et al.*, 1992). De leur côté, les fabricants considèrent aussi comme critère de choix, l'aptitude de la souche à se reproduire en milieu industriel.

I. 2. Les espèces microbiennes les plus utilisées

Chez les monogastriques, les microorganismes utilisés généralement sont des souches de bactéries à Gram + appartenant aux genres *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* et *Bacillus* (Guillot, 1998) dont la souche *Lactobacillus acidophilus*, une

bactérie productrice de lactate a été expérimentée chez le veau (Gilliland *et al.*, 1980). Chez les ruminants, elle agirait selon Dawson *et al.* (1990) et Yoon et Stern (1991) comme stimulateur de flore lors de la fermentation ruminale. Les bactéries utilisatrices de lactate telles que *Megasphaera elsdenii* et *Propionibacterium shermanii*, présentes habituellement parmi la microflore de l'écosystème ruminal, ont été aussi expérimentées pour atténuer les risques d'acidose *in vitro* (Hession and Kung, 1992 ; Kung and Hession, 1995). Malgré des résultats prometteurs, aucune de ces espèces n'est aujourd'hui utilisée couramment dans les élevages de ruminants parce que ce sont des bactéries anaérobies strictes, qu'elles sont difficiles à produire à grande échelle dans des fermenteurs industriels et que les réponses sont très aléatoires (Dawson, 1988). Chez le ruminant destiné à la production de viande et de lait, un intérêt particulier est porté à la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).

II. LA LEVURE PROBIOTIQUE *Saccharomyces cerevisiae*

Généralement définies comme des champignons unicellulaires se reproduisant par bourgeonnement ou par fission, les levures sont réparties en 3 classes : les ascomycètes, les basidiomycètes et les deutéromycètes (Kreger-Van Rij, 1969). Parmi ces levures, l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 10) appartenant à la classe des ascomycètes et au genre *Saccharomyces* est la plus impliquée dans les productions industrielles.

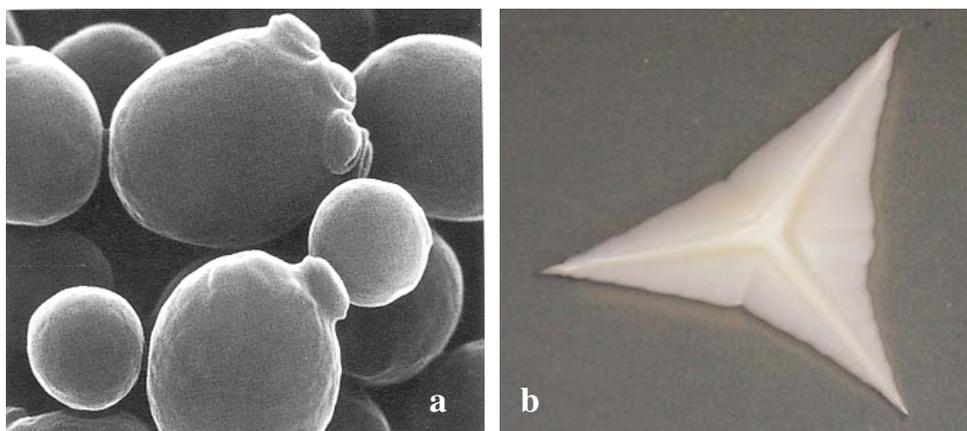


Fig. 10. Image de *S. cerevisiae* en microscopie électronique (a) et sur milieu gélosé (b)

La croissance optimale de cette levure se situe à des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 5,0 et les différentes souches sont ubiquistes, c'est-à-dire capables de se développer en milieu aérobie et en milieu anaérobie (Rose, 1987). Cette propriété lui permet d'accroître sa biomasse en présence ou en absence d'oxygène mais à des rythmes

différents ; la production en aérobiose autorise un accroissement de sa biomasse presque 20 fois supérieur à celui de la fermentation. La levure Sc est, depuis des temps très anciens, à la base de la panification et de la fabrication des boissons alcoolisées et aujourd'hui, elle continue à être indispensable à ces activités industrielles (Harrison and Rose, 1970) auxquelles on peut ajouter la production des biocarburants (éthanol). Depuis un demi siècle, la levure s'installe et progresse en qualité d'additif alimentaire, puis de probiotique en élevage intensif de ruminant où les éleveurs ont commencé à l'apprécier lors de tentative de valorisation des résidus de fermentation (Carter and Phillips, 1944).

II. 1. Les additifs alimentaires à base de levures

La levure Sc destinée à l'alimentation animale est généralement produite en aérobiose sur un substrat de mélasse, de sels d'ammonium et de phosphate, pour être commercialisée sous différentes formes : les levures vivantes et les cultures ou extraits de levures. Plus de 1000 souches distinctes de *S. cerevisiae* sont répertoriées à la National Collection of Yeast Cultures (Norwich, UK). Les levures vivantes sont divisées en 2 groupes, les souches pures sans milieu de culture et les souches associées à leur milieu de culture (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997). Les souches pures sont revivifiables et respectent un taux élevé de cellules vivantes exprimé UFC/g. Elles sont soumises à des conditions de fabrication spéciales et sont notamment représentés par la souche NCYC Sc 47, commercialisée par la société Lesaffre Feed Additives sous la marque déposée de BIOSAF® et la souche CNCM I-1077 commercialisée par la société Lallemand sous le nom de LEVUCCELL®. Contrairement aux souches pures, d'autres souches (ex : CBS 493.94, commercialisée par la société Alltech sous le nom de YEA-SACC®) sont cultivées et séchées avec leur milieu de croissance, dans le but de maintenir leur capacité fermentaire (Lyons *et al.*, 1993). Ce dernier produit conserve des métabolites issus de sa production et permet ainsi de réduire de façon considérable le coût de production. Enfin, les cultures encore appelées extraits de levures (ex : Diamond-V XP® commercialisée par la société Alltech) sont produites à partir de la fermentation de levure de boulangerie en présence de divers substrats et déshydratées avec le milieu de croissance sans détruire les composants de la levure tels que les vitamines B (Lynch et Martin, 2002). Elles ne contiennent pas ou très peu de levures revivifiables et ne sont pas considérées comme probiotiques.

II. 2. Le devenir de la levure probiotique dans le tube digestif du ruminant

Par définition, un probiotique est un microorganisme allochtone du tube digestif de l'animal cible, dont le rythme de multiplication est ralenti (Kung *et al.*, 1997). Sa vitesse de disparition du rumen étant de l'ordre de 0,17/h (Newbold *et al.*, 1989) et son rythme limité de multiplication (Figure 11) ne lui permettent pas de s'installer dans ce milieu qui lui est défavorable.

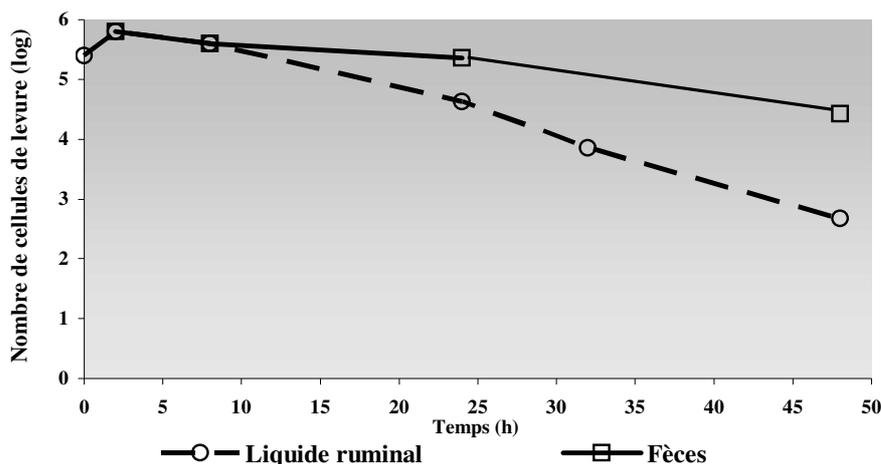


Fig. 11. Cinétiques du nombre de levure dans le rumen et dans les fèces
(D'après Fiems *et al.*, 1993)

Pour cette raison, le probiotique doit être administré régulièrement pour lui assurer une présence permanente dans le tractus digestif. Chez le ruminant, on verra plus loin que l'activité du probiotique s'exerce principalement dans le rumen ; c'est donc la concentration (UFC/g) dans le contenu ruminal qui est la condition essentielle de l'action du probiotique concerné. Selon Jouany *et al.* (1994), une concentration inférieure à 10^6 - 10^7 UFC/g de contenu digestif ne permet pas d'obtenir d'effet notable entre la levure et la flore intrinsèque, et par conséquent d'effet sur l'hôte.

III. LES RÉPONSES ZOOTECHNIQUES À UN APPORT DE LEVURE CHEZ LE RUMINANT

L'utilisation de la levure Sc comme additif alimentaire chez la vache laitière a été rapportée pour la première fois par Eckles et Williams (1925). Les effets bénéfiques de cette levure inactivée sur les fonctions digestives du ruminant ont été remarqués et attribués à l'apport de vitamines et de protéines (Carter and Phillips, 1944). Plus récemment, l'incorporation d'une levure active déshydratée dans la ration des taurillons

s'est traduite par un accroissement significatif du gain moyen quotidien (GMQ) de 6% (Beeson and Perry, 1952) et d'une augmentation de 1,1 kg de lait par jour chez la vache laitière (Renz, 1954). Toutefois, l'incorporation massive de 6,8 kg de levure active dans le rumen a été suspectée d'un risque d'intoxication par éthanol en raison de la fermentation alcoolique qu'elle est susceptible de provoquer (Bruning and Yokoyama, 1988). Pour pallier ce problème, les levures mortes ne présentant pas ces risques potentiels, ont été préférées aux levures actives.

La preuve d'un intérêt croissant de l'utilisation d'une levure probiotique est apportée par l'évolution du nombre d'articles scientifiques qui lui sont consacrés, quelques uns en 1950 à plus de 80 en 2000 selon Jouany (2000). Il en ressort que la levure probiotique peut dans certaines conditions, modifier les activités et fermentations ruminales, crédibilisant ainsi son utilisation dans les systèmes de production modernes (Williams *et al.*, 1991 ; Wallace and Newbold, 1992 ; Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997). L'objectif de cet important volume de recherche est d'abord de préciser les effets de la levure chez le ruminant et ensuite d'en comprendre le mode d'action (Rose, 1987 ; Newbold *et al.*, 1996 ; Fonty and Durand-Chaucheyras, 2006).

III. 1. Effets de la levure sur la production laitière

L'analyse des résultats obtenus lors d'essais d'incorporation de levures probiotiques chez les femelles laitières, met en évidence une grande variabilité dans les réponses relatives à la quantité et à la qualité du lait (Arambel and Kent, 1988 ; Swartz *et al.*, 1994 ; Soder and Holden, 1999 ; Wang *et al.*, 2001). Une augmentation significative de la production laitière, allant de + 0,7 à + 2,4 kg par jour a été rapportée (Williams *et al.*, 1991 ; Wohlt *et al.*, 1991 ; Piva *et al.*, 1993 ; Wohlt *et al.*, 1998 ; Robinson and Garrett, 1999). D'autres auteurs rapportent seulement une tendance à l'amélioration de la production de lait parce que l'effet n'est pas significatif à $P < 0,10$ (Erasmus *et al.*, 1992 ; Dann *et al.*, 2000). D'autres essais dénie l'existence de l'effet levure sur la production (Besong *et al.*, 1996 ; Erasmus *et al.*, 2005).

La difficulté d'obtenir une signification pouvant être attribuée à des effectifs insuffisants dans les essais sur vaches laitières, plusieurs méta-analyses ont été réalisées rassemblant des données de la littérature. En 1993, Wallace et Newbold ont comparé deux importants effectifs de vaches laitières, 1073 vaches témoins et 1179 vaches ayant reçues de la levure probiotique à raison de 10 g par jour. Cette étude a permis aux auteurs de mettre en évidence une amélioration de la production laitière moyenne de 2,2 litres de lait

par vache et par jour. Ce résultat a été confirmé par une expérimentation portant sur 245 vaches laitières et sur lesquelles a été montrée une augmentation significative de la production annuelle de lait de 2% chez les femelles primipares et de 2,7% chez les femelles multipares (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997). Plus récemment, une méta-analyse utilisant les résultats de 29 références cumulant 114 lots de vaches en production (Figure 12), confirme un effet moyen significatif de + 4% sur la quantité de lait (Ali Haimoud-Lekal *et al.*, 1999). Enfin, dans une autre étude bibliographique utilisant les résultats publiés dans 22 articles impliquant plus de 9000 vaches laitières, il a été montré que la levure pouvait être responsable d'une augmentation de la production variant de 2 à 30%, avec une moyenne de 7,3% (Dawson, 2000).

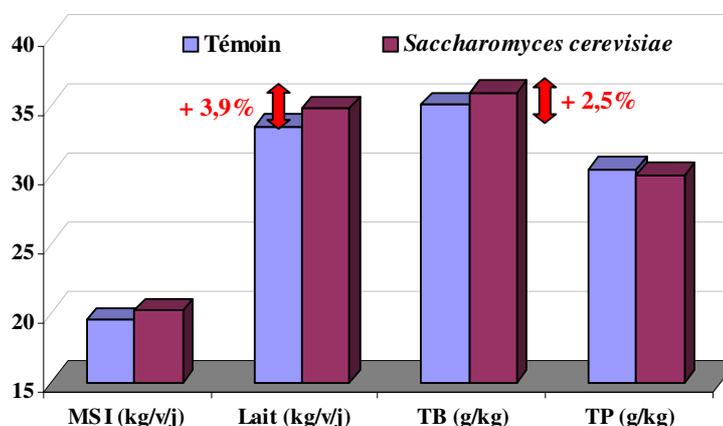


Fig. 12. Effet de la levure probiotique sur la MSI, la production et la qualité du lait (D'après Ali Haimoud-Lekhal *et al.*, 1999)

Les teneurs en protéines (T.P) et en matières grasses (T.B) du lait sont parfois modifiées par l'apport de levures. La méta-analyse déjà citée, conduite par Ali Haimoud-Lekal *et al.* (1999) mettent en évidence une augmentation de + 2,5% du T.B alors que le taux protéique n'est pas modifié. Chez la chèvre laitière, un effet significatif de la levure sur le T.B a été rapporté (Giger-Reverdin *et al.*, 1996 ; El-Ghani *et al.*, 2004 ; Stella *et al.*, 2007) alors que chez la bufflonne Kumar *et al.* (1992) mettent en évidence une augmentation significative du T.P de + 2,2 g/kg.

On peut en déduire que dans certains essais de terrain, si la réponse des vaches laitières à un apport de levure probiotique n'est pas significativement positive, c'est sans doute parce que les conditions requises pour permettre à la levure d'exprimer tout son potentiel ne sont pas réunies. D'ailleurs, la réponse des animaux semble être dépendante du stade physiologique de l'animal en lactation (Williams and Newbold, 1990) et de la nature de la ration (Dawson, 1989).

Influence du stade de lactation

Le stade de lactation de l'animal semble être un facteur important pour que l'effet levure s'exprime chez le ruminant laitier. Les vaches fraîches en tout début de lactation réagissent bien à l'apport de levure vivante qui leur permet un pic de lactation plus précoce et plus important que celui des vaches témoins (Wohlt *et al.*, 1991). Cette amélioration du pic augmente la production moyenne de lait de 1,5 kg/jour sur 126 jours. Dans tous les cas l'effet levure est significatif pendant les tous premiers jours de lactation (Dann *et al.*, 2000) et ne se traduit pas seulement sur l'amélioration du début de lactation mais elles permettent aussi d'avoir une meilleure persistance laitière au cours de la lactation complète (Wallentine *et al.*, 1986 ; Harris and Lobo, 1988). Hoyos (1992) estime pourtant que l'addition de levures vivantes après 250 jours de lactation améliore de 6% la persistance laitière par rapport aux animaux non traités.

Influence de la nature de ration

Une interaction significative entre l'effet levure et l'effet ration a été observée par Williams *et al.* (1991) dans une expérimentation où l'effet levure le plus marqué sur la production du lait est associé à la ration la plus riche en glucides rapidement fermentescibles (GRF). Lorsque les rations utilisées sur des vaches en lactation sont composées d'une proportion suffisamment élevée de fourrage de qualité pour éviter tout désordre nutritionnel, aucun effet levure ne peut être mis en évidence (Swartz *et al.*, 1994). D'une manière générale, les femelles laitières répondent mieux à l'addition de levure lorsque les rations présentent un caractère acidogène dû à la présence d'ensilage de maïs (Wallace and Newbold, 1993) ou/et à la distributions de fortes quantités d'aliments concentrés énergétiques (Dobos *et al.*, 1990).

III. 2. Effets de la levure sur les bovins de boucherie

La levure probiotique est aussi incorporée dans les rations des ruminants destinés à la production de viande mais les résultats positifs rapportés dans la littérature sont moins nombreux que ceux concernant les ruminants laitiers. L'effet levure se traduit par une augmentation du G.M.Q lorsque les taurillons sont nourris avec un régime à caractère acidogène (El Hassan *et al.*, 1993 ; Hancock *et al.*, 1994). Ce résultat est souvent associé à un accroissement des quantités de matières sèches ingérées (Mutsvangwa *et al.*, 1992 ; Mir and Mir, 1994). Dans un essai utilisant 180 taurillons de race Blonde d'Aquitaine

alimentés avec du maïs grain humide inerté, Moncoulon et Auclair (2001) rapportent que la levure probiotique améliore le G.M.Q tout en réduisant l'ingestion (Figure 13) et par conséquent diminue significativement l'indice de consommation (I.C).

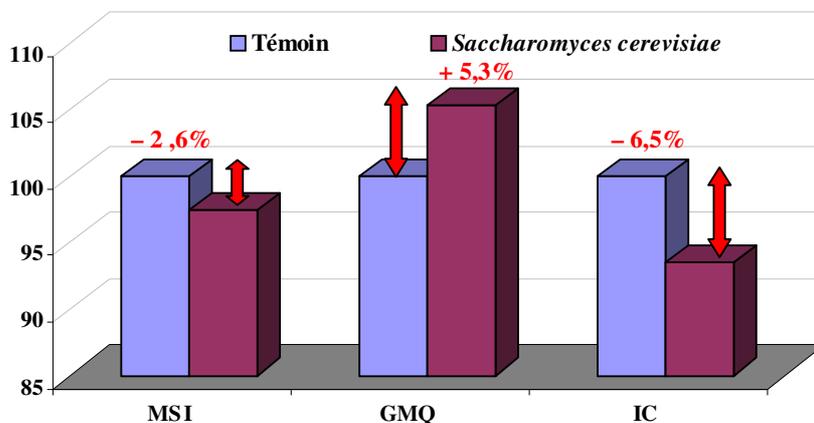


Fig. 13. Effet de la levure probiotique sur la MSI, le GMQ et l'IC chez les bovins viande (D'après Moncoulon and Auclair, 2001)

Par ailleurs, des améliorations non significatives du G.M.Q et de l'I.C sont enregistrées chez le bovin de boucherie alimenté par des quantités égales de concentrés et de fourrages (Adams *et al.*, 1981) alors que l'ingestion est significativement augmentée (+6,7%). Les carcasses de taurillons ayant reçu une levure probiotique ont tendance à être moins grasses sur le plan qualitatif que celle des témoins pour un même G.M.Q (Aerts *et al.*, 1994). Dans certaines conditions, l'addition de levure chez le taurillon n'a aucun effet ni sur le G.M.Q, ni sur l'I.C (Edwards *et al.*, 1990). Toutefois, les différentes réponses observées ont été attribuées avec réserve aux différentes souches de levures utilisées (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997).

Les résultats de performances zootechniques relatifs à l'utilisation de la levure chez les ruminants élevés pour la production de viande semblent confirmer certaines observations faites avec les femelles laitières. Les effets positifs les plus significatifs de la levure sont obtenus avec les rations les plus concentrées. L'interaction ration-levure déjà signalée pour les vaches laitières paraît être confirmée dans le cas des animaux à viande par l'absence d'effet levure chez des taurillons en pâture (Cabrera *et al.*, 2000) ou alimentés avec de la paille d'avoine (Plata *et al.*, 1994).

IV. LA LEVURE PROBIOTIQUE AMÉLIORE L'UTILISATION DIGESTIVE DE LA RATION

L'amélioration du résultat zootechnique a été attribuée à une augmentation de l'apport énergétique et azoté de la ration et non à la mobilisation des réserves corporelles (Williams and Newbold, 1990). L'augmentation des quantités ingérées et/ou une meilleure utilisation digestive de la ration semblent être principalement responsables d'une productivité accrue. Dans ces conditions, il est légitime d'attribuer à la levure un rôle dans la digestion des aliments, digestion qui peut avoir des répercussions sur la vitesse de transit (M.S.I) ou sur la fourniture énergétique et azotée de l'animal.

IV. 1. Effets sur la digestibilité totale de la ration

De nombreuses recherches *in vivo* ont été effectuées pour mettre en évidence l'effet de la levure sur les digestibilités de la MS, la MO, des constituants pariétaux (NDF et ADF) et des constituants azotés. Chez la vache laitière recevant une ration contenant 50% de concentrés, la levure augmente la digestibilité de la MS (Weidmeier *et al.*, 1987), de la MAT (Gomez-Alarçon *et al.*, 1988) et de l'NDF (Mir and Mir, 1994), et n'a pas ou peu d'effet sur la digestibilité de la MO (Van Horn *et al.*, 1984 ; Beauchemin *et al.*, 2003). D'autres études ne montrent aucune différence significative concernant l'effet de la levure sur ces mêmes paramètres (Edwards *et al.*, 1990 ; Putman *et al.*, 1997 ; Doreau and Jouany, 1998), mais ne font état d'aucune amélioration concomitante des résultats zootechniques.

La variabilité des réponses relative à l'usage de la levure probiotique chez le ruminant est difficile à expliquer et à interpréter. Dans un cas, les animaux ont reçu une alimentation contrôlée (Williams *et al.*, 1991) avec une ration *ad libitum* (Gomez-Alarçon *et al.*, 1988), et dans d'autres cas, les mesures de digestibilités ont été faites chez des vaches tarées (Enjalbert *et al.*, 1999) et chez les vaches en lactation (Erasmus *et al.*, 1992) alors que le niveau d'alimentation de ces animaux n'est sûrement pas le même. Les effets significatifs du probiotique sur la digestibilité de la ration suggèrent que la levure agirait de façon plus marquée en amont du tube digestif, principalement dans le réticulo-rumen (Williams and Newbold, 1990).

IV. 2. Effets sur la dégradabilité ruminale

La plupart des études conduites pour évaluer l'effet de la levure sur la dégradation et la dégradabilité ruminale des constituants de la rations a été réalisée en mettant en œuvre des techniques *in vitro* (Jouany *et al.*, 1991 ; Dawson, 1992 ; Jouany *et al.*, 1994 ; Newbold *et al.*, 1996) notamment la technique du Rusitec et quelques études ont été réalisées par les méthodes *in sacco* (Williams and Newbold, 1990 ; Chademana and Offer, 1990). Dans ces travaux, il est montré que l'ampleur de la dégradation de la MS, MO, ou des fibres dans le rumen, ne semble pas être influencée par la présence de levure. Par contre, l'effet levure se traduit plus précisément par une plus grande vitesse de disparition *in vitro*.

L'addition de la levure se traduit par une augmentation significative de la dégradabilité de la MS et de la MO pour des rations riches en concentrés (Chademana and Offer, 1990). Les résultats obtenus *in situ* par Williams *et al.* (1991) chez les taurillons, confirment les précédents. Ils montrent un effet levure plus marqué sur la dégradation à 12 h avec une ration composée de foin et d'orge qu'avec une ration composée uniquement de foin (Tableau 2).

Tableau 2. Effet de la levure probiotique sur la dégradabilité ruminale de la MS (%)
(D'après Williams *et al.*, 1991)

Temps d'incubation (h)	Foin		Foin + Orge	
	Témoin	+ Sc	Témoin	+ Sc
12	28,9	31,0	25,1^a	30,0^b
24	34,0	36,3	34,6	32,9
36	49,4	45,8	44,0	41,3
48	58,8	53,5	49,2	47,9

Chez la vache en lactation, une étude *in situ* (Erasmus *et al.*, 1992) met en évidence un effet levure sur la dégradation de la MS à 12 h et 24 h d'une ration acidogène alors qu'aucune différence n'est notée à 48h pour cette même ration. La dégradabilité théorique de l'ADF estimée par la technique des sachets nylon, montre un effet levure significatif chez la vache en lactation (Erasmus *et al.*, 1992 ; Doreau and Jouany, 1998), chez les bovins de boucherie (Plata *et al.*, 1994) et chez le mouton (Chademana and Offer, 1990). Les mesures réalisées *in vitro* confirment l'amélioration de la dégradation de la MS et de l'NDF avec des rations riches en GRF supplémentées en levures (Carro *et al.*, 1992).

IV. 3. Effets sur l'utilisation digestive des matières azotées alimentaires

La dégradation de la MAT de la ration du ruminant donne lieu à une production d'ammoniac (NH_3) dans le rumen dont l'importance peut être mesurée par la concentration en NH_3 de la phase liquide ruminale. Cette concentration est en fait la résultante entre la production (dégradation des MAT des aliments et recyclage de l'urée salivaire) et la disparition (absorption par la paroi du rumen, captation pour les synthèses microbiennes et disparition par le transit intestinal). Lorsque la concentration en NH_3 dans le rumen est élevée, la fraction captée pour les synthèses bactériennes est faible, entraînant une perte d'azote. Si la concentration en NH_3 est faible, cela entrave l'activité microbienne.

L'apport de levure probiotique dans la ration induit tant *in vivo* (Erasmus *et al.*, 1992 ; Arcos-Garcia *et al.*, 2000) qu'*in vitro* (Kamamma *et al.*, 1996), une réduction de la concentration ruminale en ammoniac. Cette diminution intervient très souvent lorsque la ration est riche en GRF (Carro *et al.* 1992) alors que la concentration en NH_3 du milieu ruminal ne semble pas être affectée par la présence de levure lorsque la ration est riche en fibre (Moloney, 1990). La diminution de la concentration en NH_3 de - 20 à - 34%, est attribuée à l'utilisation plus importante par les micro-organismes du rumen, dont la biomasse a augmenté avec l'addition de levure pour synthétiser des protéines microbiennes et non par une diminution de l'activité protéolytique microbienne (Harrison *et al.*, 1988 ; Williams and Newbold, 1990). Par ailleurs, une plus importante synthèse de protéines microbiennes de + 9,4% est confirmée par Erasmus *et al.* (1992) qui met en évidence l'augmentation du flux d'azote microbien dans le duodénum et donc de l'absorption d'azote non ammoniacal dans l'intestin grêle chez les vaches laitières supplémentées en levure.

IV. 4. Effets sur la production ruminale de gaz

Contrairement aux autres paramètres mesurés pour déterminer l'action de la levure probiotique sur l'utilisation de la ration, peu d'études ont été réalisées à notre connaissance sur la production des gaz au cours de la fermentation. Les études *in vitro* montrent que la levure stimule la production de CH_4 , de CO_2 et d' H_2 lorsque la ration est composée de foin (Zelenak *et al.*, 1994) ou qu'elle est très riche en concentré amylicé (Carro *et al.*, 1992). Une autre étude effectuée sur des taurillons (Mutsvangwa *et al.*, 1992) montre une baisse significative de la production totale de gaz à 24 et 48 h en présence de levure alors qu'une moindre production de CH_4 est observée après 12 h. Nous n'avons pas trouvé de résultats

d'essai réalisé *in vivo* dont l'objectif aurait été de mesurer directement chez l'animal, l'effet de la levure sur la production de gaz de fermentation.

V. EFFET LEVURE SUR LA MICROFLORE RUMINALE

La microflore ruminale anaérobie joue un rôle capital dans la digestion des fibres alimentaires. Lorsque la ration comporte une large part de GRF, l'activité des bactéries cellulolytiques est diminuée, et en conséquence la digestion de la partie fibreuse de la ration est détériorée. Dans ces conditions, l'apport de levure probiotique pour restaurer la digestion des fibres doit tout d'abord favoriser le développement de la flore spécifique. Afin d'en comprendre le mode d'action et pour expliquer l'amélioration des résultats zootechniques, de nombreuses recherches ont été orientées vers les modifications que la levure probiotique serait susceptible de générer au niveau de la biocénose ruminale.

V. 1. Effet de la levure probiotique sur le nombre total des bactéries du rumen

La levure probiotique stimule la croissance de l'ensemble des bactéries anaérobies du rumen par rapport au témoin chez la vache laitière recevant une ration riche en concentrés (Weidmeier *et al.*, 1987), mais son effet est plus marqué avec des rations à caractère acidogène (Harrison *et al.*, 1988) qu'avec des rations fibreuses (Dawson *et al.*, 1990). Les essais conduits *in vitro* (en batch ou en RUSITEC), confirment ces observations (Offer, 1990 ; Newbold *et al.*, 1998) et montrent que l'effet stimulant de la levure vis-à-vis de la flore est irrégulier : il dépend de la teneur en GRF des régimes. L'effet serait aussi plus marqué sur les bactéries anaérobies strictes telles que les fibrolytiques et les bactéries utilisatrices de lactate que sur les bactéries anaérobies facultatives comme les amylolytiques (Chaucheyras *et al.*, 1997). En cela, l'effet de la levure sur la stimulation de la microflore totale serait en accord avec les observations faites précédemment sur la digestion des fibres.

D'autres études (Newbold and Wallace, 1992 ; Newbold *et al.*, 1995) ont montré des différences d'efficacité entre les souches de *S. cerevisiae*. Les résultats suggèrent que les souches utilisées en brasserie ont une meilleure capacité à stimuler la biocénose ruminale que celles utilisées en boulangerie (Figure 14).

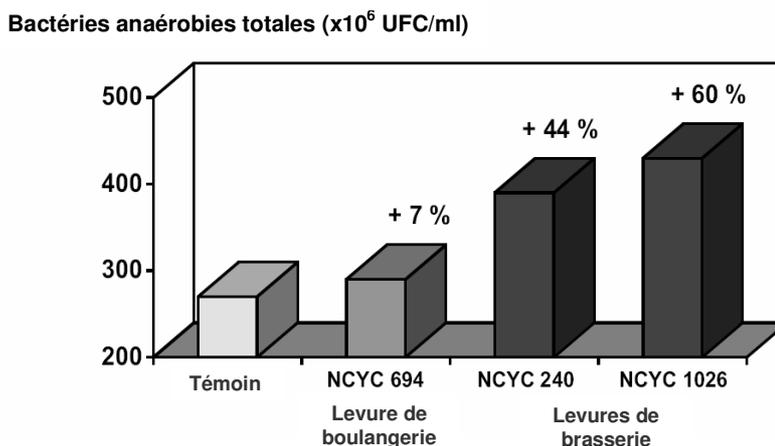


Fig. 14. Effets de différentes souches de levures sur la population bactérienne ruminale en culture mixte (Adaptée de Newbold and Wallace, 1992).

V. 2. Effet de la levure sur les bactéries cellulolytiques du rumen

Au sein de la microflore ruminale, la population des bactéries cellulolytiques subit un accroissement lors de la supplémentation en levure d'une ration riche en GRF. Les principales bactéries cellulolytiques *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* ont, *in vitro*, un temps de croissance diminué de 20 à 40% (Girard and Dawson, 1994). Chez le mouton alimenté avec une ration comprenant 66% orge, Chaucheyras *et al.* (1997) ont montré que les proportions d'ARN ribosomal de *Fibrobacter succinogenes*, *R. albus* et *R. flavefaciens* sont significativement augmentées (respectivement de +5,2, +0,5 et +3,8%) avec la levure probiotique, au détriment des autres bactéries (Figure 15).

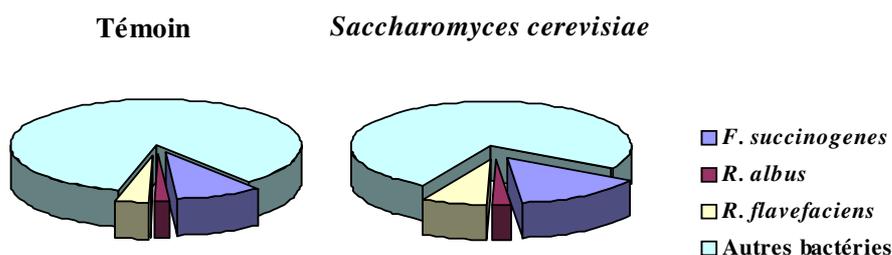


Fig. 15. Effet de la levure sur la proportion d'ARN ribosomal des bactéries ruminales (D'après Chaucheyras *et al.*, 1997).

In vitro, la levure augmente la vitesse de dégradation de la cellulose en stimulant ces bactéries (+ 11% à 24 h) alors que la quantité totale de cellulose dégradée n'est pas modifiée (Callaway and Martin, 1997). Cette plus grande vitesse de disparition peut être expliquée par une activité accrue des enzymes *CMCase* et *xylanase* mesurée dans les

phases solide et liquide ruminales chez le mouton (Michalet-Doreau *et al.*, 1997 ; Jouany *et al.*, 1999). Bien que l'activité de ces espèces bactériennes soit réduite lorsque de faibles valeurs de pH ruminal sont atteintes, Wallace and Newbold (1993) suggèrent que la levure probiotique crée des conditions favorables aux activités métaboliques des cellulolytiques, en augmentant notamment l'anaérobiose du milieu ruminal. Cette hypothèse est appuyée par d'autres auteurs (El Hassan *et al.*, 1993) qui préconisent l'utilisation des levures vivantes plutôt que des extraits de levures pour modifier les paramètres physico-chimiques du rumen et stimuler la flore cellulolytique.

V. 3. Effet de la levure sur les bactéries utilisatrices de lactate du rumen

Les bactéries anaérobies utilisatrices de lactate *S. ruminantium* et *M. elsdenii*, sont à l'image des bactéries cellulolytiques, stimulées dans certaines conditions par la levure probiotique. La plupart des études réalisées *in vitro* (Nisbet and Martin, 1990 ; Nisbet and Martin, 1994) montrent l'efficacité de la levure probiotique à stimuler à la fois la croissance et l'activité de ces bactéries. Mais, Chaucheyras *et al.* (1996) mettent en évidence par des tests *in vitro*, que des levures vivantes sans milieu de culture ont un effet semblable à celui des levures accompagnées de leur milieu, lorsque le substrat utilisé est riche en GRF.

Par ailleurs, il a été précisé que *S. ruminantium* requiert de l'aspartate, de la biotine et de l'acide para-aminobenzoïque pour sa croissance (Linehan *et al.*, 1978). Si l'activité de cette bactérie augmente en présence de la levure associée à son milieu de culture (Nisbet and Martin, 1991 ; 1993), cet effet pourrait être attribué à la mise à disposition de facteurs de croissance provenant du milieu de culture de la levure. Cela ne saurait être le cas lorsqu'une souche pure est utilisée. La transformation du lactate par *M. elsdenii* est aussi stimulée par la levure probiotique (Waldrip and Martin, 1993 ; Rossi *et al.*, 1995) mais la présence de malate ou autres acides dicarboxyliques n'affecte pas son activité (Newbold *et al.*, 1996). On peut en conclure que la levure vivante est en mesure de restaurer des conditions ruminales indispensables à l'activité de *M. elsdenii* et qui ont disparu lors de l'ingestion d'une ration acidogène.

VI. EFFET DE LA LEVURE SUR LE pH ET SUR LE FACIÈS FERMENTAIRE

De nombreux auteurs ont suggéré que l'action principale de la levure probiotique porte sur la stabilisation du pH ruminal (Williams *et al.* 1991 ; Wallace and Newbold,

1992 ; Kumar *et al.*, 1994). Avec des rations riches en GRF, l'acidification du rumen amorcée par une modification profonde de la flore se traduit par une baisse marquée du pH ruminal (état d'acidose) et se répercute sur les réponses zootechniques. Dans une majorité de situations d'acidose chronique, la diminution du pH ruminal est attribuée à une augmentation de la teneur en acide lactique (Russell and Hino, 1985) ou de la teneur en AGV totaux (Sauvant *et al.*, 1999).

VI. 1. Effet de la levure sur le pH et la teneur ruminale en lactate

Lorsqu'une ration apporte une quantité accrue de GRF (amidon, substances pectiques), la bactérie *S. bovis* produit dans un premier temps une quantité plus importante d'AGV, laquelle a pour effet d'amorcer un début d'acidification du milieu qui en retour modifie l'activité fermentaire de *S. bovis*. Dans cet environnement légèrement acidifié *S. bovis* accroît sa production d'acide lactique qui provoque une baisse plus marquée du pH ruminal (Cotta, 1992). Cette production d'acide lactique n'est pas, dans ce milieu acidifié, contrebalancée par l'activité des bactéries *S. ruminantium* et *M. elsdenii* utilisatrices de lactate et la concentration en lactate dans le rumen augmente.

Chez le mouton (Fiems *et al.* 1993 ; Michalet-Doreau and Morand, 1996), l'incorporation de levure dans une ration riche en GRF a pour effet de stabiliser le pH ruminal. Cet effet levure a été expliqué (Williams *et al.* 1991) par une diminution de la concentration en lactate dont le pic se produit 2 heures après le repas (Figure 16). Les valeurs de pH se maintiendraient ainsi à des seuils permettant aux bactéries cellulolytiques de retrouver une activité normale (Russell and Dombrowski, 1980).

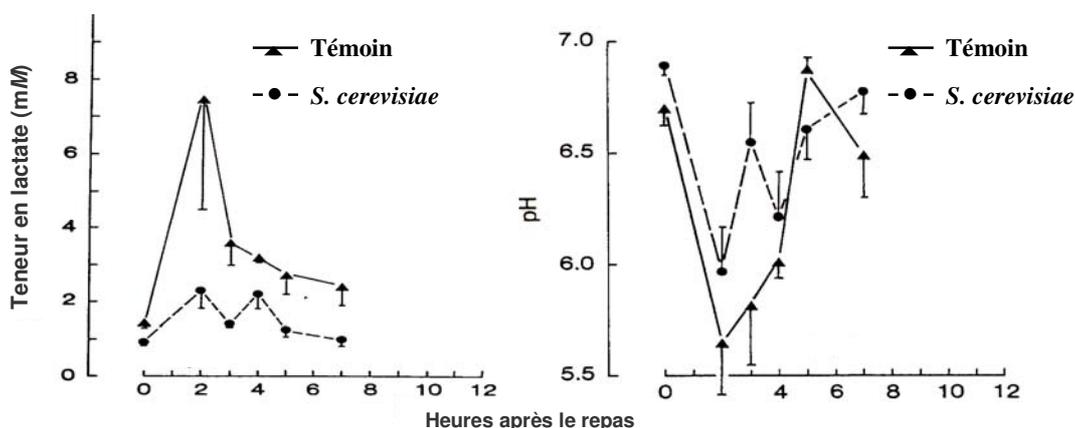


Fig. 16. Effet de la levure probiotique sur la teneur en lactate et sur le pH ruminal
(D'après Williams *et al.*, 1991)

Lorsque la ration est constituée principalement de fibres, la levure probiotique semble n'avoir aucun effet sur les valeurs de pH mesurées *in vitro* (Carro *et al.*, 1992) ou *in vivo* (Plata *et al.*, 1994). Ces résultats sont confirmés par d'autres travaux qui établissent le lien entre l'effet levure et la nature acidogène de la ration et suggèrent que l'addition de levure est inutile quand le pH ruminal est supérieur à 6 après le repas (Miranda *et al.*, 1996 ; Yoon and Stern, 1996). Cependant, il est rare qu'une différence significative soit mise en évidence dans les essais *in vitro* (Zelenak *et al.*, 1994 ; Miller-Webster *et al.*, 2002). La raison est sans doute liée au fait que les cultures en batch ou en RUSITEC utilisent un milieu tamponné, généralement à pH neutre et qu'il est difficile dans ces conditions selon Jouany *et al.* (1994), de montrer un quelconque effet de la levure.

La levure probiotique stabilise le pH ruminal chez les animaux recevant des rations riches en GRF, en favorisant l'activité des bactéries utilisatrices de lactate qui limite l'accumulation de cet acide dans la panse.

VI. 2. Effet de la levure sur les concentrations ruminales en AGV

Les principaux AGV (acétate, propionate et butyrate) issus de l'activité fermentaire, sont absorbés continuellement par la paroi ruminale. Les réponses à l'apport de la levure probiotique sur ces paramètres fermentaires sont très variables. Avec des rations riches en concentrés, l'effet de la levure se manifeste généralement par une hausse significative des teneurs en AGV de l'ordre de 6% chez la vache laitière (Doreau and Jouany, 1998), de 8% chez le bufflon (Koul *et al.*, 1998) et de 8,5% chez la brebis (Arcos-Garcia *et al.*, 2000). Chez les animaux recevant une ration fibreuse, aucun effet levure n'est observé sur les teneurs en AGV par rapport au témoin (Miranda *et al.*, 1994 ; Plata *et al.*, 1994). Les études *in vitro* ne permettent généralement pas de mettre en évidence d'effet levure significatif sur ces produits terminaux de la fermentation dans le milieu. Les raisons les plus souvent invoquées sont les variations de la concentration et du type de levure, de la concentration et du type de substrats et des conditions de culture utilisées (Martin and Nisbet, 1992).

L'effet de la levure sur les concentrations en AGV du milieu ruminal est d'autant plus marqué que la ration est plus riche en GRF. Aussi, Roa *et al.* (1997) montrent chez des bovins en croissance nourris avec des rations à base de sorgho que l'effet de la levure probiotique sur les concentrations en AGV et sur la stabilisation du pH ruminal est d'autant plus grand que les rations sont riches en concentrés. Chez le mouton, l'incorporation progressive d'orge dans la ration a permis de montrer que l'effet levure sur la teneur en

lactate et sur le pH ruminal se manifeste pour un taux d'incorporation de 66% d'orge (Michalet-Doreau and Morand, 1997). Dans ces conditions, la stabilisation du pH semble pouvoir être attribuée à la seule diminution de la teneur en lactate (Tableau 3).

Tableau 3. Influence d'un apport d'orge et de levures sur les fermentations ruminales
(D'après Michalet-Doreau and Morand, 1997)

Orge (%)		0	20	35	55	66	ES	Effet	
								Sc	ScxO
pH	Témoin	6,75	6,30	6,17	5,88	5,46	0,26	0,11	0,001
	+ Sc	6,73	6,24	6,16	5,79	5,81			
Lactate (g/L)	Témoin	0,079	0,099	0,151	0,190	0,405	0,076	0,06	0,001
	+ Sc	0,089	0,111	0,187	0,221	0,259			
AGV (mM)	Témoin	82,7	89,3	91,1	100,6	105,9	14,0	0,52	0,001
	+ Sc	84,8	97,1	98,3	102,9	90,0			

ES: Erreur Standard ; O: Orge ; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

La levure modifie aussi les proportions d'AGV. Son effet se traduit par une stimulation de la propionogénèse de 18,6% observée chez la vache laitière (Erasmus *et al.*, 2005) alors qu'*in vitro*, une hausse de 8,5% est obtenue lorsque l'effet levure est positif (Newbold *et al.*, 1995). Une diminution du rapport acétate/propionate est aussi rapportée et cela malgré une légère augmentation de la concentration en acétate (Piva *et al.*, 1993).

Ces divers résultats montrent que la levure probiotique stabilise le pH chez des animaux recevant une ration acidogène en évitant l'accumulation de lactate dans le rumen. Elle favorise l'activité des bactéries cellulolytiques qui augmente la production globale des AGV et la transformation accrue du lactate en propionate, expliquant ainsi l'abaissement du rapport acétate/propionate.

VII. LE MODE D'ACTION DE LA LEVURE PROBIOTIQUE

Dans les conditions d'alimentation où la ration comporte une forte proportion de GRF et présente un caractère acidogène, la levure probiotique a pour effet d'améliorer les performances de production des animaux. Celles-ci sont exprimées par une plus grande ingestion de la ration, par une meilleure valorisation des fibres et de l'azote alimentaire rendue possible par la stabilisation du pH ruminal. L'effet levure se manifeste par une

stimulation des bactéries anaérobies utilisatrices de lactate et des bactéries cellulolytiques. **Mais comment la levure probiotique peut-elle stimuler ces diverses espèces bactériennes ?**

Si l'on attribue à l'accumulation de lactate dans le rumen, un rôle déterminant dans l'acidification de ce milieu, parce que complémentaire d'une production parfois accrue d'AGV, il paraît légitime que divers auteurs aient cherché à traduire le mode d'action de la levure soit en terme de réduction de sa production soit en terme d'augmentation de sa transformation en propionate. Ainsi pour expliquer la moindre concentration en lactate dans le rumen lorsque la levure est ajoutée à une ration riche en GRF, plusieurs hypothèses ont été formulées.

La production et la fourniture à *Megasphaera elsdenii* et à *Selenomonas ruminantium*, de certaines molécules facteurs de croissance (acides dicarboxyliques, acides aminés et vitamines) par *S. cerevisiae* provoquant une activation du métabolisme du lactate, et sa transformation en propionate, pour un effet moins négatif sur le pH (Martin and Nisbet, 1992).

Selon de récentes synthèses bibliographiques (Durand-Chaucheyras *et al.*, 1997 ; Dawson, 2000), la première hypothèse formulée pour expliquer l'effet levure réside dans la stimulation des bactéries utilisatrices de lactate. La levure fournirait à ces bactéries des acides dicarboxyliques, notamment l'acide malique, des vitamines et des acides aminés. Ces facteurs de croissance semblent provoquer l'activation du métabolisme du lactate et par conséquent atténuer la chute du pH ruminal post-prandial. Des études *in vitro* ont montré que la capacité de *S. ruminantium* à dégrader le lactate est multipliée par 4 en présence de fumarate ou d'aspartate et par 10 avec le malate (Nisbet and Martin, 1990). Ces acides agiraient comme accepteurs finaux d'électrons dans le processus d'obtention d'ATP par cette bactérie selon Nisbet and Martin (1991). Si l'ajout de levure dans le milieu de fermentation augmente fortement ($\times 9$) la consommation de lactate (Martin and Nisbet, 1992) c'est parce qu'elle pourrait fournir des acides dicarboxyliques à *S. ruminantium* qui en conséquence augmenterait sa croissance et donc son activité fermentaire.

Pourtant, Newbold *et al.* (1996) ont observé *in vitro* que les concentrations en L-malate dans plusieurs souches de levure *S. cerevisiae* sont négligeables et n'ont pu mettre en évidence un lien entre les teneurs en malate de ces différentes souches et leurs effets sur la stimulation du nombre total de bactéries anaérobies ruminales. Dans un essai effectué chez le mouton, ces mêmes auteurs montrent effectivement que seule une dose importante

d'acide malique (dose qui est 2,5 fois supérieure à celle généralement présente dans 4 g de levure probiotique) pourrait avoir un effet sur la flore bactérienne, particulièrement la flore cellulolytique.

Si d'autres travaux, (Dawson and Newman, 1988 ; Girard and Dawson, 1994), confirment l'intérêt d'un apport de facteurs de croissance aux bactéries anaérobies, la levure fournirait en outre des peptides indispensables à la croissance des bactéries cellulolytiques et des acides aminés pour la stimulation de *M. elsdenii*. Cette hypothèse n'est que partiellement convaincante, en effet comment expliquer que seules les bactéries utilisatrices de lactate soient en mesure de profiter de ces molécules ? Ainsi, Van Kessel et Russell (1996) rapportent que l'activité de la bactérie productrice de lactate *S. bovis* semble être aussi augmentée en présence d'acides aminés dans un milieu acidogène. Dans ces conditions, l'apport de facteurs de croissance favoriserait la production du lactate contraire à la diminution de sa concentration dans le rumen.

La compétition de *S. cerevisiae* avec *Streptococcus bovis*, pour l'utilisation de certains oses.

La deuxième hypothèse pour expliquer la limitation de l'accumulation de lactate dans le rumen a été attribuée à une compétition dans l'utilisation des oses et notamment du glucose, entre la levure probiotique et la bactérie productrice de lactate *S. bovis* limitant ainsi sa croissance (Chaucheyras *et al.*, 1996). Selon les auteurs, si cette bactérie ne dispose pas de tout le glucose qu'elle est capable de métaboliser, la quantité de lactate produite est diminuée.

Alors que sa biomasse ne s'accroît pas dans les réservoirs fermentaires du ruminant, il paraît fort improbable que la dose commerciale de levure probiotique qui varie selon les firmes entre 1 et 8 g pour la vache laitière, apportée dans un rumen de 150 L puisse par son propre métabolisme, perturber l'activité de *S. bovis* dans son milieu de prédilection (milieu acidogène) au point d'en influencer son activité métabolique. Il paraît tout aussi improbable que quelques grammes de levure probiotique puissent suffire à fournir assez de malate ou d'autres acides dicarboxyliques dans le milieu ruminal pour en modifier les orientations métaboliques. Il est aussi difficile de conclure que la levure pourrait ne fournir ces co-facteurs qu'à certaines espèces et non pas à l'ensemble des bactéries ruminales.

La raison majeure semble résider dans le fait qu'aucune distinction n'est faite entre la levure vivante (levure probiotique) apportée à des doses journalières variant de 1 à 8 g

par jour et la levure morte (culture ou extrait de levure) apportée à des doses bien supérieures.

Enfin, **la levure serait capable de renforcer le caractère anaérobie du rumen.**

Le milieu ruminal est caractérisé comme étant fortement réducteur et les micro-organismes présents, anaérobies strictes ou facultatifs sont très sensibles à la présence d'O₂. Or, de l'oxygène parvient dans le rumen avec l'eau de boisson et le bol alimentaire (Broberg, 1957 ; Marounek *et al.*, 1982) ou par diffusion à travers la paroi du rumen (Barnes *et al.*, 1983). Cet oxygène est majoritairement présent dans la phase gazeuse (Mac Arthur and Multimore, 1962 ; Czerkawski, 1969) alors que des traces d'O₂ peuvent être difficilement être détectées dans la phase liquide du rumen (Scott *et al.*, 1983). La pénétration d'O₂ dans le rumen provoque une remontée du potentiel redox (E_h) et l'addition de levure dans une ration a pour effet de diminuer le E_h plus rapidement que chez les animaux témoins (Mathieu *et al.*, 1996)

D'après Rose (1987), repris par Newbold *et al.* (1993), la levure serait capable de capter les traces d'oxygène toxiques pour les bactéries anaérobies strictes. Elle renforce ainsi le caractère réducteur du milieu ruminal, et stimulerait par ce biais l'activité des bactéries anaérobies strictes. Dans une étude comparative, Newbold *et al.* (1996) ont montré que l'addition de levure stimule significativement l'assimilation d'O₂ par le liquide ruminal mais que le mutant de cette même levure, dépourvu de l'activité respiratoire, n'a pas d'action sur l'assimilation de l'O₂ et donc n'a aucun effet sur les microbes du rumen et en conséquence sur la cellulolyse.

La capacité de la levure à utiliser des traces d'oxygène présentes dans le rumen semble lui conférer la capacité d'améliorer le pouvoir réducteur de l'environnement des bactéries cellulolytiques ruminales. En renforçant le caractère réducteur du milieu, elle accroît l'activité métabolique de ces bactéries qui amène à une meilleure adhésion aux tissus fibreux et favorise leur dégradation (Roger *et al.*, 1990). Toutefois, si Marounek et Wallace (1984) ont attribué la baisse du potentiel redox dans le rumen à la captation d'oxygène dans le rumen par la levure, Giger-Reverdin *et al.* (2006) pensent plutôt que l'intensité des activités fermentaires microbiennes en est responsable et contestent l'idée du rôle négatif de l'O₂ pour expliquer les importantes variations du E_h dans le rumen au cours du nyctémère.

Chapitre 3

L'approche

Thermodynamique

Toute cellule vivante a besoin d'énergie, sous une forme ou sous une autre, et une des fonctions majeures du métabolisme est de fournir à cette cellule une forme d'énergie utilisable. L'énergie se définit le plus simplement comme la capacité d'accomplir un travail ou celle de provoquer des changements particuliers. Ainsi, tout processus physique ou chimique est le résultat d'une utilisation ou d'un transfert d'énergie.

Dans une cellule vivante, l'ensemble des réactions chimiques qui s'y déroulent est appelé "métabolisme". Par le biais de ces réactions, il y a dégradation (*catabolisme*) et construction (*anabolisme*). Dans le catabolisme, des molécules plus grosses et plus complexes sont fragmentées en molécules plus petites et plus simples avec libération d'énergie. Une partie de cette énergie est captée et rendue disponible pour un travail ; le reste est libéré sous forme de chaleur. L'énergie piégée peut être utilisée dans l'anabolisme. L'anabolisme est la synthèse de molécules complexes à partir de précurseurs plus simples avec consommation d'énergie.

Presque toute l'énergie vitale sur la Terre est fournie directement ou indirectement par le Soleil, et cette énergie est capturée par photosynthèse. Parmi les produits de la photosynthèse figurent des produits énergétiques potentiels comme les sucres et les polysaccharides et qui à leur tour, subissent d'autres transformations régies par les lois de la thermodynamique.

I. LA THERMODYNAMIQUE

La thermodynamique analyse les changements d'énergie dans un ensemble de matières (plante, animal, bactérie, etc.) qu'on appelle un système. Elle concerne les différences énergétiques entre l'état initial et final d'un système et ne se préoccupe pas de la vitesse du processus. Un système ne peut créer de l'énergie mais il possède la faculté de la transformer, de l'utiliser et de l'échanger satisfaisant ainsi au premier principe de la thermodynamique. De plus, ce système crée de l'ordre et le maintient par la fabrication ses molécules. Il échappe ainsi au second principe de la thermodynamique mais en contrepartie elle augmente l'entropie (désordre) de l'univers.

I. 1. Le Premier principe de la thermodynamique

La première loi stipule que la somme de toutes les énergies d'un système isolé, c'est-à-dire d'un système qui n'échange ni travail ni chaleur avec l'extérieur, est constante. "L'énergie ne peut être ni créée ni détruite, mais peut être convertie d'une forme à l'autre".

Elle a été appliquée à la biologie animale, notamment pour les bilans énergétiques depuis le 18^{ème} siècle. Elle a servi à décrire la valeur énergétique d'une ration et comment cette énergie peut être transformée en lait ou en viande. En d'autres termes, l'énergie présente dans la matière fécale, dans l'urine et les gaz de fermentation (CH₄), ajoutée à celle utilisée pour la croissance, la production de lait ou de viande et le maintien de la température corporelle est égale à l'énergie présente dans la ration. Bien qu'il soit exact que l'énergie est conservée dans l'univers, le premier principe de la thermodynamique ne rend pas compte de nombreux processus physiques et chimiques.

I. 2. Le deuxième principe de la thermodynamique

La deuxième loi de la thermodynamique postule que l'entropie de l'univers ($S_{univers}$) augmente pour un processus irréversible ou reste inchangée pour une réaction réversible. L'entropie (S) est le terme utilisé pour mesurer le "désordre" dans un système et elle est exprimée en J.K⁻¹. L'entropie augmente avec la température et avec l'état physique (solide < liquide < gazeux) d'une substance. Par exemple, un cube de glace (structure bien ordonnée) a une entropie moindre que celle de l'eau liquide ou celle de la vapeur d'eau (structure désordonnée). Puisque l'entropie de l'univers ($S_{univers}$) est égale à la somme de l'entropie du système (S_{syst}) et de l'entropie du milieu extérieur, (S_{ext}), le deuxième principe se traduit par la relation:

$$\Delta S_{univers} = \Delta S_{syst} + \Delta S_{ext} > 0$$

Donc, une réaction qui a pour conséquence un accroissement de l'entropie de l'univers se produit spontanément. Par contre, si $\Delta S_{univers}$ est négatif, cela signifie que la réaction inverse a lieu spontanément. Une variation d'entropie de l'univers nulle est le signe que le système est en équilibre.

En résumé, le premier principe de la thermodynamique stipule qu'une réaction chimique n'occasionne aucun changement de l'énergie totale de l'univers ; la variation d'énergie du système est égale à l'inverse de la variation d'énergie du milieu extérieur. Le second principe dit que toute réaction chimique spontanée se traduit toujours par une augmentation de l'entropie et, de ce fait, du désordre de l'univers.

II. L'ÉNERGIE LIBRE

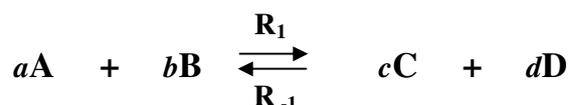
Pour savoir si une réaction est spontanée, on doit donc considérer à la fois les variations d'entropie du système et du milieu extérieur, puisque c'est le changement d'entropie de l'univers qui détermine la spontanéité. J. W. Gibbs (1839-1903), chimiste américain montra que le second principe pouvait être réécrit de manière à ce que la spontanéité puisse être exprimée par une nouvelle fonction d'état du système, la fonction de Gibbs, plutôt que par la variation d'entropie de l'univers. Le premier et le second principe se combinent en mettant en relation les variations d'énergie qui peuvent se produire dans des réactions chimiques.

$$\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S_{univers}$$

ΔG est la variation d'énergie libre (J. mol⁻¹), ΔH la variation d'enthalpie (J. mol⁻¹), T , la température en Kelvin et ΔS , la variation de l'entropie se produisant pendant la réaction. L'enthalpie désigne la quantité de chaleur relâchée (valeur négative) ou absorbée (valeur positive) par une réaction chimique à pression constante.

III. LA CONSTANTE D'EQUILIBRE

La variation d'énergie libre a une relation définie et concrète avec le sens de la réaction chimique. Pour expliciter la relation de ΔG et les concentrations en substrats et produits, la réaction générale suivante est considérée:



Si les réactifs A et B sont mélangés, ils se combineront pour former les produits C et D. Ceci pourrait se faire si C et D sont suffisamment concentrés et se combinent pour produire A et B à la même vitesse qu'ils se forment à partir de A et B. Ainsi, les vitesses des deux directions sont égales ($R_1 = R_{-1}$) et les concentrations des réactifs et produits ne varient plus : la réaction est à l'équilibre. Cette situation est décrite par la constante d'équilibre (K_{eq}) reliant les concentrations à l'équilibre des produits et des substrats.

$$\ln K_{eq} = \left\{ \frac{[\mathbf{C}]^c \times [\mathbf{D}]^d}{[\mathbf{A}]^a \times [\mathbf{B}]^b} \right\}$$

Si la constante d'équilibre est plus grande que 1, la concentration des produits à l'équilibre est plus élevée que celle des réactifs, c'est-à-dire la réaction tend à être complète.

La constante d'équilibre d'une réaction est en relation directe avec la variation d'énergie libre. La variation d'énergie libre d'un processus, déterminée dans des conditions standard soigneusement définies de concentration, pression, pH et température, est appelée variation d'énergie libre standard (ΔG°). Cette dernière représente la quantité maximale d'énergie dont dispose un système pour fournir un travail dans des conditions standard. L'utilisation des valeurs de ΔG° permet de comparer des réactions sans se préoccuper des variations de ΔG dues à des différences de conditions d'environnement. La relation entre ΔG° et K_{eq} est donnée par l'équation suivante :

$$\Delta G^\circ = - R T \ln K_{eq}$$

R est la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$). L'analyse de cette équation montre que quand ΔG° est négatif, la constante d'équilibre est supérieure à 1 et la réaction sera complète. On dit que la réaction est *exergonique*. Une réaction est *endergonique* lorsque la constante d'équilibre est inférieure à 1 et n'est donc pas favorable car il y aura peu de produits formés à l'équilibre dans des conditions standard. Bien que la valeur de ΔG° indique où se situe la réaction à l'équilibre, elle ne montre pas la vitesse avec laquelle la réaction atteint l'équilibre.

Les valeurs de l'énergie de Gibbs, d'enthalpie et d'entropie de formation dans leurs états standard (ΔG°_f , ΔH°_f et ΔS°_f respectivement) sont données dans des tables "constantes thermodynamiques". Le changement de ΔG° d'une réaction peut être calculé partir de ΔH° et de ΔS° à partir des ΔG°_f des produits et des réactifs :

$$\Delta G^\circ_r = (\Delta G^\circ_f \text{ des produits}) - (\Delta G^\circ_f \text{ des réactifs})$$

IV. L'ATP : LA MONNAIE ÉNERGÉTIQUE

Pour satisfaire ses besoins énergétiques, chaque cellule vivante (ex : bactérie) a la capacité métabolique de transformer l'énergie chimique potentielle en énergie biologique utilisable sous forme d'ATP. Formée à partir d'adénosine di-phosphate (ADP) et de phosphate inorganique (P_i), l'ATP (adénosine tri-phosphate) est la molécule riche en énergie, présente dans tous les systèmes vivants. C'est la monnaie énergétique universelle.

Elle est impliquée dans la biosynthèse des constituants cellulaires, le transport, la mobilité ainsi que d'autres activités cellulaires.

En référence à l'ATP, le terme molécule riche en énergie, signifie que l'hydrolyse du groupe phosphate terminal s'accompagne d'une grande variation d'énergie libre négative, ou que la réaction est très exergonique.



En d'autres mots, l'ATP est doté d'un potentiel de transfert de groupe phosphate élevé et convient parfaitement dans son rôle de monnaie énergétique. Il est synthétisé durant les processus captant ou générant de l'énergie tels que la respiration aérobie, la respiration anaérobie et la fermentation. En énergétique cellulaire, l'hydrolyse de l'ATP est couplée à de nombreuses réactions endergoniques et permet à ces réactions de se dérouler. En d'autres termes, l'ATP relie les réactions génératrices d'énergie libre à celles qui en requièrent.

V. LES RÉACTIONS D'OXYDO-RÉDUCTION

Les variations d'énergie libre se rapportent non seulement aux équilibres des réactions chimiques ordinaires, mais encore aux réactions d'oxydo-réduction (redox). La libération de l'énergie implique normalement des réactions redox. Les réactions d'oxydo-réduction sont celles où des électrons se déplacent d'un donneur, l'agent réducteur ou réducteur vers un accepteur d'électrons, l'agent oxydant ou oxydant. Par convention une telle réaction s'écrit avec le réducteur à droite de l'oxydant et du nombre (n) d'électrons (e) transférés.

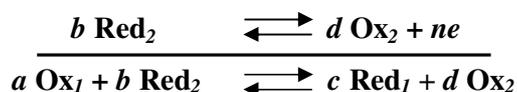


Quand un oxydant accepte des électrons, il devient le réducteur du couple. Les électrons n'existant pas à l'état libre, deux systèmes sont nécessaires,

l'un fournissant des électrons :



l'autre les acceptant :



Le ΔG pour une réaction d'oxydo-réduction s'écrit :

$$\Delta G = \Delta G^\circ + R T \ln \left\{ \frac{[\text{Red}_1]^c \times [\text{Ox}_2]^d}{[\text{Ox}_1]^a \times [\text{Red}_2]^b} \right\}$$

Si $\Delta G < 0$ la réaction évoluera spontanément de la gauche vers la droite et si $\Delta G > 0$, l'effet inverse est observé.

V. 1. La Force électromotrice

Lorsque des électrons sont transférés d'un réducteur à un accepteur avec un potentiel redox plus positif, de l'énergie libre est libérée. Le ΔG de la réaction d'oxydo-réduction est en relation directe avec la différence entre les potentiels de réduction des couples. Plus grand est ΔE et plus grande sera la quantité d'énergie libre disponible comme le montre l'équation :

$$\Delta G = -nF \Delta E$$

dans laquelle ΔE est la différence de potentiel électrique ou la force électromotrice (**f.e.m**), n est le nombre d'électrons transféré par mole du réactif et F la charge transférée – exprimée par la constante de Faraday ($1 F = 96\,487$ Coulombs).

Le signe négatif est la conséquence de la convention attribuant un signe positif à la f.e.m. En combinant les deux équations ci-dessus, la différence de potentiel d'oxydo-réduction entre deux couples s'écrit:

$$\Delta E = \frac{\Delta E^\circ}{nF} - R T \ln \left\{ \frac{[\text{Red}_1]^c \times [\text{Ox}_2]^d}{[\text{Ox}_1]^a \times [\text{Red}_2]^b} \right\}$$

La force du système oxydo-réducteur est définie par son **Potentiel d'oxydoréduction**. Le signe de ΔE renseigne sur le sens d'évolution de la réaction. En effet, si $\Delta E > 0$, la réaction est exergonique et spontanée et si $\Delta E < 0$, la réaction est endergonique et elle ne se produit pas spontanément.

V. 2. Le Potentiel de réduction standard

La constante d'équilibre (E°) de la réaction appelée potentiel de réduction standard ; elle mesure la tendance de l'agent réducteur à perdre des électrons. Le potentiel de réduction a une signification très concrète. Les couples redox ayant des potentiels de réduction plus négatifs cèderont des électrons aux couples à potentiel plus positif qui les acceptent en raison d'une plus grande affinité pour les électrons. Ainsi, les électrons tendront à se déplacer des réducteurs vers des oxydants.

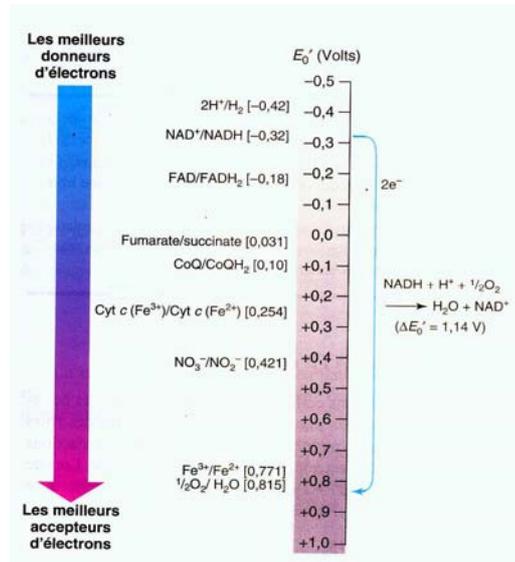
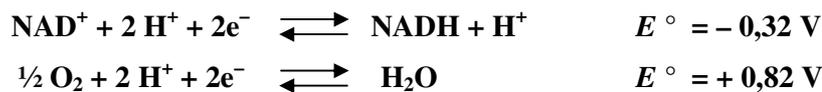


Fig. 17. Mouvement des électrons et potentiels de réduction

Ceci peut se représenter sous forme d'une "tour d'électrons" où les potentiels de réduction les plus négatifs occupent le sommet (Figure 17^r). Les électrons passent d'un donneur à un accepteur en descendant le gradient de potentiel : plus le donneur est éloigné de l'accepteur, plus l'énergie libérée est grande.

Une réaction redox utile a lieu dans un système biologique quand l'électron et le proton qui l'accompagne sont enlevés d'un substrat par voie enzymatique et transférés à un transporteur d'électron tel que la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+). Un transporteur d'électron est un intermédiaire qui porte les électrons d'un donneur à un accepteur. La réduction NAD^+ donne $NADH$ et un proton.



Comme $NAD^+/NADH$ est plus négatif que $1/2 O_2/H_2O$, les électrons se déplacent du $NADH$ (le réducteur) vers l' O_2 (l'oxydant). La différence entre les deux potentiels est de 1,14 volts. Quand les électrons se déplacent du $NADH$ à l' O_2 pendant la respiration aérobie, une quantité importante d'énergie libre est disponible pour la synthèse d'ATP, soit un ΔG de -220 kJ.mol^{-1} . Si de l'énergie est libérée lors du transfert d'électrons de potentiels de réduction négatifs vers des positifs, un apport d'énergie est requis pour que

^r Source : Prescott et al. (2003)

les électrons soient transférés en sens inverse, c'est-à-dire des potentiels plus positifs vers les plus négatifs.

V. 3. Les modes de libération d'énergie

L'énergie libérée durant les transferts des électrons est piégée sous forme d'ATP. Les microorganismes utilisent en général une des trois sources d'énergie : les *phototrophes* capturent l'énergie radiante du soleil, les *chimioorganitrophes* oxydent des molécules organiques pour libérer de l'énergie, tandis que les *chimiolithotrophes* emploient comme sources d'énergie des aliments inorganiques.

Il n'y a pas que les sources d'énergie qui varient chez les microorganismes, c'est aussi le cas des accepteurs d'électrons utilisés par les chimiotrophes. Dans la respiration, les électrons sont donnés à un accepteur exogène, soit l'oxygène (aérobie), soit un accepteur comme le nitrate (NO_3^-), le sulfate (SO_4^{2-}), le fer ferrique (Fe^{3+}) ou le CO_2 (respiration anaérobie). Dans la fermentation, le substrat énergétique est oxydé et dégradé sans intervention d'accepteur d'électrons exogène, ou tiré de l'environnement. Elle est le processus producteur d'énergie où un donneur d'électron cède des électrons à un accepteur endogène. La fermentation et la respiration fournissent des quantités très différentes d'énergie. La quantité d'énergie rendue disponible reste limitée au cours de la fermentation (2 ATP/mole de glucose) par rapport à la respiration (38 ATP/mole de glucose) pendant laquelle l'accepteur d'électron a un potentiel de réduction beaucoup plus positif que le substrat.

Cependant, parce que les microorganismes sont tellement flexibles et variés dans leur métabolisme énergétique, les définitions précédentes, quelque peu larges, sont à utiliser avec précaution.

V. 4. Le Potentiel redox

Le potentiel d'oxydoréduction ou potentiel redox (en Volts) représente la force des systèmes présents échangeant des électrons. Cette force est mesurée par rapport à celle d'un système de référence qui est constante. On mesure en effet une différence de potentiel (E) entre une électrode inerte qui joue un rôle de donneur ou d'accepteur par rapport aux couples redox de la solution et une électrode de référence qui prend un potentiel connu et assure la connexion électrique avec le système à mesurer (Figure 18). Tous les potentiels sont exprimés par rapport à l'électrode normale à hydrogène et c'est la raison pour laquelle

on attribue un "h" comme indice au E, signifiant différence de potentiel par rapport à l'hydrogène.

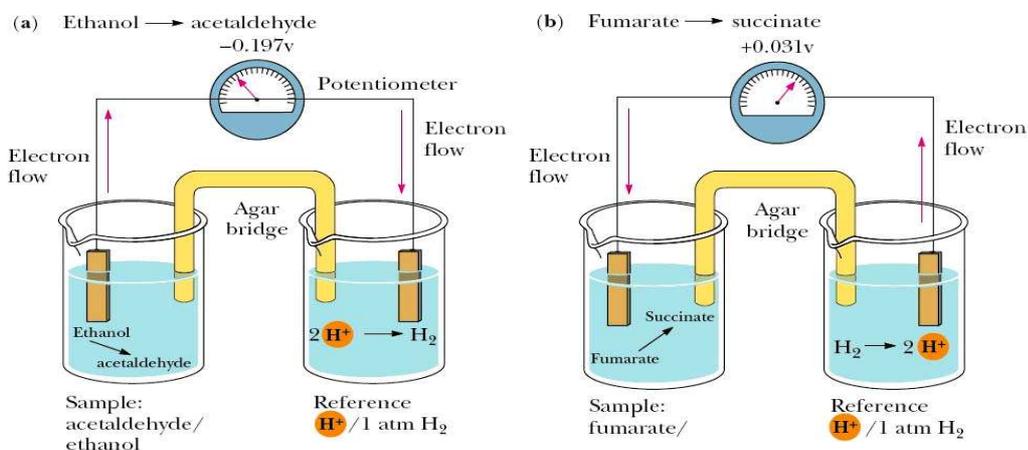


Fig. 18. La mesure d'un potentiel réducteur (a) et oxydant (b) par rapport à l'électrode à hydrogène

La mesure quantitative du E_h est régie par l'équation de Nernst :

$$E_h = E^\circ - \frac{RT}{nF} \ln \left\{ \frac{[\text{Red}]^b}{[\text{Ox}]^a} \right\} \quad \text{ou} \quad E_h = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \left\{ \frac{[\text{Ox}]^a}{[\text{Red}]^b} \right\}$$

V. 4. 1. La mesure expérimentale

La méthode colorimétrique utilise des indicateurs colorés (bleu méthylène, chorophénol indo-phénol etc.) qui changent de couleur, à un pH donné, pour un potentiel sensiblement constant. Elle est peu employée de nos jours. Par contre, la méthode potentiométrique maintenant très courante, est réalisée avec une électrode de platine et une électrode de référence.

Plusieurs électrodes de référence sont connues – l'électrode au calomel, l'électrode argent-chlorure d'argent, l'électrode au sulfate mercureux, l'électrode au thalamide, etc. Puisque le E_h est toujours rapporté à l'électrode à hydrogène, une correction est nécessaire si l'une de ces électrodes de référence a été utilisée. Comme le fait ressortir Sauer et Teather (1987), toutes les données obtenues doivent être automatiquement corrigées par rapport à l'électrode à hydrogène : $E_h = E + \text{correction}$ et dans notre cas : $E_h = (E + 199)$ mV à 39 °C (Tableau 4).

Tableau 4. Potentiels des électrodes de référence (Volts) en fonction de la température et de la concentration de Chlorure de Potassium (D'après Nordstorm, 1977).

Temp °C	Argent : Chlorure d'argent			Calomel			
	3M KCl	3.5M KCl	KCl saturé	3M KCl	3.5M KCl	4M KCl	KCl saturé
10	0,220	0,215	0,214	0,206	0,256	–	0,254
15	0,216	0,212	0,209	–	–	–	0,251
20	0,213	0,208	0,204	0,257	0,252	–	0,248
25	0,209	0,205	0,199	0,255	0,250	0,246	0,244
30	0,205	0,201	0,194	0,253	0,248	0,244	0,241
35	0,202	0,197	0,189	–	–	–	0,238
40	0,198	0,193	0,184	0,249	0,244	0,239	0,234

V. 4. 2. Les limites du potentiel redox

L'utilisation des électrodes pour la mesure du potentiel redox a été l'indicateur classique des processus redox. Cependant dans la pratique, selon plusieurs auteurs (Berner, 1981 ; Stumm and Morgan, 1981 ; Linberg and Runnels, 1984) les mesures redox ont peu de signification théorique et leur interprétations sont difficiles. Par exemple, dans le sol, les électrodes redox ne répondent pas aux important couples redox parce que cet environnement n'est pas à l'équilibre ou plutôt est en équilibre dynamique tout comme le milieu ruminal.

Plusieurs auteurs ont différencié les conditions redox d'un environnement quelconque. Une approche a été de les catégoriser en se basant sur leur accepteur terminal d'électrons. Berner (1981), Stumm et Morgan (1981) et Linberg et Runnels (1984) ont précisé que la valeur du E_h est associée à un accepteur particulier, soit l'oxygène, le nitrate, le sulfate ou le dioxyde de carbone. De plus, ils ont suggéré que la présence ou l'absence de substances redox tels que l'oxygène, hydrogène soufré ou le méthane pouvaient définir les réactions redox prédominantes.

V. 5. Le pH

La notion de pH introduite pour la première fois par Sørensen en 1909 permet de mesurer le niveau d'acidité d'une solution, acidité au sens de Brønsted-Lowry, c'est à dire concernant les réactions d'échange de l'ion H^+ (appelé aussi proton). Le pH est relié à l'activité des ions solvatés par les molécules de solvant dans lequel ils ont été dissous :

$$\text{pH} = - \log [H^+]$$

Cette définition est générale ; elle est valable non seulement pour l'eau où elle a été définie initialement, mais également pour d'autres solvants où l'ion H^+ peut exister. Dans l'eau, il a été montré que l'ion H^+ hydraté est principalement sous forme de l'ion hydronium H_3O^+ . Mais dans un souci de simplification et par convention, on écrit simplement H^+ , le proton hydraté.

Ainsi la mesure du pH, reliée à la quantité d'ions H^+ présents en solution, permet de caractériser le niveau d'acidité de la solution. Selon l'équation ci-dessus, plus une solution est acide, plus faible est la valeur du pH.

V. 5. 1. La mesure expérimentale

Si l'on excepte les déterminations spectrophotométriques du pH à l'aide d'indicateurs colorés, la mesure du pH s'effectue aussi par potentiométrie. Pour obtenir la concentration des ions H^+ d'une solution par mesure du pH, il est donc nécessaire de connaître la valeur du coefficient d'activité du proton. Elle est réalisée par l'intermédiaire d'un montage potentiométrique à deux électrodes – une électrode de référence de potentiel et une électrode indicatrice du pH. Cette dernière peut être à l'hydrogène, à quinhydrone ou de verre.

V. 6. La relation Potentiel redox – pH

Plusieurs études, définissant la relation E_h et pH, ont été effectuées dans le milieu du sol et elles ont montré une relation entre ces deux paramètres physico-chimiques. Certains auteurs ont tenté d'ajuster les valeurs de E_h à un même pH, 6 ou 7 par exemple, afin de pouvoir comparer les résultats. Mais la pente $\Delta E_h / \Delta \text{pH}$ dans les systèmes naturels dépend de réactions complexes qui déterminent le pH. La relation E_h/pH est théoriquement linéaire : elle l'est effectivement quand le pH varie sans qu'il y ait modification de

l'aération, mais elle n'est plus linéaire quand les variations de E_h sont rapides, par exemple, un apport de substances organiques facilement oxydables (Bohn, 1969).

VI. LES RÉACTIONS D'ÉQUILIBRE

On distingue des réactions d'équilibre homogènes qui ne font intervenir que des espèces en solutions et des réactions hétérogènes qui en plus de ces espèces dissoutes, font aussi intervenir des phases solides ou gazeuses (Mercury and Tardy, 1997). Dans cette étude, sur les réactions faisant intervenir l'oxygène ont été mises en avant. Quand une phase gazeuse intervient dans une réaction, les activités ou les concentrations à l'équilibre dépendent de la pression partielle ou de la fugacité de ce gaz, pour une pression totale donnée. Dans ce cas, lorsque la pression partielle d'un gaz change, les conditions d'équilibre varient.

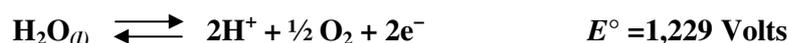
VI. 1. La pression partielle de l'oxygène

La pression partielle de l'oxygène correspond à la part de pression gazeuse due à l'oxygène dans un mélange gazeux. En d'autres termes, c'est la pression qu'exercerait l'oxygène dans un volume du mélange gazeux s'il était seul. Elle est dictée par la loi de Dalton :

$$P(O_2) = P_{totale} \times F(O_2)$$

où F est la fraction d' O_2 dans le mélange.

En milieu aéré, au contact de l'atmosphère, l'oxygène se dissout dans l'eau en petite quantité (Power and Stegall, 1970). Le milieu est alors oxydant. Etant donné que la majorité des réactions analytiques potentiométriques s'effectue en solution aqueuse, la relation entre la tension électrique du couple $O_2 - H_2O$ peut être considérée. Par contre, en milieu anaérobie où l'oxygène est totalement absent, une pression partielle en oxygène peut être calculé en prenant la réaction de la décomposition de l'eau :



En reprenant l'équation de Nernst on obtient :

$$E_h = E^\circ + \frac{(2,303 \times 8,314 \times 298,15)}{(2 \times 96\,487)} \times \log \left\{ \frac{[Ox]}{[Red]} \right\}$$

$$E_h = E^\circ + \frac{0,0592}{2} \times \log \left\{ \frac{[\text{O}_2]^{1/2} \times [\text{H}^+]^2}{[\text{H}_2\text{O}]} \right\}$$

En considérant que l'activité de l'eau est unitaire,

$$E_h = 1,229 + 0,0148 \log P(\text{O}_2) - 0,059 \text{ pH}$$

$$\log P(\text{O}_2) = 67,57 E_h + 4 \text{ pH} - 83,10$$

VI. 2. L'influence de la température

Généralement on connaît ou on peut estimer les constantes thermodynamiques pour des températures comprises entre 0 °C et 300 °C (Helgeson *et al.*, 1998). Puisque le système étudié est le rumen de la vache laitière, et que la température se situe autour de 39 – 41 °C, nous nous sommes fixés à 39° C, soit 312.15 K (T). On se trouve donc dans l'intervalle de température où les données calculées sont utilisables.

Pour toutes les réactions d'équilibre, la relation $\Delta G = -T \Delta S$, est valable quelle que soit la température. L'enthalpie libre de Gibbs (ΔG), l'enthalpie (ΔH) et l'entropie (ΔS) varient en fonction de la température et on peut calculer ces variations en faisant intervenir la capacité calorifique (ΔC_p). La relation suivante est issue de Tardy *et al.*, (1999):

$$\Delta G_{312,15} = \Delta G_{298,15} - \Delta S_{298,15} (T - T^\circ) - \Delta C_p_{298,15} [T \ln (T/T^\circ) - (T - T^\circ)]$$

A 312,15 K, la différence de potentiel pour la décomposition de l'eau est :

$$E^\circ = - \frac{\Delta G^\circ}{nF} = \frac{234,904 \times 1000}{2 \times 96\,487} = 1,217 \text{ V}$$

En substituant dans l'équation de Nernst:

$$E_h = 1,217 + \frac{(2,303 \times 8.314 \times 312.15)}{(2 \times 96\,487)} \times \log \left\{ \frac{[\text{O}_2]^{1/2} \times [\text{H}^+]^2}{[\text{H}_2\text{O}]} \right\}$$

$$E_h = 1,217 + 0,0310 \times \log \left\{ \frac{[\text{O}_2]^{1/2} \times [\text{H}^+]^2}{[\text{H}_2\text{O}]} \right\}$$

En considérant que l'activité de l'eau est unitaire,

$$E_h = 1,217 + 0,0155 \log P(\text{O}_2) - 0.062 \text{ pH}$$

$$\log P(\text{O}_2) = 64,59 E_h + 4 \text{ pH} - 78.60$$

VII. LE TRANSFERT D'ÉNERGIE DANS LE RUMEN

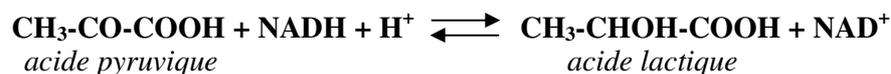
Toutes les cellules vivantes ont besoin des oxydations pour se procurer leur énergie sous la forme d'ATP. Le processus d'oxydation consiste à transférer des électrons d'un donneur à un accepteur : plus grande est la différence de potentiel entre les couples concernées, plus grande est l'énergie produite. Cependant, lorsqu'un organisme ne dispose en tout et pour tout d'un seul substrat carboné, il est donc placé théoriquement dans une situation absurde s'il ne dispose pas d'un accepteur pour faire marcher ses oxydations. Une des situations les plus fréquentes est en milieu anaérobie où la cellule est privée d'un excellent accepteur d'électron : l'oxygène. En l'absence de ce dernier, ou lorsque la cellule ne sait pas l'utiliser, la parade consiste à se porter sur un accepteur provisoire comme le NAD^+ même s'il est disponible en quantité limitée ou à fabriquer un accepteur définitif fatalement dérivé du substrat de départ puisqu'il n'y a rien "d'autre sur le marché" (Pelmont, 1993).

Le rumen est le siège de nombreuses réactions chimiques faisant intervenir divers couples d'oxydoréduction. La fermentation ruminale est un processus exergonique au cours de laquelle les constituants du régime alimentaire sont convertis en produits rapidement utilisables par l'animal. Ces transformations génèrent de l'énergie libre utilisée pour la croissance des microorganismes et notamment les bactéries anaérobies majoritairement présentes dans le rumen. L'absence d'oxygène et la production d'agents réducteurs caractérisent le rumen comme un environnement hautement réducteur avec des valeurs de E_h situées entre -150 et -250 mV (Broberg, 1957a ; Marounek *et al.*, 1982). Puisque l'oxygène n'est pas disponible en tant qu'accepteur final d'électron, d'autres moyens d'oxydation doivent être employés et ces réactions d'oxydation doivent être couplées aux réactions de réduction (Russell and Strobel, 1993). Les oxydations anaérobies sont incomplètes, mais les bactéries ruminales possèdent des mécanismes de conservation d'énergie très efficaces. Ces bactéries sont souvent capables de se reproduire autant de fois en présence de glucose que *Escherichia coli* en aérobie, bien que l'énergie disponible soit au moins 7 fois inférieure en anaérobie (Russell and Wallace, 1989).

Les hydrates de carbone sont la source d'énergie première pour la croissance des microorganismes du rumen et la majorité des bactéries présentes fermentent ces sucres (Hungate, 1966). Plusieurs modes de fermentation existent, notamment la fermentation lactique, propionique et la méthanogénèse entre autres.

VII. 1. La fermentation lactique

Pendant la glycolyse, appelée aussi voie de Emben-Meyerhof-Parnas, une molécule de glucose est transformée en acide pyruvique (gain net : 2 ATP). Deux molécules en sont formées par mole de glucose et sont réduites en acide lactique par l'enzyme lactate déshydrogénase selon la réaction :



En somme une bactérie ruminale métabolisant le glucose sur ce principe crée son propre accepteur d'électrons à partir du glucose. Le produit est l'acide lactique qui est rejeté dans le milieu. De plus, la réaction est fortement faisable d'un point de vue thermodynamique, avec une différence de potentiel standard de + 0,447 V. Le glucose est utilisé comme source d'énergie mais le rendement de l'opération est médiocre, car le glucose est transformé en grande quantité pour produire seulement 2 ATP par molécule. Son oxydation complète en CO₂ + H₂O par la glycolyse et le cycle de Krebs en produirait 19 fois plus.

VII. 2. Les fermentations propioniques

Le propionate est le produit de fermentation de nombreuses bactéries anaérobies. En effet la fermentation propionique à partir du glucose ou de lactate correspond aux bilans :



Le lactate est l'un des substrats préférés des bactéries propioniques. Il y a grosso modo deux voies principales pour passer du lactate au propionate. La première est la voie du succinate : elle met en jeu la réduction du fumarate en succinate qui s'accompagne de la synthèse d'ATP. Cette réaction est possible thermodynamiquement parce que le potentiel standard du couple fumarate/succinate est de +0,03 V, assez éloigné du couple NAD⁺/NADH (-0,32 V), donnant une énergie suffisante pour la synthèse d'un ATP. Le propionate est aussi formé à partir du lactate par la voie de l'acrylate (Baldwin *et al.*, 1962) via le lactyl CoA, l'acrylyl CoA et le propionyl CoA. On la trouve chez quelques espèces comme *Clostridium propionicum* (Johns, 1952), *Megasphaera elsdenii* (Lewis and Elsdén, 1955) et *Bacteriodes ruminicola* (Wallnöfer and Baldwin, 1967). Le potentiel standard du

couple propionyl CoA – acrylyl CoA étant de $-0,015$ V, il autorise thermodynamiquement la réduction de acrylate en propionate libérant ainsi de l'énergie sous forme d'ATP. Cette fermentation produit un seul ATP pour 3 molécules de lactate.

VII. 3. La méthanogénèse

Les bactéries productrices de méthane (méthanogènes) sont strictement anaérobies et appartiennent au groupe d'archaebactéries. Des traces d'oxygène suffisent à les tuer, en partie par l'auto-oxydation de certains cofacteurs nécessaires à leur métabolisme (Thauer *et al.*, 1977). Elles se développent dans des milieux réducteurs ($E_h = -180$ mV). La phase liquide du rumen étant caractérisée par un potentiel redox situé entre -150 et -250 mV, elle se trouve être l'endroit de prédilection pour la production de méthane. Ce dernier est produit essentiellement par une réduction du CO_2 selon la réaction:



La réaction est exergonique et les bactéries l'utilisent pour leur production. D'autre part, l'hydrogène est un substrat. Il est engendré par des fermentations dans le milieu ruminal. Les méthanogènes vivent en association avec d'autres anaérobies qui leur fournissent en continu l' H_2 et le CO_2 indispensables pour leur croissance. Une formation de méthane s'accompagne d'une consommation d'hydrogène. En d'autres termes, la méthanogénèse épure l' H_2 et favorise les fermentations des autres couples présents dans le milieu.

Pour résumer, le rumen est un milieu organique concentré complètement débarrassé de l' O_2 et offrant des conditions fortement réductrices. Les nombreuses espèces de microorganismes qui y prolifèrent, donnent lieu à des transferts de matières complexes et d'énergie entre les différents partenaires biologiques : bactéries, protozoaires, champignons et l'animal hôte.

Largement utilisée dans plusieurs systèmes biologiques, notamment dans le sol (Rowell, 1981), dans la bioénergétique (Guérin, 2004) et dans le milieu ruminal (Kohn and Boston, 2000, Offner and Sauvant, 2006), cette approche d'échange d'énergie et cette notion de thermodynamique permettront de mieux comprendre le fonctionnement du rumen dans son ensemble ainsi que les modifications qu'apporteraient des additifs alimentaires.

2^{ème} PARTIE

MÉTHODOLOGIE

Chapitre 1

Matériel et Méthodes

Dans ce chapitre, seront abordées les méthodes expérimentales et analytiques communes à l'ensemble des expérimentations conduites sur vaches laitières fistulées. Les particularités du protocole expérimental propre à chaque essai ainsi que le plan expérimental et les analyses statistiques effectuées sont décrits dans les chapitres correspondants.

I. LES ANIMAUX UTILISÉS

Les animaux utilisés sont des vaches laitières de race Prim'Holstein, soit en période de tarissement non gestantes, soit en lactation, d'un poids vif moyen de 600 ± 50 kg. Ils sont munis d'une canule (\emptyset interne = 115 mm ; \emptyset externe = 125 mm) implantée au niveau du sac dorsal du rumen. La technique de canulation et la chirurgie employées, respectent les conditions sanitaires et le bien-être animal et sont similaires à celles utilisées par Streeter *et al.* (1990). Les vaches sont maintenues dans des box individuels sur un tapis en caoutchouc. Les vaches en production sont traitées deux fois par jour (8h et 16h) et les productions individuelles sont enregistrées quotidiennement.

I. 1. Le modèle "vache tarie"

Dans les essais où le modèle "vache tarie" a été utilisé, l'objectif était de dégager des tendances préliminaires ; les effets des additifs alimentaires sur des animaux à l'entretien ne peuvent en aucun cas être extrapolés sur des vaches en production.

I. 2. Le modèle "vache en lactation"

Le modèle "vache en lactation" vient compléter le modèle précédent. Il a pour but d'observer *in vivo* l'effet d'un ajout de probiotique dans le régime alimentaire des vaches lactantes sur les fermentations ruminales. Les animaux utilisés sont des vaches en début (40 jours *post-partum* en moyenne) ou en milieu de lactation (150 jours après vêlage en moyenne). La production quotidienne individuelle moyenne des vaches utilisées au cours des différents essais était de 33 ± 2 kg, de 30 ± 2 kg et de 45 ± 5 kg de lait.

II. ALIMENTATION

II. 1. Rations

II. 1. 1. La ration “vache tarie”

Deux types de rations ont été établies: une ration riche en fibres et une ration riche en amidon dont les compositions centésimales et les valeurs alimentaires sont présentées dans le Tableau 5. Ces rations ont été formulées pour d’une part satisfaire les besoins d’entretien de l’animal et d’autre part induire un état d’acidose ruminale. Une valeur de BACA basse caractérise la ration “amidon” alors que celle de la ration “fibre” est nettement supérieure (Peyraud and Apper-Bossard, 2006). Les rations sont distribuées en deux repas égaux (9h et 17h). La quantité de MS ingérée quotidiennement par animal est restreinte à 8 kg pour permettre à l’animal d’ingérer la totalité de la ration dans un temps relativement court pour la mesure des paramètres physico-chimiques et le prélèvement du contenu ruminal à intervalle régulier.

Tableau 5. Composition centésimale et valeur alimentaire des rations pour vache tarie

	Ration “fibre”	Ration “amidon”
Ingrédients (% MS)		
EMPE ¹	43,2	50,9
Foin de prairie	35,5	–
Farine de Blé	–	15,7
Farine de Maïs	9,5	23,9
Tourteau de Soja	9,8	8,1
AMV ²	2,0	1,4
Valeur Alimentaire		
UFL (g/kg MS)	0,88	1,06
PDIN (g/kg MS)	93	93
PDIE (g/kg MS)	93	102
BACA ³ (mEq/kg MS)	301,4	149,2

¹ Ensilage de maïs plante entière.

² Aliment minéral vitaminé contenant : P (50 g/kg), Ca (140 g/kg), Na (60 g/kg), Zn (4 g/kg), Mn (3,2 g/kg), Fe (3 g/kg), Cu (0,8 g/kg), vitamine A (250,800 UI/kg), vitamine D₃ (62,700 UI/kg), vitamine E (112 UI/kg).

³ Bilan Alimentaire Cations Anions.

II. 1. 2. La ration "vache en lactation"

Deux rations ont été formulées : la ration VL 1 et la ration VL 2 (Tableau 6). La ration VL 1 est utilisée au cours des essais traitant de l'effet dose (Chap. 1) et souche (Chap. 2) de la levure probiotique Sc 47 alors que la ration VL 2 est offerte aux vaches dans les essais de comparaison entre l'apport de la levure et d'une substance tampon dans la ration (Chap. 3). Les quantités distribuées de ration mélangée, distribuée deux fois par jour (9h et 17h), ne sont pas offertes *ad libitum*, mais ajustées à la capacité d'ingestion moyenne des vaches. Les animaux reçoivent quotidiennement 21 kg MS et 28 kg MS de la ration VL 1 et VL 2 respectivement pour subvenir à leurs besoins d'entretien et de production. Elles représentent ainsi les régimes témoins et sont formulées pour induire l'acidose latente qui apparaît généralement chez des vaches à haut potentiel. La ration VL 2 est complétée en maïs concassé puisque l'EMPE utilisé présente une teneur relativement basse en grain (MS = 28,1%).

Tableau 6. Composition centésimale et valeur alimentaire des rations pour vache en lactation

	Ration VL 1	Ration VL 2
Ingrédients (% MS)		
EMPE ¹	60,9	51,5
Luzerne déshydratée (Rumiluz [®])	8,4	5,7
Concentrés ²	29,5	35,9
Maïs concassé	–	6,0
AMV ³	1,2	0,9
Valeur Alimentaire		
UFL (g/kg MS)	0,98	0,97
PDIN (g/kg MS)	107,8	131,6
PDIE (g/kg MS)	101,4	114,5
BACA ⁴ (mEq/kg MS)	203,2	204,1

¹ Ensilage de maïs plante entière

² Composés d'un concentré azoté CB 102 (Aliso, France) : Prot. Bt (46-47 %), MG Bt (2-3 %), Cellulose Bt (8-9 %), Cendres Bt (8-10 %), Cu sulfate (15 mg/kg), vitamine A (6,000 UI/kg), vitamine D₃ (2,000 UI/kg), vitamine E (15 mg/kg) ; et d'un concentré de production B 107 (Aliso, France) : Prot.Bt (20 %), MG Bt (2-3 %), Cellulose Bt (6-9 %), Cendres Bt (7-8 %), Cu sulfate (15 mg/kg), vitamine A (6,000 UI/kg), vitamine D₃ (2,000 UI/kg), vitamine E (15 mg/kg)

³ Aliment minéral vitaminé contenant : P (50 g/kg), Ca (140 g/kg), Na (60 g/kg), Zn (4 g/kg), Mn (3,2 g/kg), Fe (3 g/kg), Cu (0,8 g/kg), vitamine A (250,800 UI/kg), vitamine D₃ (62,700 UI/kg), vitamine E (112 UI/kg).

⁴ Bilan Alimentaire Cations Anions.

II. 2. Supplémentation en levure

Les levures (BIOSAF[®] Sc 47 – **B** ; LEVUCCELL CNCM I-1077 – **LC** ; YEA SACC CBS 493.94 – **YS** ; BIOSPRINT MUCL 39885 – **BT** et les 3 souches **L13**, **L30** et **L11** produites par la Société Lesaffre, France) et leurs doses, variables selon les essais, sont toutes distribuées en top dressing, en dose unique pendant le repas du matin.

III. MESURES ET PRELEVEMENTS EN CONTINU

III. 1. Dispositif

Le dispositif utilisé pour la mesure en continu du pH et du E_h et le prélèvement d'échantillons (Figure 19) comporte deux parties. La partie située à l'intérieur du rumen consiste en:

- un filtre composé d'un anneau de plomb (1,1 kg) enrobé de résine et recouvert sur ses deux faces par du tissu Nylon poreux (46 μ m de vide de maille),
- un tuyau en plastique (L = 750 mm ; \varnothing interne = 1,5 mm ; \varnothing externe = 2 mm) dont une extrémité abouche à l'intérieur du filtre ; l'autre extrémité traversant la canule ruminale est connectée à une pompe péristaltique. Ce tuyau est protégé par un tuyau en caoutchouc (L = 650 mm ; \varnothing interne = 6 mm ; \varnothing externe = 18 mm) permettant d'éviter les risques de torsion du tuyau en plastique pendant les contractions de la paroi ruminale.

La partie externe consiste en :

- une pompe péristaltique (GILSON, Minipuls 2, France) réglée sur une vitesse^ψ de 8 rotations/min (soit 300 mini pulsations), autorisant un débit de 240 ml/h.
- une cellule de mesure, d'une capacité de 240 ml dont l'entrée, reliée à la pompe péristaltique, permet son remplissage avec la phase liquide du rumen et dont la sortie permet de collecter des échantillons. La cellule est fermée hermétiquement par un couvercle traversé par trois électrodes, immergées à une profondeur de 4 cm, reliées à un pH mètre (713 CH-9101 Herisau, Methrom, Suisse) :
 - une électrode à pH – électrode combinée avec Ag-AgCl comme référence
 - une électrode à E_h – électrode platine (Pt SC)
 - une thermo-électrode de platine (Pt 100 RNEA 911-Pt100).

^ψ Un essai préliminaire a permis de montrer que cette vitesse n'entraînait pas de colmatage du filtre à l'intérieur du rumen.

Le pH mètre est calibré avec des tampons 4 et 7 (Methrom, Suisse), avant le début de chaque série de mesures.

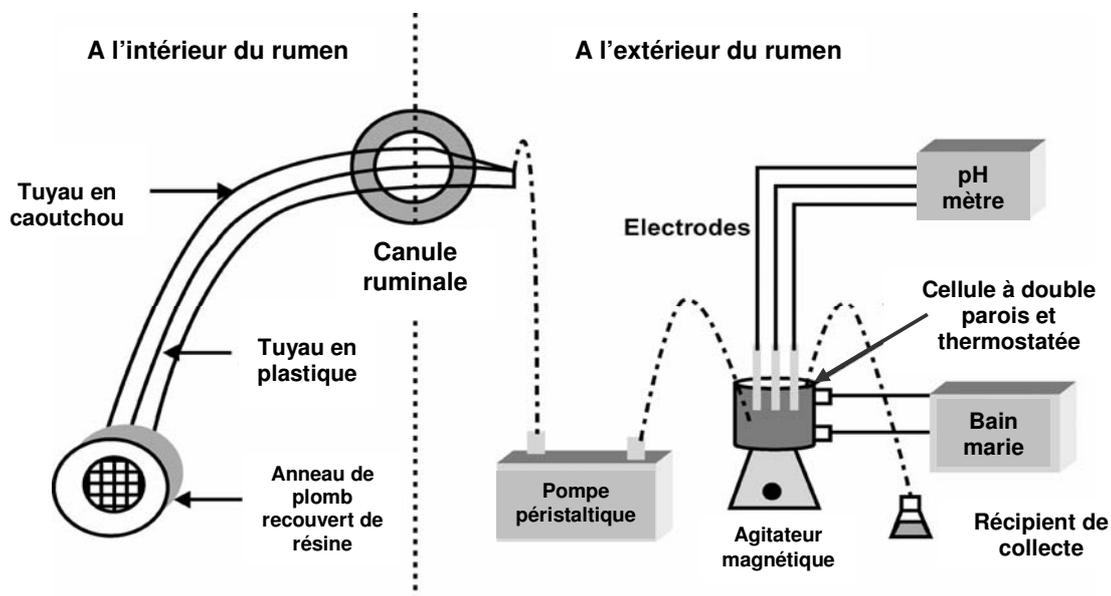


Fig. 19. Une nouvelle méthode pour la mesure des paramètres physico-chimiques ruminiaux

La cellule de mesure est thermostatée grâce à un bain-marie (Exatherm U3 Electronic, Julabo, Allemagne) maintenu à 39 °C et enveloppée extérieurement d'une feuille d'aluminium pour la maintenir à l'obscurité. Le contenu de la cellule est sous agitation constante grâce à un agitateur magnétique (728 Stirrer, Metrohm, Suisse).

III. 2. Prélèvement initial et renouvellement de la cellule

En début de manipulation, le remplissage de la cellule s'effectue manuellement avec du jus de rumen précédemment prélevé à l'aide d'une trompe à vide reliée à un tuyau en plastique placé dans le rumen via la canule. Le jus est ensuite filtré au travers d'un tamis avant d'être versé dans les cellules de mesure. Cette action vise à séparer le jus des particules alimentaires afin de ne pas boucher la sortie de la cellule. Ce prélèvement initial permet de limiter une longue exposition trop longue du jus de rumen à l'air contenu dans la cellule au démarrage de la période de mesure.

A la suite du prélèvement initial et de chaque cinétique, le jus de la cellule est renouvelé durant 1h grâce à la pompe péristaltique. Cette durée a été établie en fonction du débit de la pompe (6 ml/min) et du volume de la cellule (240 ml).

III. 3. Cinétiques

Les mesures de pH et de E_h , servant à l'établissement des cinétiques d'évolution de ces deux paramètres physico-chimiques ruminiaux sont enregistrées 1 heure avant le repas (T_{-1}), au moment du repas (T_0) puis toutes les heures après le repas sur une durée de 8 heures ($T_1 - T_8$). Parallèlement, des échantillons de phase liquide ruminale sont prélevés 1 heure avant le repas, au moment du repas puis toutes les deux heures après le repas sur une durée de 8 heures, pour déterminer les teneurs en acides gras volatils (AGV), acide lactique et azote ammoniacal (N-NH₃).

IV. LES TECHNIQUES ANALYTIQUES

Seules les techniques communes utilisées dans l'ensemble des expérimentations sont décrites dans cette section.

IV. 1. Collecte et traitement des échantillons

Le jus de rumen filtré est directement prélevé à la sortie de la pompe péristaltique pour éviter toute dilution dans la cellule de mesure. Pour stopper l'activité microbienne, 1 ml de HgCl₂ (2% p/v) est ajouté dans un échantillon (10 ml) de phase liquide ruminale pour les analyses des AGV et de lactate ; 3 gouttes de H₂SO₄ (96% v/v) sont rajoutées à un autre échantillon (10 ml) pour l'analyse du N-NH₃. Tous les échantillons prélevés sont immédiatement conservés à - 20 °C jusqu'au moment des analyses.

IV. 2. Les acides gras volatils

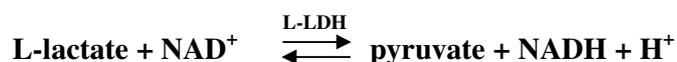
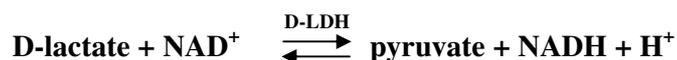
La méthode de traitement des échantillons en vue de l'analyse des AGV est une adaptation de la méthode de Playne (1985). Les échantillons sont décongelés puis centrifugés à 4000 g pendant 20 min pour éliminer les particules grossières. Une déprotéinisation est ensuite effectuée en mélangeant 1 ml du surnageant à 200 µl d'acide métaphosphorique (25% p/v). Après centrifugation à 20 000 g pendant 15 min, 1 ml du surnageant est prélevé et additionné de 200 µl d'un étalon interne (acide 4-méthylvalérique, 1% v/v). Les concentrations en AGV sont obtenues par séparation à l'aide d'un chromatographe (Hewlett Packard 5890 Series II) en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Une colonne capillaire (ECTM-1000, Alltech, polyéthylène glycol acidifié, L = 15 m ; Ø = 0,53 mm ; épaisseur du film = 1,20 µm) est utilisée.

Les conditions de l'appareil sont les suivantes : la température initiale du four est de 100 °C ; la rampe de température est de 6 °C par min pendant 8 min jusqu'à 148 °C puis de 20 °C par min pendant 2 min jusqu'à 188 °C, température à laquelle elle est maintenue pendant 5 min. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont réglées à 250 °C. Les pressions d'air, d'azote et d'hydrogène sont 2,6, 4,0 et 1,2 bar respectivement avec l'azote comme gaz vecteur (5 psi. en tête de colonne). Les concentrations en acétate (C₂), en propionate (C₃) et en butyrate (C₄) sont exprimées en mM.

IV. 3. Le lactate

Les teneurs en acide D- et L- lactate ont été déterminées par voie enzymatique selon la méthode^Ω normalisée Boehringer Mannheim (France).

Le principe est le suivant : en présence des enzymes D- et L- lactate déshydrogénases (D- et L- LDH), le D- et L- lactate est oxydé par le nicotinamide-adénine di-nucléotide (NAD) en pyruvate selon les réactions :



Le pyruvate est éliminé du milieu réactionnel par la glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) en présence de L-glutamate pour produire du L-alanine. La quantité de NADH formée est stochiométriquement proportionnelle à la quantité de D-lactate ou L-lactate respectivement. Elle est mesurée par l'augmentation d'absorbance à 340 nm avec un spectrophotomètre (U-2000, HITACHI) muni d'une lampe UV. Les concentrations en DL- lactate et en lactate total sont exprimées en mM.

V. 4. L'azote ammoniacal

Après décongélation, les échantillons sont centrifugés une première fois à 4000 g pendant 20 min puis à 20 000 g pendant 15 min. Le surnageant est ensuite utilisé pour la détermination de N-NH₃ selon la méthode adaptée^Ψ de Hach *et al.* (1985 ; 1987).

^Ω Kit BOEHRINGER : Test-Combiné Acide D-Lactate/L-Lactate, Cat. No. 1 112 821.

^Ψ Voir Annexe 2

Chapitre 2

Validation d'une méthode de prélèvements et de mesures "*ex vivo*"

De notre synthèse bibliographique, il ressort que le pH et le potentiel redox (E_h) sont deux paramètres physico-chimiques déterminants dans l'approche que nous voulons utiliser pour mieux comprendre le mode d'action des levures probiotiques chez le ruminant. Le pH est un paramètre habituellement mesuré dans les études nutritionnelles, car il a toujours été considéré comme central pour comprendre les processus de digestion dans le rumen. Témoin du degré d'anaérobiose du milieu ruminal et donc, à ce titre, paramètre pouvant avoir une influence sur le type et l'intensité des réactions qui s'y déroulent, le E_h a été, quant à lui, plus rarement mesuré.

Les premiers travaux de Broberg, (1957a) et de Barry *et al.* (1977) chez le mouton et de Marounek *et al.* (1982) chez la chèvre font état de valeurs se situant entre -150 et -260 mV et entre -145 et -190 mV respectivement. Les valeurs plus récentes relevées dans la littérature varient entre -302 et -340 mV chez le mouton (Mathieu *et al.*, 1996), -335 et -370 mV chez le bélier (Broudiscou *et al.*, 2001) et -327 et -352 mV (Andrade *et al.*, 2002) ou -380 mV (Giger-Reverdin *et al.*, 2006) chez la chèvre. Toutefois, toutes ces dernières valeurs ne peuvent être considérées comme des valeurs de E_h : elles n'expriment en fait que des différences de potentiel puisque mesurées entre une électrode de platine et une électrode de référence (calomel, Ag-AgCl). Or, par définition, le E_h est la différence de potentiel entre une électrode de platine et une électrode standard à hydrogène. Parce qu'en pratique, cette électrode standard n'est jamais utilisée, les valeurs enregistrées doivent être automatiquement corrigées par la différence de potentiel de l'électrode de référence par rapport à l'électrode standard à hydrogène *i.e.* $+199$ mV à 39 °C (Kjaergaard, 1977 ; Sauer and Teather, 1987). Si l'on applique cette correction, alors les valeurs se rapprochent des valeurs de E_h correctement exprimées par les auteurs les plus anciens.

Si la forme d'expression du E_h rend compte des différences observées dans les valeurs publiées, des conditions d'échantillonnage et de mesure qui ne respectent pas les conditions strictes du rumen, peuvent aussi être à l'origine de la variabilité des valeurs obtenues. En effet, la composition chimique de la phase liquide du rumen est en équilibre avec sa phase gazeuse composée approximativement de 52 à 63 % de CO_2 , 27 % de CH_4 , 7 à 18 % de N_2 , et de traces de H_2 et H_2S (Barry *et al.*, 1977 ; Silley, 2000). Lorsque les mesures ne sont pas faites "in vivo" mais sur du liquide prélevé sur animal, conditionné sous CO_2 , ou tout autre atmosphère gazeuse différente du mélange gazeux du rumen, un nouvel équilibre s'établit, ce qui peut conduire à une modification des caractéristiques physico-chimiques originelles du rumen (Nordstorm and Wilde, 1998). Par ailleurs, pour

une même méthodologie utilisée, la variabilité des valeurs de E_h peut aussi être attribuée à la nature de la ration distribuée. Giger-Reverdin *et al.* (2006) ont en effet enregistré des valeurs de E_h de -155 et de -140 mV pour des rations composées respectivement de 30 et 60% de concentrés.

L'objectif principal de cet essai préliminaire est de vérifier que la méthode de prélèvements et de mesures peut influencer directement les paramètres physico-chimiques du rumen. Pour cela, une comparaison a été faite entre une méthode *ex vivo* (1) dite des "prélèvements en continu" et une méthode classique (2) dite des "prélèvements ponctuels". La méthode "*ex vivo*" mise au point dans ce travail devait permettre de mesurer le pH et le E_h dans des conditions d'anaérobiose et de prélever de façon concomitante des échantillons de phase liquide ruminale en évitant toute contamination. Elle a ensuite été validée sur des animaux recevant deux types de ration : une ration riche en fibres et une ration riche en amidon dont les compositions sont données dans le Tableau 5.

I. MATERIEL ET METHODES

I. 1. Méthodes de prélèvements du contenu ruminal et de mesures

Le principe des prélèvements relatif à la méthode 1 dite "des prélèvements en continu" a été préalablement détaillé dans le chapitre Matériel et Méthodes. Pour ce qui concerne la 2^{ème} méthode, le contenu ruminal (environ 1 litre) est prélevé manuellement à l'aide d'une pompe à vide, puis filtré sur tamis de 1mm. Les prélèvements, qu'ils soient manuels ou continus, sont effectués 1 heure avant le repas (T_{-1}), pendant le repas (T_0) puis toutes les heures après le repas sur une plage horaire post prandiale de 8 heures. Dans le cas de la méthode 2, les mesures sont faites après un délai de 25 min comme le recommandent Andrade *et al.* (2002).

I. 2. Schéma expérimental

Deux vaches laitières tarées sont utilisées selon un carré latin 2×2 . Pour chacune des méthodes, deux cinétiques de pH et de E_h sont établies par vache et par période.

I. 3. Calculs

L'électrode de référence n'étant pas l'électrode à hydrogène, toutes les données de différences de potentiel (E_0) sont corrigées selon la formule : $E_h = E_0 + C$

avec E_0 = la différence de potentiel entre l'électrode de platine et l'électrode de référence Ag-AgCl ; C = potentiel de l'électrode de référence par rapport à l'électrode standard à hydrogène *i.e.* +199 mV à 39°C (Nordstrom, 1977).

I. 4. Analyses statistiques

Les données sont analysées en mesures répétées avec SYSTAT (version 5.03, Systat Inc., Evanston, IL) permettant de prendre en compte la non indépendance des mesures entre les temps d'échantillonnage. Le modèle statistique est le suivant :

$$Y_{ijk} = \mu + M_i + C_j + P_k + e_{ijk}$$

avec Y = variable dépendante, μ = moyenne de la population, M_i = effet de la méthode i , C_j = effet de la vache j , P_k = effet de la période k et e_{ijk} = erreur résiduelle. Seules les différences déclarées significatives à $P < 0,05$ sont rapportées.

II. EFFETS DES MÉTHODES DE PRELEVEMENT ET DE MESURE

II. 1. Sur le pH ruminal

Les cinétiques de pH établies sur une période de 10 heures (Figure 20) montrent des profils d'évolution semblables entre les deux méthodes : le pH du rumen chute rapidement pendant les premières heures qui suivent la prise de nourriture, atteignant une valeur minimale 3 heures après le repas pour ensuite remonter progressivement.

Matthieu *et al.* (1996) et Duffield *et al.* (2004) montrent les mêmes tendances respectivement chez le mouton et la vache en lactation. Dans notre étude, le pH ruminal varie de 6,70 à 6,37 avec la méthode 1 et de 6,93 à 6,49 avec la méthode 2 : les valeurs enregistrées avec cette dernière méthode étant significativement plus élevées que celles obtenues avec la méthode 1. Ces résultats s'accordent avec ceux de Boudon *et al.* (2006) qui ont aussi enregistré des valeurs de pH plus importantes (en moyenne de 0,36 unité-pH en plus) avec une méthode classique d'échantillonnage de jus de rumen comparativement à une méthode basée sur l'utilisation d'une électrode placée à demeure dans le rumen. Il semblerait donc que l'atmosphère environnant la phase liquide ruminale ait un rôle déterminant sur la valeur de pH obtenue.

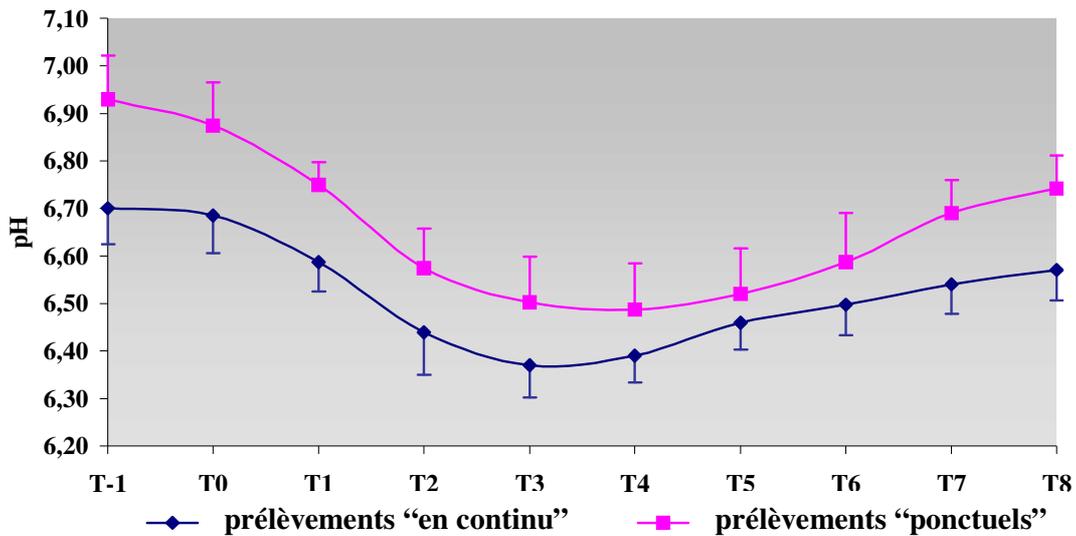


Fig. 20. Evolution du pH ruminal chez la vache tarie (effet méthode)

Comme l'ont souligné Turner et Hodgetts (1954), laisser un échantillon ruminal au contact de l'air, conduit à des pertes spontanées de gaz du milieu, particulièrement de CO₂. Le rôle de celui-ci est déterminant puisque lors de sa dissolution dans le milieu, l'acide carbonique (H₂CO₃) ainsi produit se décompose automatiquement en ions H⁺ et bicarbonate (HCO₃⁻) qui sont responsables de l'effet tampon et du maintien d'un pH adéquat. L'équation ci-dessous décrit l'équilibre entre le CO₂ dissout et la quantité de protons (ions H⁺) via la production d'acide carbonique.



Les variations de la quantité de CO₂ dissout dans un milieu aqueux entraîne automatiquement un changement dans la quantité d'ions H⁺. Par exemple, l'ajout de CO₂ dans le milieu déplace l'équilibre de la réaction vers la droite conduisant à une production d'acide carbonique, puis à une libération d'ions H⁺. A l'inverse, lorsque du CO₂ est libéré, la production de H⁺ diminue et le pH augmente (Kohn and Dunlap, 1998). Par le biais de l'équation de Hendersen-Hasselbach, on peut ainsi démontrer le lien étroit qui existe entre la pression partielle de CO₂ et le pH:

$$\text{pH}_{\text{rumen}} = 7,74 + \log \left(\frac{[\text{HCO}_3^-]}{P\text{CO}_2} \right)$$

L'exactitude de la mesure du pH ruminal réside donc avant tout dans le respect du maintien de l'équilibre entre les phases liquide et gazeuse du milieu ruminal en évitant toute contamination avec une atmosphère différente ; ce qu'autorise la méthode 1 dite des

"prélèvements en continu" comparativement à la méthode 2. La différence de valeurs de pH entre les deux méthodes, et notamment les valeurs plus élevées obtenues avec la méthode 2, peuvent être attribuées à l'exposition des échantillons à une atmosphère différente de celle du rumen. Toutefois, aucune corrélation ($r = 0,08$; $n = 80$) n'ayant été mise en évidence entre les deux méthodes, une correction des valeurs n'a pu être envisagée.

II. 2. Sur le potentiel redox

Quant aux valeurs de E_h mesurées, une différence hautement significative ($P < 0.01$) est notée entre les méthodes. Les valeurs de E_h du contenu ruminal obtenues avec la méthode 1 sont inférieures à celles enregistrées avec la méthode 2 et ont tendance à aller vers des valeurs plus réductrices sur l'ensemble de la période de mesures (Figure 21). Avec la méthode 1, le E_h se situe entre $-173,5$ et $-216,8$ mV. Il augmente environ 3h après le repas pour ensuite diminuer jusqu'à la fin de la période.

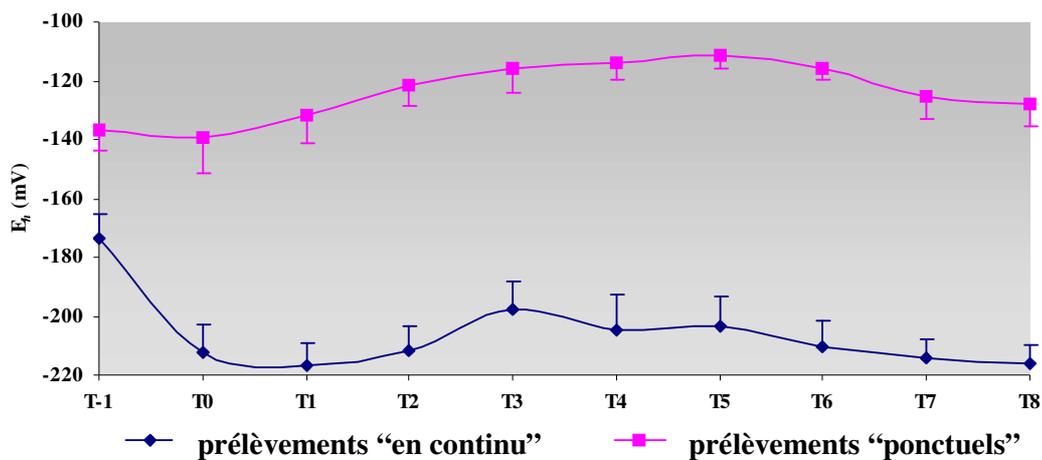


Fig. 21. Evolution du E_h ruminal chez la vache tarie (effet méthode)

Des courbes similaires ont été retrouvées dans la littérature (Marounek *et al.*, 1982 ; Mathieu *et al.*, 1996 ; Andrade *et al.*, 2002). L'augmentation du E_h après le repas serait principalement due à l'entrée d' O_2 à travers le bol alimentaire, la mastication et l'eau de boisson. Sa chute graduelle peut être expliquée par une rapide captation de cet O_2 par les micro-organismes ruminiaux (Broberg, 1957b) pour maintenir les conditions d'anaérobiose du rumen. Ces hypothèses ont été confirmées par Barry *et al.* (1977) qui ont trouvé dans la phase gazeuse ruminale, des concentrations plus élevées en N_2 et O_2 pendant le repas qu'entre deux repas consécutifs.

Avec la méthode 2, le E_h ne diminue pas pendant le repas et à aucun moment ne descend en dessous de -140 mV. Comparativement aux valeurs enregistrées avec la méthode 1, les valeurs se situent entre $-111,3$ et $-139,5$ mV. Des valeurs de E_h caractérisant un milieu moins réducteur ont aussi été enregistrées par Broberg (1957c) qui en insufflant de l' O_2 dans du contenu ruminal, faisait remonter le E_h et montrait ainsi que le degré de son élévation était proportionnel à la quantité d'air introduite. Dans notre étude, la différence observée entre les deux méthodes conforte les résultats de Broberg (1957b) qui a montré que pour du jus ruminal exposé à l'air, le E_h tendait vers des valeurs positives alors que pour des échantillons conditionnés sous CO_2 , bien qu'aucune évolution du E_h n'ait été observée, les valeurs restaient plus négatives. De ce fait, le CO_2 qui modifie le pH du milieu en déplaçant l'équilibre vers une production d'ions H^+ , entraîne aussi une modification du potentiel redox.

II. 3. Sur la pression partielle de l'oxygène

De cette expérimentation, il ressort que l' O_2 atmosphérique est responsable des changements survenus sur la courbe de E_h . L'absence de fluctuations avec la méthode 2 peut probablement être expliquée par la concentration élevée en O_2 , qui aplanit les variations durant les temps de prélèvements comme le montre l'effet significatif de l'interaction temps \times méthode. Pour vérifier la présence d' O_2 , sa pression partielle ($\log PO_2$) a été calculée par le biais de l'équation de Nernst. Les résultats (Figure 22) montrent différentes ($P < 0.01$) courbes d'évolution du $\log PO_2$ selon la méthode appliquée.

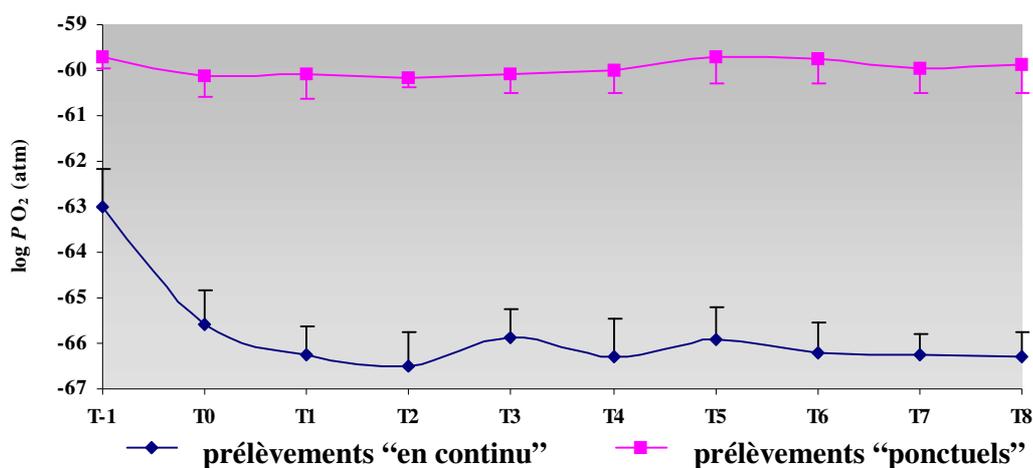


Fig. 22. Evolution du $\log PO_2$ ruminal chez la vache tarie (effet méthode)

Avec la méthode 2, le log PO_2 reste constant pendant toute la durée de la période expérimentale. Lorsque le milieu ruminal est prélevé en continu (méthode 1), un changement vers des valeurs plus faibles, traduisant un milieu plus réducteur, est immédiatement observé. Pendant la période de mesures, les valeurs moyennes de log PO_2 étaient de 10^{-66} et 10^{-60} pour les méthodes 1 et 2 respectivement. Les valeurs obtenues avec la méthode 1 montrent que les conditions naturelles d'anaérobiose du rumen sont bien respectées.

En conclusion, si ces mesures ne sont pas réalisées dans les conditions requises en utilisant la méthodologie appropriée, elles peuvent générer une somme d'erreur considérable. La méthode "ex vivo" des prélèvements en continu, permettant de faire des mesures de pH et de E_h dans des conditions d'anaérobiose strictes serait une méthode de choix pour aborder le diagnostic de désordres nutritionnels.

III. EFFETS DE LA NATURE DE LA RATION

III. 1. Sur le pH ruminal

Les courbes d'évolution du pH d'une part et du E_h d'autre part (Figure 23), sont similaires pour les deux types de ration.

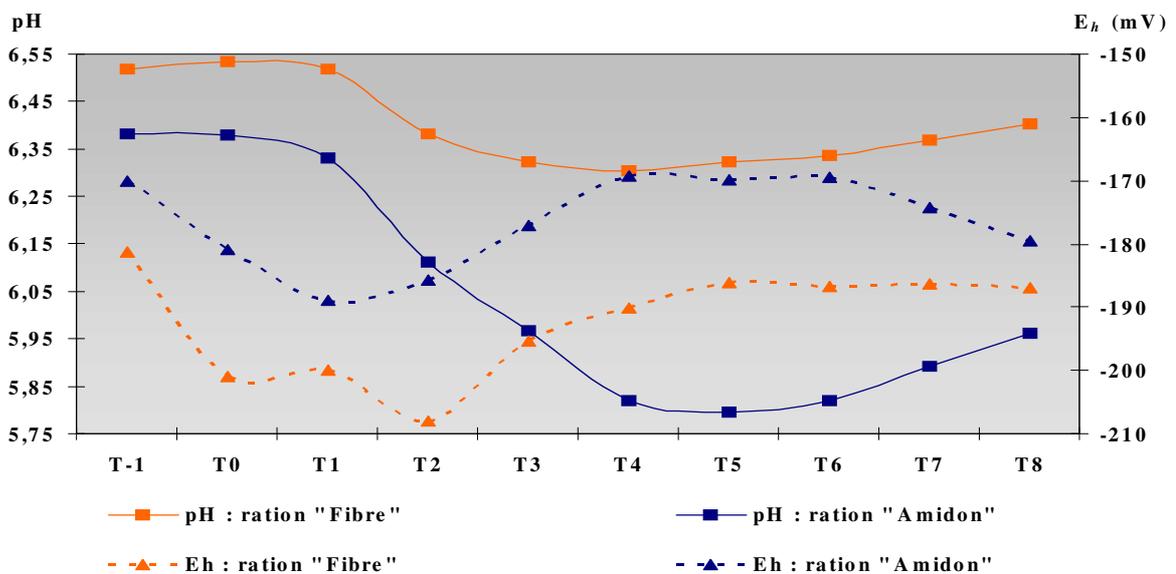


Fig. 23. Evolution du pH et du E_h chez la vache tarie (effet nature de la ration)

Pour la ration "fibre" : Le pH, dont la valeur pré prandiale est de l'ordre de 6,50, se maintient au cours du repas. Il commence à diminuer dès les premières heures post-prandiales, pour atteindre une valeur minimale de 6,35 quatre heures après le repas et remonte ensuite progressivement vers la valeur initiale.

Pour la ration "amidon" : Le pH pré prandial est de 6,40. Il atteint une valeur minimale de 5,82, quatre heures après le repas et remonte ensuite pour atteindre la valeur de 5,92, huit heures après le repas. Cette évolution traduit le caractère plus acidogène de la ration "amidon" sans toutefois caractériser un état permanent d'acidose puisque le pH ne se maintient pas en permanence à des valeurs inférieures à 6. Chez la vache tarie, les quantités de MS ingérées (8 kg/vache/jour) ne sont pas suffisantes pour provoquer un état d'acidose permanent, même lorsque la ration attribuée comporte une forte proportion d'amidon et qu'elle est dépourvue de fibres longues.

III. 2. Sur le potentiel redox

Toutes les valeurs de E_h , calculées à partir des enregistrements de (E) relatifs à la ration "fibre" et à la ration "amidon", sont négatives. Elles traduisent bien l'anaérobiose et le caractère réducteur du contenu ruminal. Avec la ration "fibre", le E_h varie de -181 mV dans l'heure qui précède le repas à -208 mV, 2 heures après la prise de nourriture. Au delà, les valeurs ont tendance à augmenter pour rejoindre le niveau de la valeur initiale. Avec la ration "amidon", la valeur initiale avant le repas est de -170 mV et le minimum atteint 1 heure après le repas, est de -188 mV. Les valeurs de E_h remontent dans les 3 heures qui suivent pour atteindre un maximum de -169 mV.

III. 3. Relation pH – potentiel redox

Quelle que soit la ration offerte la prise de nourriture s'accompagne toujours d'une diminution du E_h au moment du repas alors que l'ingestion des aliments provoque selon Broberg (1957d), une arrivée d' O_2 dans le rumen. Les raisons de la diminution du E_h doivent sans doute être attribuées à l'activité bactérienne capable à ce moment d'utiliser rapidement ces traces d' O_2 . Il semble en observant les courbes, qu'à un pH élevé, correspondre un E_h faible et inversement, comme l'ont déjà montré Marounek *et al.*, (1982) chez la chèvre. Les relations pH/ E_h que nous avons établies (Figure 24), à partir des mesures sont :

Ration "fibre" : $E_h = -61,9\text{pH} + 206,5$; [$r = -0,45$, $n = 80$]

Ration "amidon" : $E_h = -39,2\text{pH} + 57,5$; [$r = -0,74$, $n = 80$]

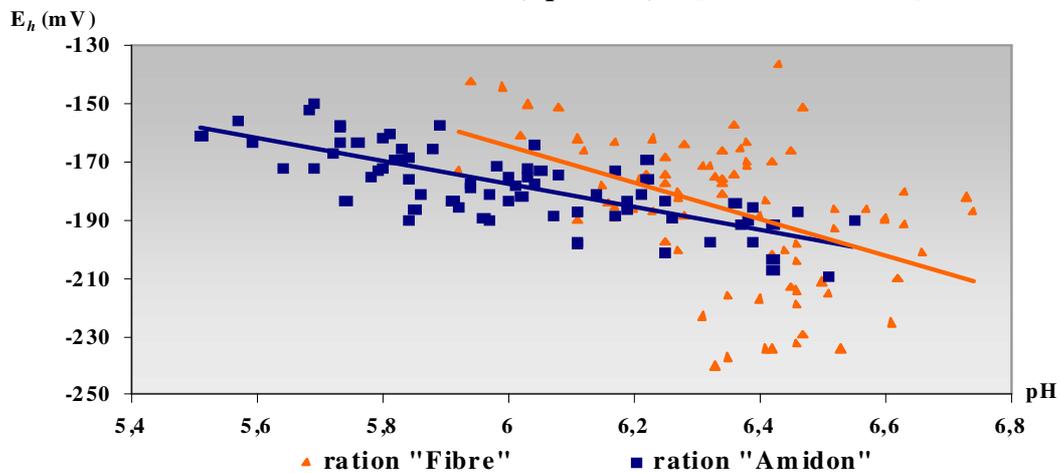


Fig. 24. Relation entre le pH et E_h ruminal (effet nature de la ration)

Une ration "fibre" conduit à un milieu ruminal plus réducteur, donc plus favorable à l'activité des bactéries cellulolytiques (Baldwin and Emery, 1960b). Dans ces conditions, le maintien du pH à un niveau relativement élevé peut être attribué d'une part à une moindre production d'AGV, et d'autre part à l'augmentation de la production de salive, due à la fibrosité importante de la ration. A l'opposé, une ration riche en amidon qui confère un caractère moins réducteur au contenu ruminal, s'accompagne d'une chute de pH consécutive à une forte production d'AGV et à une moindre production de substances tampon.

Chez la chèvre, Giger-Reverdin *et al.* (2006) ont établi, une corrélation négative ($r = -0,80$) entre le pH et le E_h d'une part, et entre le E_h et le comportement alimentaire des animaux exprimé soit en durée d'ingestion ($r = -0,64$), soit de rumination ($r = -0,60$) ou soit de mastication ($r = -0,73$). Ils ont ainsi montré que le E_h , serait plus lié à l'activité masticatoire qu'à un éventuel apport d'oxygène par l'ingestion ou la rumination.

3^{ème} PARTIE

MODÈLE “VACHE TARIÉ”

Chapitre 1

Effet d'un apport de levure probiotique sur le pH ruminal chez la vache tarie

Il a été maintes fois prouvé que la levure probiotique a la capacité de stabiliser le pH du rumen permettant ainsi, grâce à une stimulation des bactéries cellulolytiques, une meilleure valorisation de la ration par l'animal (Williams *et al.*, 1991). Elle est aujourd'hui préconisée dans les systèmes d'élevage intensifs de ruminants, femelles laitières et ruminants de boucherie où les régimes riches en glucides rapidement fermentescibles (GRF) sont susceptibles de provoquer un état d'acidose (Nocek, 1997 ; Oetzel, 2000). A notre connaissance et au regard à la fois de leur capacité d'ingestion et de leur besoin spécifique en énergie, les vaches laitières non gestantes pendant leur période de tarissement, ne sont pas particulièrement sensibles au risque d'acidose ruminale. En conséquence, l'apport de levure n'est ni recommandé, ni nécessaire aux vaches pendant le tarissement.

Le modèle "vache tarie" a été choisi pour disposer avant tout d'un fermenteur biologique sur lequel nous avons voulu tester une méthode d'approche originale permettant de concilier à la fois les caractéristiques des modèles *in vivo* et *ex vivo*. Pour induire une acidose, le régime a été conçu avec un pourcentage élevé en GRF. Il est plus riche en énergie qu'un régime habituel pour vaches taries. Pour cette raison, il a permis de réduire les quantités distribuées que les vaches ont ingérées en un laps de temps court après la distribution. Ceci nous a permis de faire ingérer la totalité du repas sans interruption. Toutefois, on sait qu'un haut niveau d'ingestion favorise l'expression du caractère acidogène d'une ration (Peyraud and Apper-Bossard, 2006), il est à craindre en conséquence que la faible quantité de MS (4 kg par repas) donnée aux animaux ne puisse induire l'acidose attendue.

L'hypothèse d'une captation de l'oxygène par la levure a constitué un point de départ dans notre approche. L'oxygène qui entre dans le rumen principalement pendant l'ingestion du repas, est toxique pour les bactéries anaérobies strictes et nuit à l'attachement de ces bactéries aux particules fibreuses de la ration (Roger *et al.*, 1990). Si la levure probiotique est réellement capable d'abaisser la pression partielle en oxygène (PO_2) du milieu ruminal comme l'a suggéré Newbold *et al.* (1996), alors, elle pourrait bien être à l'origine d'un milieu plus réducteur, plus favorable à une micro-population anaérobie stricte. L'oxygène présent dans la phase liquide du rumen pose des problèmes de quantification, il n'est détectable par aucune sonde ni même par une électrode à oxygène (Scott *et al.*, 1983). Cela n'a rien d'étonnant puisque dans un milieu de culture spécifique des bactéries anaérobies strictes, la PO_2 calculée est extrêmement faible, de l'ordre de 10^{-75}

atmosphère (pour des valeurs de $E = -330$ mV et des valeurs de pH comprises entre 6 et 7), c'est-à-dire qu'elle n'aurait plus alors qu'une signification statistique et non plus de signification en nombre fini de molécule (Fonty *et al.*, 1995).

L'objectif de cette étude est d'apporter des éléments nouveaux de compréhension du mode d'action de la levure probiotique dans le rumen et notamment de son comportement vis-à-vis de l'O₂. Le potentiel redox (E_h), utilisé depuis longtemps (Broberg, 1957a) pour caractériser l'activité microbienne du milieu ruminal a fait l'objet d'un regain d'intérêt (Giger-Reverdin *et al.*, 2006). Sa mesure permet en effet une indication précise du caractère réducteur mais aussi du niveau d'anaérobiose du milieu si aucun agent réducteur ou oxydant exogène n'est apportée dans le milieu.

Dans ce travail axé sur la comparaison des paramètres digestifs obtenus soit avec un régime Témoin sans levure soit avec un régime avec levure, des cinétiques d'évolution du pH et du potentiel redox (E_h) sont établies par la méthode *ex vivo* mise au point par Marden *et al.* (2005), et sont concomitantes de prélèvements d'échantillons du contenu ruminal destinés aux analyses des AGV et du lactate.

I. DÉROULEMENT DE L'ESSAI

I. 1. Animaux et régimes

Deux vaches taries non gestantes ont été utilisées, chacune munie d'une canule ruminale. Elles sont placées dans des stalles séparées qui sont équipées d'auges individuelles et ont à leur disposition de l'eau de boisson en permanence. Durant toute la durée de l'essai, les animaux ont reçu un régime riche en GRF distribué en quantité limitée sans refus (8 kg MS par jour) sous forme d'une ration complète et mélangée en 2 repas par jour. L'essai a été mené selon un dispositif expérimental en carré Latin 2×2 et les traitements ont été les suivants :

- Le traitement **T** : les animaux reçoivent un régime "amidon" sans levure, composé sur la base de la MS, de 51% d'ensilage de maïs plante entière (EMPE) et de 49% de concentrés et de minéraux (Tableau 5).
- Le traitement **B** : les animaux reçoivent le même régime, mais la ration quotidienne est supplémentée par 4 g de la levure probiotique déposée en top-dressing. Les levures ont été fournies par la Société Lesaffre Feed Additives sous

la forme de BIOSAF[®], additif composé de cellules vivantes (10¹⁰ UFC/g de produit).

Le déroulement de chaque période expérimentale a été conforme à celui présenté au chapitre Matériel et Méthodes.

I. 2. Plan expérimental

Toutes les données enregistrées et calculées sont traitées par le General Linear Model (SPSS Version 13.0 pour Windows, SPSS Inc., IL, USA) en mesures répétées qui tient compte de la non-indépendance des mesures entre les temps de prélèvements. Le modèle statistique est le suivant :

$$Y_{ijkl} \text{ pour les heures de mesures} = \mu + T_i + V_j + P_k + Ts_l + (T \times Ts)_{il} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = variable étudiée ; μ = moyenne de la population ; T_i = effet fixé du traitement ; V_j = effet aléatoire de la vache ; P_k = effet fixé de la période ; Ts_l = effet du temps de mesure ; $(T \times Ts)_{il}$ = interaction entre le traitement et le temps de mesure ; e_{ijkl} = erreur résiduelle aléatoire. Seules les différences déclarées significatives à $P < 0,05$ sont rapportées.

II. RÉSULTATS

Les valeurs de pH et de E_h et les concentrations en AGV et lactate enregistrées au cours de ce travail révèlent les effets de la levure probiotique BIOSAF[®] quand elle est utilisée chez la vache tarie et dans nos conditions expérimentales.

II. 1. Effet sur le pH ruminal

Avec le régime **T**, les valeurs moyennes du pH de la phase liquide du rumen obtenues au cours des 4 × 2 cinétiques, varient entre les valeurs extrêmes de 6,39 et 5,80, soit une différence de 0,59 unité. Après l'ingestion totale du repas, le pH amorce une chute qui se prolonge jusqu'à T₄ (4^{ème} heure post-prandiale), se stabilise et puis remonte pendant les 4 heures suivantes (Figure 25).

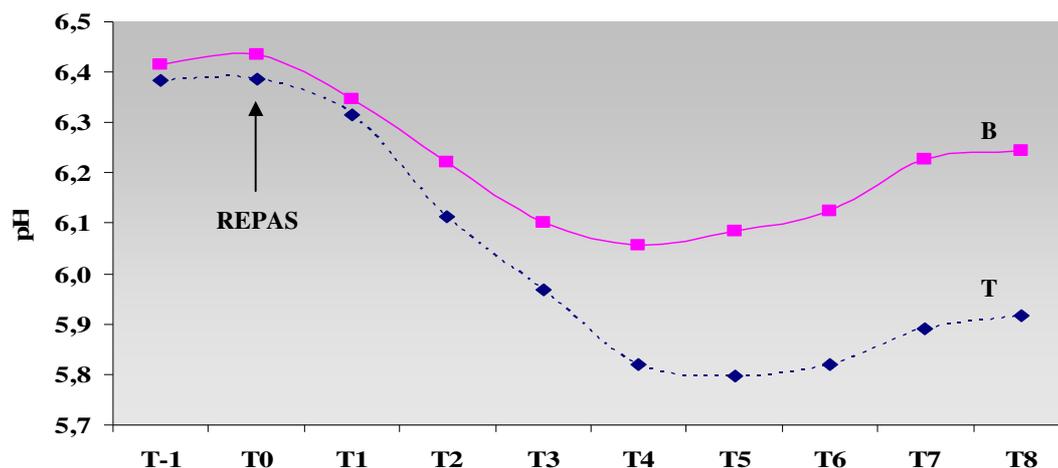


Fig. 25. Evolution du pH ruminal chez la vache tarie (effet levure 4 g)

Avec l'apport de **B**, la plage de variation se situe entre 6,44 et 6,08. A aucun moment de la période de mesure, le pH n'est inférieur à celui du régime **T**. La chute du pH débutée une heure après le repas et qui se prolonge 3 heures durant, atteint une valeur minimale au temps T₄ comme pour le régime **T**. Au terme de ces 4 heures, le pH ruminal avec la levure se stabilise puis remonte progressivement vers la valeur initiale tandis que pour le témoin, le pH se maintient en permanence au dessus de 6.

Un écart significatif de 0,2 unité pH ($P=0,01$) est observé entre les valeurs moyennes obtenues à partir de l'ensemble des cinétiques caractérisant d'une part le régime **T** et d'autre part le régime levure (Tableau 7). L'interaction traitement \times temps et l'allure des courbes, montrent que cet écart est significatif à partir de la 3^{ème} heure post-prandiale.

Tableau 7. Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur le pH ruminal

	Traitements		P			
	T	B	ESM	Trait	Temps	Trait \times Temps
pH	6,04 ^a	6,24 ^b	0,006	0,01	<0,05	<0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 2. Effet sur le E_h ruminal

Les cinétiques du potentiel redox sont illustrées par la Figure 26 et montrent une même tendance d'évolution.

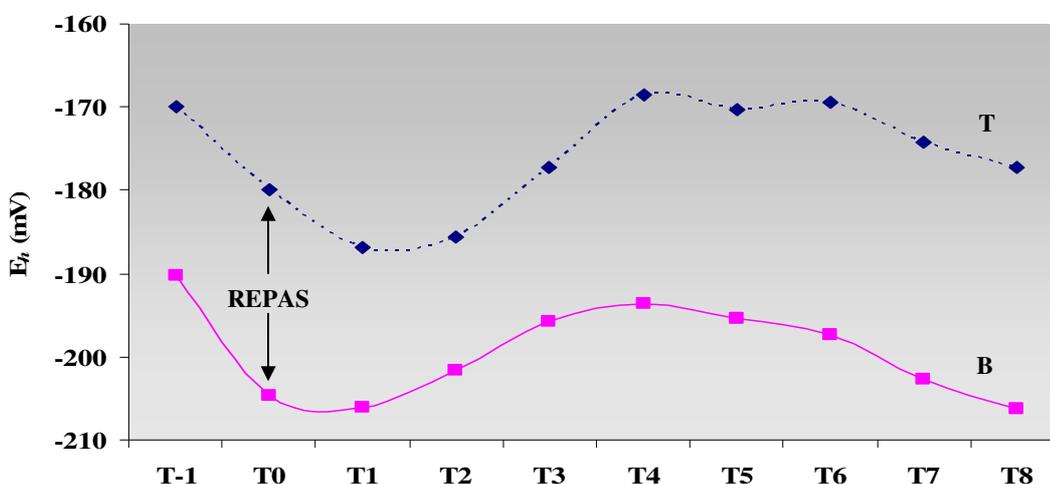


Fig. 26. Evolution du E_h ruminal chez la vache tarie (effet levure 4 g)

Le E_h du milieu ruminal pour le régime T évolue entre -168 et -185 mV, la valeur moyenne sur la période étant de $-176,5$ mV. Avant le repas les valeurs enregistrées du E_h se situent vers des valeurs avoisinant -170 mV. Cette valeur est retrouvée après la 4^{ème} heure post-prandiale, alors que pendant le repas et les 3 heures qui suivent, elles sont inférieures. L'interaction traitement \times temps et l'allure des courbes (Tableau 8) montrent que cet écart est significatif au cours de toute la période de mesure.

Tableau 8. Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur le E_h du milieu ruminal

	Traitements		ESM	Trait	P	
	T	B			Temps	Trait \times Temps
E_h	$-176,5^b$	$-196,2^a$	0,9	$<0,01$	$<0,01$	$<0,01$

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

La supplémentation par 4 g de levure probiotique abaisse globalement le niveau du E_h qui évolue alors entre -190 et -206 mV pour une moyenne sur la période de $-196,2$ mV (Figure 26). Au moment du repas, le E_h est à son plus bas niveau et commence une

ascension pendant une durée de 4 heures. La différence moyenne d'environ 20 mV sur l'ensemble de la période de mesure entre les deux régimes est significative à $P < 0,01$.

II. 3. Effet sur les paramètres fermentaires

Afin d'étayer les résultats obtenus, nous avons déterminé dans le milieu ruminal, la concentration et le profil en AGV, ainsi que la teneur en acide lactique.

II. 3. 1. La concentration et le profil en AGV

Avec le régime **T**, la teneur en AGV totaux (AGV_t) du contenu ruminal varie entre 93,5 et 108,5 mM selon le temps de prélèvement avec une moyenne au cours de la période de mesure de 102,3 mM. L'apport de **B** augmente significativement (+12,1 mM) la teneur en AGV_t par rapport au **T** (Figure 27). La teneur en AGV_t est maximale (108,8 mM), 4 heures après la distribution du repas avec le régime **T** et 6 heures après le repas (120,4 mM) pour le régime **B**.

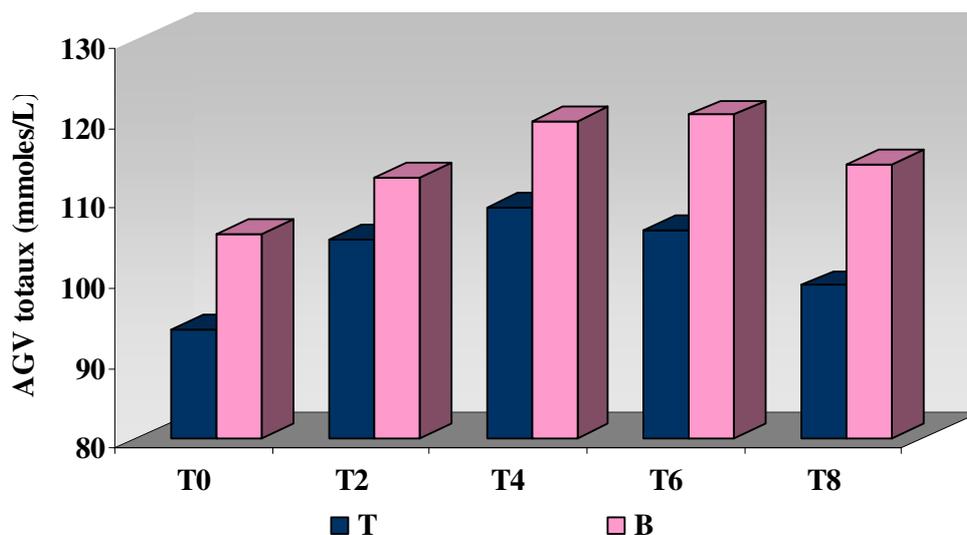


Fig. 27. Effet d'un apport de 4 g de levure probiotique sur la concentration en AGV_t

Des augmentations hautement significatives ($P < 0,01$) de la concentration en acétate (+ 11%) et en propionate (+ 24%) sont observées sous l'effet de la complémentation en levure (Tableau 9). Une interaction linéaire temps × traitement est significative à partir de 2 heures après le repas. La concentration en butyrate, ne diffère pas par rapport au **T**. Le rapport acétate/propionate est de 4,2 pour le régime **T** alors qu'en présence de levures il est de 3,7.

Tableau 9. Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur la teneur totale et la concentration en AGV

	Traitement			P		
	T	B	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
AGV _t (mM)	102,3 ^a	114,4 ^b	7.9	0,01	0,02	<0,05
C ₂ (mM)	66,0 ^a	73,2 ^b	0.6	<0,01	0,05	>0,05
C ₃ (mM)	15,9 ^a	19,7 ^b	0.5	<0,01	<0,01	<0,05
C ₄ (mM)	16,2	16,2	1.3	>0,05	0,03	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 3. 2. Les teneurs en lactate

Les teneurs en acide lactique (Tableau 10) sont très faibles et traduisent une concentration inférieure à 1 mM. Toutefois une baisse significative à $P<0,01$ de 55% de la teneur en lactate total (D- et L-), est obtenue lorsque BIOSAF[®] est apportée dans la ration. Des interactions linéaires temps × traitement significative montrent des différences significatives pour les teneurs en D-, L- et en lactate total entre les deux régimes à partir de 2 heures après le repas.

Tableau 10. Effet d'un apport de 4 g de levure probiotique sur la teneur ruminale en lactate

	Traitement			P		
	T	B	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
D-lactate (mM)	0,12 ^b	0,05 ^a	0,010	<0,01	<0,01	<0,05
L-lactate (mM)	0,08 ^b	0,04 ^a	0,005	<0,05	<0,01	<0,01
D et L lactate (mM)	0,20 ^b	0,09 ^a	0,017	<0,01	<0,01	<0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

III. DISCUSSION

Les résultats présentés mettent en avant d'abord l'évolution des paramètres physico-chimiques et fermentaires du milieu ruminal pour un régime riche en GRF sur ce modèle expérimental. Les mesures du pH ruminal donnent une indication précise de la concentration en protons du milieu due aux AGV et/ou au lactate. La mesure du potentiel redox décrit l'état plus ou moins réducteur du rumen auquel nous tenterons d'associer une plus ou moins intense activité de la microflore anaérobie. Ensuite, ce travail fait ressortir l'effet de la levure probiotique dans des conditions d'alimentation précises afin d'en comprendre le mode d'action.

III. 1. Effet de la ration sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires

L'acidogénicité d'un régime est directement lié aux quantités ingérées et à la vitesse de dégradation de la matière organique (Vérité *et al.*, 1987). L'accroissement du niveau d'ingestion de la ration entraîne systématiquement une acidification du milieu ruminal parce que le rumen doit fermenter des quantités plus importantes de GRF. L'expérimentation sur le modèle "vache tarie" ne permettant pas un niveau d'ingestion élevé, les 8 kg de MS offerts quotidiennement aux animaux n'étaient pas *a priori* un facteur favorable à l'induction d'un état d'acidose. Par contre, la composition du régime qui renferme une grande quantité de GRF facilement dégradable, bien que totalement inadaptée à la vache tarie en élevage, pouvait permettre d'induire l'état acidotique recherché. Le régime retenu à base d'ensilage de maïs complété par des farines de céréales, comporte un taux d'amidon digestible calculé (Sauvant *et al.*, 2004) supérieur à 30% de la MS et présente ainsi une forte acidogénicité. Cette teneur en amidon suggère indirectement une faible proportion de parois végétales dans le régime qui, en réduisant l'activité masticatoire (Beauchemin et Buchanan-Smith, 1989) et la production de salive (Erdman, 1988) augmente encore les risques d'acidification du milieu ruminal.

Bien qu'il soit difficile de définir avec certitude une gamme précise, il est généralement admis que dans les conditions normales de fonctionnement du rumen, le pH se situe entre 6,0 et 7,0 (Rémond *et al.*, 1995). Les déviations qui sortent le pH de cette norme, sont principalement issues d'un déséquilibre dû à la fermentation des aliments présents dans la ration. Avec des régimes riches en GRF, ces déviations vont dans le sens d'une acidose post-prandiale. Le niveau de ce désordre nutritionnel est souvent associé à la

durée pendant laquelle les valeurs de pH restent inférieures à une valeur seuil de pH 6 ou à des valeurs moyennes en dessous de pH 6,25 (Sauvant *et al.*, 1999).

Dans cette étude les mesures enregistrées avant et pendant les heures qui suivent la prise du premier des deux repas quotidiens, donnent simplement un aperçu de l'évolution du pH ruminal. Son évolution montre que les valeurs enregistrées pour le régime témoin se maintiennent plus de 4 heures en dessous de 6, avec une valeur moyenne de 6,04 pendant toute la durée de la période expérimentale. La baisse du pH entre 2 et 4 heures après le repas est due à l'activité fermentaire dans le rumen. Lors de la distribution du 2^{ème} repas à T₈, les valeurs du pH ont augmenté mais n'atteignent pas leur valeur initiale. Chez le mouton, Mackie *et al.* (1978) montrent que l'intervalle de 8h entre le 1^{er} et le 2^{ème} repas ne permet pas non plus au pH ruminal de retrouver sa valeur initiale. Les auteurs font aussi état que le 2^{ème} repas provoque une chute de pH plus accentuée que celle provoquée par le premier. Ce n'est qu'au terme du second intervalle de 15h après le 2^{ème} repas, que le pH retrouve sa valeur initiale. Ces observations qui montrent l'importance de la durée et de la régularité des intervalles entre les repas successifs sont confirmées chez la vache en lactation (Figure 9) où il a été montré que le pH retourne à son niveau initial qu'après le repas du soir selon Oetzel (2000). Compte tenu des différentes caractéristiques telles que le niveau d'ingestion, la nature de la ration et le cycle de distribution, le pH ruminal reste un des paramètres très utiles pour la détection d'un éventuel risque d'acidose. Lors de nos mesures à T₋₁, le pH moyen ruminal est bien supérieur aux valeurs caractéristiques d'acidose, et peut être expliqué par le faible niveau de MSI qui limite le temps nécessaire à la digestion ruminale. Dans ces conditions la quantité d'acides formés après la 14^{ème} heure post-prandiale après le 2^{ème} repas, est très rapidement absorbée par la paroi ruminale, et ne peut faire baisser le pH du rumen.

La relation directe entre la ration, le pH ruminal et la concentration en AGV est bien connue. Avec une ration riche en GRF, la baisse du pH ruminal observée est d'abord reliée à une augmentation importante des AGV dans le rumen (Patra *et al.*, 1996). Les acides produits ont une chaîne carbonée plus longue, c'est-à-dire plus de propionate (C₃), plus de butyrate (C₄) et moins d'acétate (C₂). Ainsi le rapport acétate/propionate diminue et peut traduire un état d'acidose s'il est inférieur à 2,5 (Sauvant *et al.*, 2006). Dans notre travail si le régime proposé aux animaux, apparaît comme étant acidogène au vu des résultats de pH, il n'en est pas de même pour les concentrations et le profil des AGV. Le régime témoin induit des concentrations d'acétate et de propionate de 66,0 et 15,9 mM

respectivement alors que la teneur en butyrate est au niveau de 10 mM. Le rapport C₂/C₃ est de 4,16 et par conséquent, ne semble pas caractéristique d'une ration acidogène. Les teneurs en acide lactique ne traduisent pas non plus l'existence d'une acidose latente qui est plutôt caractérisée par une concentration en lactate comprise entre 1 et 10 mM (Martin *et al.*, 2006). La concentration moyenne en lactate que nous avons mesurée est de 0,2 mM, mais c'est un acide fort (5 à 10 fois plus fort que les AGV), et son effet acidogène s'ajoutant à celui des AGV pourrait bien être responsable de la baisse de pH observée.

Les paramètres physico-chimiques du milieu ruminal sont dépendants de la nature du régime. Celui que nous avons utilisé dans ce travail avec un modèle animal qui n'est pas souvent affecté par l'acidose latente semble sur certains points répondre à nos objectifs. Il a induit une acidification du rumen à un niveau qui correspond à celui décrit pour les acidoses latentes, et cette acidification pourrait bien être attribuée à une augmentation de la production des AGV plutôt qu'à une accumulation de lactate. L'acidose provoquée présente un ratio C₂/C₃ nettement plus élevé que les ratios habituellement observés en situation d'acidose comparable.

Le potentiel redox, autre paramètre physico-chimique du rumen, définit l'état réducteur ou oxydant du milieu. Peu d'études ont été consacrées à sa mesure mais dans la plupart des cas, les valeurs trouvées sont associées aux événements fermentaires qui se produisent lors du cycle d'ingestion et de rumination. Chez le mouton, Broberg (1957a) a montré que le contenu ruminal a un potentiel réducteur (E) bien défini qui est de l'ordre de - 400 mV. Lorsque l'auteur corrige cette valeur par rapport à l'électrode standard à hydrogène pour exprimer le potentiel redox ; le E_h ainsi calculé est de -150 mV. D'autres auteurs ont donné des valeurs du E_h ruminal qui varient entre -150 et -260 mV et qui évoluent au cours du nyctémère (Barry *et al.*, 1977). Le E_h mesuré au cours de la journée montre que les valeurs les plus basses se situent dès la prise du repas. Elles ont été attribuées à un accroissement de l'activité de la microflore (Marounek *et al.*, 1982). Après le repas, le E_h augmente rapidement vers des valeurs un peu moins réductrices que des auteurs ont attribuées à une entrée d'O₂ dans le rumen (Marounek *et al.*, 1987).

Utilisant dans leurs essais des substances réductrices ou oxydantes exogènes, Walden et Hentges (1975) attribuent à la seule présence ou absence d'oxygène et non au potentiel redox, l'effet déterminant de la croissance de bactéries anaérobies. Pourtant, les

conditions d'anaérobiose du rumen favorables aux bactéries anaérobies strictes, semblent bien être caractérisées comme le sont les sols anoxiques par l'absence d'O₂ associée à un potentiel redox bas (Picek *et al.*, 2000). Dans notre étude, la méthode *ex vivo* permettant de mesurer le E_h du contenu ruminal en temps réel dans les conditions du rumen, donne des valeurs qui caractérisent bien ce milieu anaérobie (E_h= -176 mV) dans lequel la PO₂ se situe à un niveau infiniment bas.

III. 2. Effet de la levure probiotique sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires

Dans cette étude, l'apport quotidien de 4g de levure Sc 47 a permis d'éviter la chute post-prandiale du pH ruminal (+0,2 unité pH en moyenne), alors que dans le même temps la concentration des AGV augmente. Cet effet de la levure observé sur le pH confirme les résultats de nombreux travaux (Williams *et al.*, 1991 ; Kumar *et al.*, 1994 ; Jouany *et al.*, 1999) qui se sont aussi intéressés à l'effet de la levure probiotique sur l'évolution du pH ruminal. Cet effet est significatif avec des rations riches en GRF (Fiems *et al.*, 1993) alors qu'avec des rations riches en fibres, aucune différence significative n'a pu être décelée (Swartz *et al.*, 1994). La nature du régime semble être le facteur déterminant de l'efficacité de la levure et justifie notre choix pour le régime "amidon".

Lors d'un apport important en GRF, la diminution du pH ruminal est généralement attribuée à une plus forte concentration en AGV malgré une dissociation plus réduite, qui facilite alors leur absorption passive par la paroi. Les effets de la levure probiotique sur les concentrations ruminales d'AGV *in vivo* sont en général faibles et dans la plupart des cas non significatifs (Chademana and Offer, 1990). Néanmoins, une tendance à l'augmentation se dégage et dans la majorité des cas, la levure probiotique stimule la propionogénèse *in vivo* ce que confirment nos résultats (Harrison *et al.*, 1988 ; Erasmus *et al.*, 1992) mais parfois, c'est l'acétogénèse qui est favorisée (Plata *et al.*, 1994).

Dans notre étude, la remontée du pH ruminal en présence de levure est associée à une augmentation de la concentration en AGV. Alors, ceci nous incite à attribuer la remontée du pH à une diminution significative de la teneur en lactate pourtant peu importante. Même si la teneur en lactate est relativement faible, elle est significativement influencée par la présence de levure. Celle-ci pourrait donc agir sur l'équilibre entre la production du lactate et sa transformation par la flore bactérienne ruminale spécifique.

L'effet levure sur les paramètres ruminiaux (plus d'AGV, un rapport C₂/C₃ diminué et moins de lactate) semble pouvoir être attribué à une augmentation de l'activité des seules bactéries ruminales réputées pour être les anaérobies les plus exigeantes que sont les cellulolytiques et les utilisatrices de lactate.

La réponse à l'apport de levure probiotique dans notre essai, se traduit par une diminution du potentiel redox du contenu ruminal (- 20 mV). Ce résultat est en accord avec les résultats de Mathieu *et al.*, (1996) qui ont enregistré une baisse semblable de 18 mV chez le mouton recevant des levures probiotiques. Le contenu ruminal en présence de levure acquiert un caractère réducteur plus marqué traduisant une plus parfaite anaérobiose dans la mesure où aucune substance réductrice exogène n'est apportée. Contrairement aux valeurs enregistrées pour le pH, la différence de E_h observée entre les deux régimes est déjà présente lors de la première mesure ($T_{.1}$) et se maintient tout au long de la période d'enregistrement. Ceci suggère une persistance de l'activité de la levure probiotique due à l'adaptation à laquelle ont été soumis les animaux.

La stabilisation du pH ruminal pourrait bien être attribuée à un renforcement du pouvoir réducteur du milieu provoqué par la levure qui se répercute sur l'activité des bactéries anaérobies strictes, dont certaines assurent la transformation du lactate en propionate.

III. 3. La levure probiotique renforce le pouvoir réducteur du milieu ruminal

Plusieurs hypothèses ont été formulées à l'égard du mode d'action de la levure probiotique, notamment la consommation possible de l'O₂ par la levure renforçant ainsi le caractère anaérobie du milieu ruminal (Rose, 1987). Par la suite, Newbold *et al.*, (1993) confirment *in vitro* cette théorie et expliquent ainsi une meilleure activité des bactéries ruminales. Dans l'optique de démontrer l'effet de la levure probiotique sur la pression partielle de l'oxygène, nous avons fait appel aux calculs intégrant les lois de la thermodynamique. Par le biais de l'équation de Nernst et le couple O₂/H₂O, la pression partielle de l'oxygène ($\log P(O_2)$) a été calculée à partir des valeurs mesurées de pH et de E_h selon l'équation suivante:

$$\log P(O_2) = 64,59 E_h + 4 \text{ pH} - 78.60$$

La pression partielle en oxygène

Les valeurs de la pression partielle en oxygène ($P(O_2)$) pour le régime sans levure varient entre 10^{-64} et 10^{-66} atm (Figure 28) avec une moyenne de $10^{-65.8}$. Une heure avant le repas, on constate avec le régime témoin une $P(O_2)$ relativement élevée (10^{-64} atm), qui pourrait correspondre à un contenu ruminal de moindre activité digestive. Pendant et après le repas, une augmentation du pouvoir réducteur est perçue jusqu'à T_2 (- 2 unités log de $P(O_2)$) où le milieu se stabilise aux alentours de 10^{-66} atm. Si un log $P(O_2)$ de -66 correspond à une pression partielle de l' O_2 de 10^{-66} atm, naturellement à un log $P(O_2)$ de - 64 correspond une $P(O_2)$ de 10^{-64} atm. Lorsque dans le rumen, le log $P(O_2)$ diminue de 2 unités (de - 64 à -66), cela correspond à une diminution de la pression partielle d' O_2 égale à un coefficient 100 (10^{-64} à 10^{-66}).

L'introduction de 4g de BIOSAF[®] dans le régime s'accompagne d'une diminution significative moyenne du log $P(O_2)$ de 0,8 unité, ce qui représente une diminution de la pression partielle en oxygène d'un facteur $10^{0.8}$. Les différences les plus marquées (de l'ordre de 1,5 unité log) apparaissent dans l'heure qui précède et l'heure qui suit le repas. Traduits en termes de $P(O_2)$, ces résultats montrent qu'une dose de 4g de levure dans le rumen d'une vache tarie ingérant 8 kg de MS du régime "amidon", serait capable par sa consommation d' O_2 d'abaisser la pression partielle de ce gaz d'un coefficient 31. L'accroissement du caractère réducteur du rumen en présence de levure par rapport au témoin découlerait donc de cette capacité. La diminution de $P(O_2)$ ainsi mise en évidence, pourrait être à l'origine des changements de E_h et de pH provoqués par l'apport de levure dans la ration.

Toutefois, l'approche thermodynamique adoptée pour quantifier la pression partielle en oxygène du milieu ruminal présente certaines limites. Le calcul de la $P(O_2)$ utilise les valeurs de pH et de E_h . Or, les valeurs mesurées de E_h ne s'identifient pas à celle du couple d'oxydo-réduction O_2/H_2O . Dans ces conditions les variations de la $P(O_2)$ discutées ci-dessus n'ont plus de sens réel sur un plan biologique puisqu'à un tel niveau (10^{-66} atm), la quantité d' O_2 présente dans le rumen n'a pas de signification : on ne peut pas exprimer sa concentration en nombre fini de molécules. Il est alors difficile de reconnaître à la levure la capacité de consommer de l' O_2 dans le rumen, au point d'en augmenter le pouvoir réducteur.

Si la levure dans sa quête d'énergie, ne peut directement pas intervenir sur la consommation d' O_2 , c'est qu'à une telle valeur de potentiel redox, la totalité de l' O_2 est

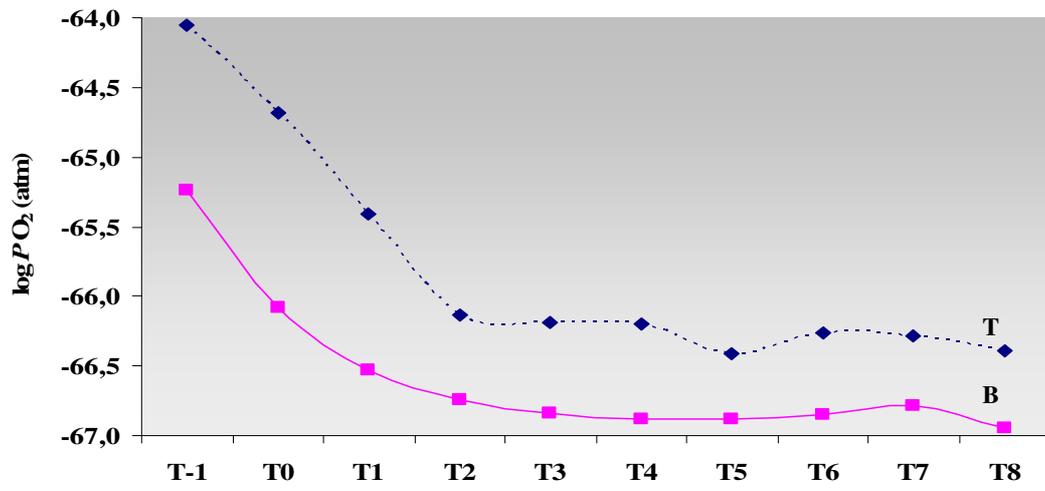


Fig. 28. Evolution du $\log PO_2$ chez la vache tarie (effet levure 4 g)

sous sa forme réduite (H_2O). Sa respiration est de type anaérobie, c'est-à-dire qu'elle consiste à échanger des électrons avec des accepteurs encore disponibles et non totalement réduits malgré un E_h de -180 mV. Les molécules capables d'accepter des électrons dans de telles conditions sont issues du métabolisme fermentaire et selon Jouany *et al.* (1995) ce sont les nitrates, les sulfates, le fumarate et le CO_2 . Mais à ce niveau d'anaérobiose, alors que tous les autres couples sont dans leurs formes réduites, seul le couple redox CO_2/CH_4 (Figure 17), qui n'est ni totalement oxydé ni totalement réduit, est susceptible d'accepter des électrons (Rowell, 1981 ; Weimer, 1998). Le CO_2 issu du métabolisme fermentaire, majoritairement présent dans le rumen, pourrait ainsi être l'accepteur final des électrons échangés par la levure dans sa quête d'énergie pour la synthèse de l'ATP dont elle a besoin.

Ce renforcement du pouvoir réducteur qui a été maintes fois attribué à une consommation d'oxygène par la levure relève sans doute d'une capacité de la levure, supérieure à celle de la biocénose ruminale caractéristique des rations acidogènes, à échanger des électrons avec un accepteur de type CO_2 utilisé aussi par les bactéries méthanogènes.

IV. CONCLUSIONS

Le modèle animal utilisé dans cette étude a permis de mettre en évidence l'influence d'un régime acidogène sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires du milieu ruminal. L'acidification du milieu a été dans un premier temps attribuée à la production accrue d'AGV, mais l'apport de levure probiotique dans la ration semble confirmer l'hypothèse selon laquelle la baisse du pH ruminal serait plutôt due à une accumulation même légère d'acide lactique. En effet, la levure stabilise le pH malgré une production accrue d'AGV et elle interviendrait donc sur le pH par le renforcement du pouvoir réducteur qui serait à l'origine de la diminution de la teneur en lactate et de l'augmentation de la teneur en AGV du contenu ruminal. En abaissant le E_h , la levure favoriserait l'activité des bactéries anaérobies strictes, celles qui transforment le lactate en propionate permettant au pH de se maintenir au dessus de 6 et celles qui dégradent les glucides pariétaux et sont responsables d'une production accrue d'AGV. L'expression "consommation de l' O_2 " généralement utilisée en lieu et place de respiration pour décrire

le mode d'action de la levure semble inexacte parce que le métabolisme de la levure dans un milieu extrême comme le rumen s'oriente obligatoirement vers une respiration anaérobie où l'accepteur final d'électrons serait le CO₂ et non l'O₂ comme c'est le cas dans la respiration aérobie.

Chapitre 2

**L'effet d'un apport d'oxygène sur
la microflore ruminale en
présence ou non de levures**

Le rumen est un fermenteur biologique où prolifère une grande variété de microorganismes pour la plupart anaérobies, responsables de la dégradation des aliments (Hungate, 1966). Le potentiel redox qui caractérise ce milieu est compris entre -150 et -260 mV (Marounek *et al.* 1982, Marden *et al.* 2005) et traduit un caractère fortement réducteur. Quelques auteurs pourtant, ont enregistré dans le rumen du mouton la présence de quantités non négligeables d'oxygène : selon Mc Arthur et Multimore (1962), 5 à 10 ml d'O₂ seraient présents par litre de phase gazeuse ruminale. Czerkawski (1969) estime à 38 litres par jour la quantité d'O₂ qui entre dans le rumen par le biais de la salive et du bol alimentaire ou par diffusion sanguine. Ces observations ne sont toutefois pas totalement confirmées par les mesures d'O₂ dissous dans la phase liquide, car seules des concentrations très faibles devenant indétectables après le repas ont été mises en évidence chez des moutons fistulés (Scott *et al.*, 1983 ; Hillman *et al.*, 1985). Il est pourtant envisagé que l'O₂ qui pénètre dans le rumen pourrait entraver l'activité des bactéries anaérobies strictes (Newbold *et al.*, 1996), notamment l'activité des cellulolytiques et leur attachement aux fibres (Roger *et al.*, 1990) alors que Broberg (1957a) minimise ce risque de contamination de la phase liquide par l'oxygène.

L'oxygène est toxique pour les bactéries anaérobies strictes parce que cette flore ne possède pas l'enzyme *superoxide dismutase* (Morris, 1976 ; Onderdonk *et al.*, 1976), et aussi parce qu'en présence d'O₂, elle lui est impossible de maintenir le potentiel redox bas indispensable à sa croissance. Cette nocivité pour la flore anaérobie découle sans doute du fait que l'oxygène est de par sa nature un excellent accepteur d'électrons ayant comme potentiel oxydant un E_h de $+0,815$ V.

La confusion qui est généralement faite entre l'effet d'un potentiel redox trop élevé et l'effet de l'O₂ sur la croissance des bactéries anaérobies a été remise en question par Walden et Hentges (1975) et Onderdonk *et al.* (1976). Pour distinguer les deux effets, ces auteurs ont apporté dans le milieu de culture un agent réducteur, le dithiothréitol, ou un agent oxydant, le ferricyanure de potassium, pour modifier la relation entre la pression partielle d'O₂ et le potentiel redox. Par ce dispositif les auteurs pensent apporter la preuve que les bactéries anaérobies strictes sont plus sensibles à la présence d'oxygène qu'à un potentiel redox pouvant paraître insuffisamment bas, mais l'ajout de substances oxydantes ou réductrices exogènes ne va pas sans modifier les échanges électroniques. Dans le rumen, en absence de tout apport de substances réductrices ou oxydantes exogènes, le potentiel redox mesuré est donné par les potentiels des couples d'oxydo-

réduction dominants générés spécifiquement par les activités fermentaires et réductrices des bactéries composant cette biocénose, en quête de ressources énergétiques.

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré la capacité de la levure d'une part à abaisser le potentiel redox du milieu et d'autre part à diminuer la pression partielle de l'O₂ dans la phase liquide du rumen. Nous voulons maintenant, par le biais d'un apport d'oxygène, mettre en évidence ou confirmer l'activité réductrice de la flore ruminale et vérifier la capacité de la levure probiotique à renforcer ce caractère réducteur. L'objectif de cette étude est donc d'apporter dans le jus de rumen une quantité connue d'oxygène pour (1) mesurer son effet sur le potentiel redox et sur le comportement de la flore ruminale soumise à cet apport d'O₂, (2) mettre en évidence une éventuelle capacité de la levure à débarrasser le milieu des traces d'O₂ nocives pour la flore et (3) comparer sur ce critère l'efficacité de 7 souches de levures utilisées à deux niveaux d'apport différents.

I. DÉROULEMENT DE L'ESSAI

I. 1. Animaux, régimes et plan expérimental

Trois vaches taries non gestantes, de race Prim' Holstein et d'un poids vif moyen de 600 kg sont utilisées. Les vaches sont fistulées au niveau du sac dorsal du rumen et sont maintenues dans des box afin de recevoir une alimentation individuelle. Les animaux ont été adaptés aux locaux et aux régimes durant une période de 14 jours.

Les vaches sont alimentées deux fois par jour (9h et 17h) avec le régime "amidon" (régime témoin - **T**) composé de 50,9 % d'ensilage de maïs plante entière, 15,7 % de farine de blé, 23,9 % de farine de maïs, 8,1 % de tourteaux de soja et 1,4 % de minéraux (Tableau 5). Les régimes expérimentaux sont composés du régime **T** et de 13 autres régimes composés eux-mêmes du régime témoin complétement successivement par 7 souches de la levure *S. cerevisiae* dont 4 souches commerciales : BIOSAF® Sc 47 (**B**), LEVUCCELL CNCM I-1077 (**LC**), YEA SACC CBS 493.94 (**YS**), BIOSPRINT MUCL 39885 (**BT**) et 3 souches confidentielles (**L13**, **L30** et **L11**) fournies par la société Lesaffre Feed Additives (59520 Marquette-lez-Lille, France). Chaque souche est distribuée quotidiennement à deux doses 0,5g et 5g, sauf la souche L11 distribuée uniquement à 5g par jour (disponibilité insuffisante).

Chaque période expérimentale, pendant laquelle un traitement est administré, dure trois jours, le dernier jour étant consacré à la mesure du E_h. Une période de désadaptation

de 2 jours est systématiquement appliquée entre 2 périodes expérimentales. Les 14 différents traitements (témoin inclus) sont distribués de façon aléatoire de sorte que tous les traitements soient expérimentés sur toutes les vaches.

I. 2. Dispositif de prélèvements et de mesures

Un autre dispositif “*ex vivo*”, adapté de celui mis au point par Marden *et al.* (2005), a été mis en place ; les modifications réalisées devant permettre de répondre précisément à nos objectifs.

Comparativement au dispositif initial, le nouveau dispositif (Figure 29) comprend :

- 2 filtres, chacun composé d'un anneau de plomb, recouvert sur ses deux faces par un tissu de Nylon poreux,
- 2 tuyaux en plastique (L = 750 mm ; Ø interne = 5 mm) alimentant :
- 2 cellules de mesures : une cellule témoin et une cellule essai. L'injection de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est pratiquée uniquement dans la cellule essai ; la cellule témoin permet de corriger les données pour tenir compte des variations de E_h dues aux fermentations naturelles qui s'y déroulent.
- un tuyau en caoutchouc (L = 650 mm ; Ø externe = 15 mm ; Ø interne = 10 mm) qui entoure et protège les tuyaux en plastique pour éviter les risques de torsion pendant les contractions de la paroi ruminale.

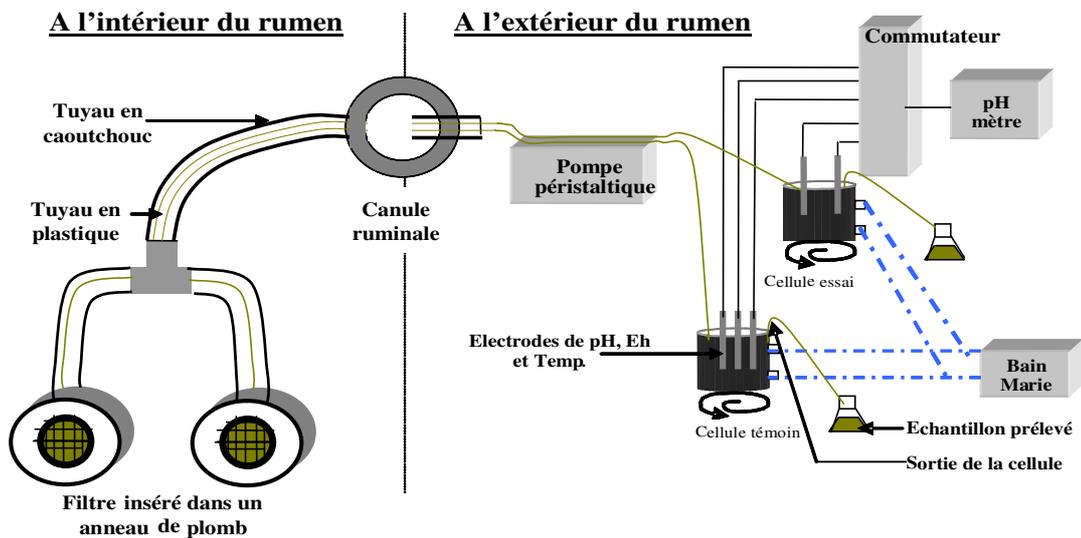


Fig. 29. Représentation schématique du dispositif “*ex vivo*” mis en place

I. 3. Déroulement d'une période de mesures

Durant la période de mesures, représentée sur la Figure 30, quatre cinétiques successives sont réalisées (C₁, C₂, C₃ et C₄) par vache par traitement et par période. Au total 12 cinétiques sont établies pour chacun des traitements (4 × 3). Chacune d'elle, qui débute par une injection ponctuelle d' H₂O₂, est précédée d'une période d'au minimum 1 heure permettant, entre 2 cinétiques, le renouvellement de la phase liquide contenue dans la cellule.

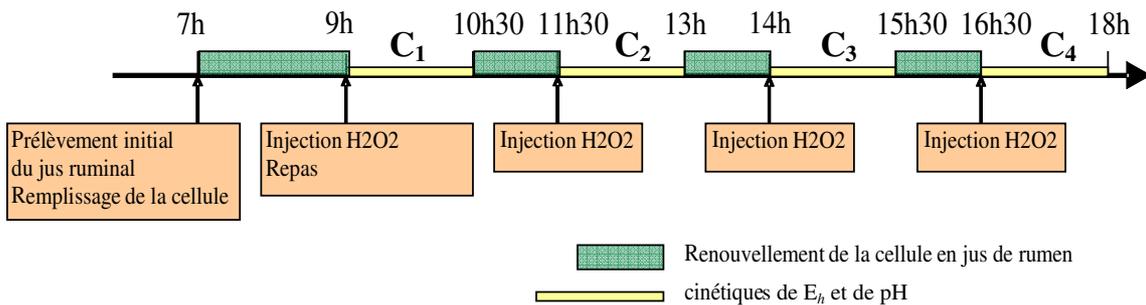


Fig. 30. Déroulement chronologique d'une période de mesures

I. 3. 1. Choix d'une forme d'apport d'oxygène

Pour des raisons techniques, nous avons choisi d'apporter l'oxygène dans la cellule sous forme de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui a la particularité de se décomposer naturellement et de libérer de l'oxygène selon la réaction :



Une solution de peroxyde d'hydrogène est caractérisée par son titre volumique (exprimé en volume ou %) qui correspond au volume (L) d'oxygène gazeux (O₂) dégagé par 1 litre de peroxyde d'hydrogène lors de sa décomposition. Selon le Tableau 11, 1 litre d'une solution d'H₂O₂ à 33% libère donc 121 L d'oxygène.

Tableau 11. Relation entre la concentration d'une solution de peroxyde d'hydrogène (%) et son titre ou volume d'oxygène libérée (L)

Concentration de la solution en H₂O₂ (% en poids)	30	33	35	50	70
Titre en volume	110	121	130	200	300

Source : Institut National de Recherche Scientifique. Fiche Toxicologique No. 123 (Eds. 1992)

I. 3. 2. L'apport d'H₂O₂ dans la cellule de mesure

Le volume injecté de la solution de H₂O₂ devait être compris entre un minimum permettant une bonne diffusion et un maximum n'entraînant pas une sortie de jus excessive. L'injection de 1/100 du volume de la cellule a été retenue, ce qui correspond à un volume de 2,4 ml. La concentration en H₂O₂ de la solution à injecter est déterminée en fonction de ce volume prédéterminé et de la quantité optimale d'O₂ à apporter. Ainsi cet apport d'O₂ qui est nécessairement supérieur à la quantité d'O₂ instantanément réduit doit permettre à la fois :

- une variation de E_h suffisante : nous avons considéré que l'injection d'H₂O₂ doit apporter une quantité d'O₂ capable de provoquer une forte diminution du pouvoir réducteur. Une remontée du potentiel redox d'au moins 200 mV a été arbitrairement retenue.
- de fournir toutefois une quantité d'H₂O₂ compatible avec la survie de la biocénose anaérobie, pour que celle-ci puisse assurer la détoxification vis-à-vis de l'O₂, et permettre le retour du E_h à son niveau initial.

I. 4. Essai préliminaire en cellules de mesures

Quatre différents volumes d'O₂ présents sous la forme de H₂O₂ ont été testés tour à tour individuellement sur le potentiel redox du jus ruminal, par l'injection de 2,4 ml de solution. Ils correspondent respectivement à 4 concentrations de H₂O₂ (3, 4, 5, et 10 ml H₂O₂ à 33%/L d'eau distillée) et doivent permettre de déterminer d'une part la quantité d'oxygène à injecter pour obtenir la réponse souhaitée en matière de E_h et d'autre part pour estimer la durée nécessaire au retour du potentiel redox à son niveau initial.

Dans la minute qui suit chaque injection, un pic du E_h est observé qui est proportionnel à l'apport d'H₂O₂ (Figure 31). Après le pic, le E_h entame une diminution lente mais continue, excepté après une injection de 2,90 ml d'O₂ qui augmente brusquement le potentiel redox jusqu'à la valeur de +176 mV (hauteur du pic = 325 mV). Cette valeur se maintient pendant 20 min au cours desquelles le E_h ne montre aucune tendance à redescendre à sa valeur initiale, comme si la flore était inhibée ou détruite par cet apport d'O₂.

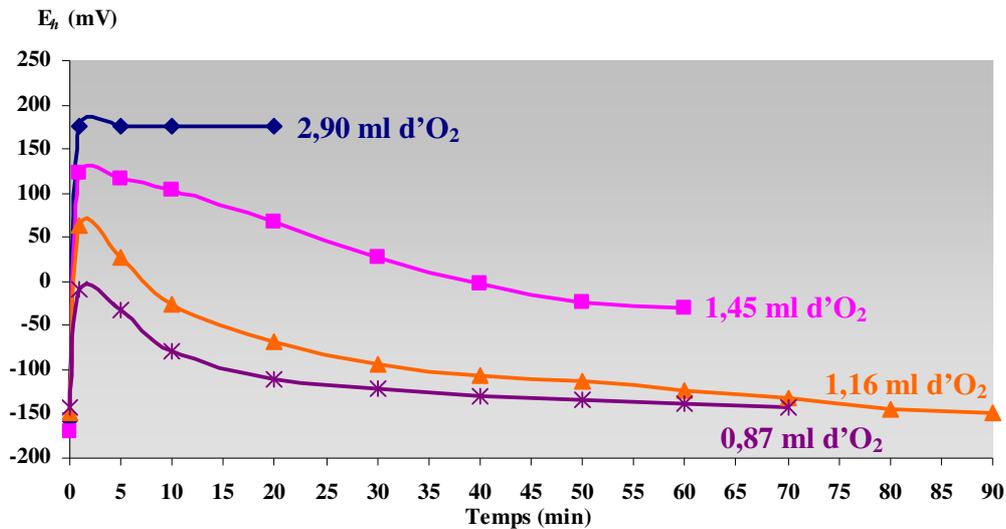


Fig. 31. Evolutions du E_h à différentes concentrations d'oxygène

L'injection de 1,45 ml d'O₂ engendre un pic de E_h trop élevé (250 mV) qui tend à redescendre mais de manière trop lente dans l'intervalle de temps de cinétique recherché alors qu'un volume de 0,87 ml d'O₂ produit un pic trop faible. Le pic que crée une injection de 1,16 ml d'O₂ (2,4 ml de solution à 4/1000 de H₂O₂ à 33%) répond au critère recherché, c'est-à-dire une montée du potentiel redox d'environ de 200 mV. La récupération du E_h initial qui est atteinte en 90 min, prouve que même si elle a été affectée, la flore ruminale n'a pas été totalement inhibée par cet apport massif d'O₂. Cette dernière concentration a donc été choisie pour la poursuite de notre essai.

I. 5. La mesure du potentiel redox

Le pH-mètre et son équipement spécifique fournissent simultanément les valeurs de E dans les 2 cellules (essai et témoin). Les valeurs sont relevées :

- juste avant l'injection d'H₂O₂ (T₀),
- quelques instants après l'injection au moment de l'apparition du pic du potentiel redox (T_{pic}),
- toutes les 5 minutes après l'injection pendant 1h30, (temps estimé nécessaire pour le retour à l'état initial du potentiel redox pour une injection de 1,16 ml d'O₂).

I. 6. Traitements des données

Les données sont enregistrées manuellement dans une grille de résultats et les cinétiques établies à l'aide d'un tableur (Excel, Microsoft Office 2003). Ces données sont ensuite corrigées par rapport à la cellule témoin afin de soustraire l'effet des variations naturelles de E et de pH dû à la poursuite des fermentations dans les cellules pendant 1h30. Pour cela la correction suivante est effectuée :

$$\mathbf{E \text{ corrigé} = E \text{ mesuré} + (E_{\text{témoin (t-1)}} - E_{\text{témoin (t)}})}$$

Les valeurs corrigées de E mesurées sont ensuite exprimées en E_h .

I. 7. Analyses statistiques

Les données ont été analysées soit sur l'ensemble des 8 heures post-prandiales (C_1 , C_2 , C_3 et C_4), soit en regroupant les cinétiques en deux tranches horaires c'est-à-dire sur les 4 premières heures post-prandiales (C_1 et C_2) ou sur les 4 suivantes (C_3 et C_4). Les effets de la souche de levure et de la dose ont été testés sur :

- le E_h initial (T_0) dans le but d'observer avant injection de H_2O_2 , les modifications éventuelles provoquées par la présence des levures dans la ration (effet souche et dose).
- les pentes des courbes modélisées à partir des valeurs du E_h enregistrées pendant les 30 premières minutes (du pic jusqu'à T_{30}) et en utilisant les valeurs de E_h à T_0 comme covariable. Pour cela, une transformation en une fonction puissance selon l'équation $y = ax^b$ a due être réalisée puis une linéarisation en $\ln y = b \ln x + \ln a$, où b représente la pente de la courbe *i.e.* la vitesse de disparition de l' H_2O_2 dans le milieu et $\ln a$ représente l'ordonnée y . Les données sont converties (+ 250 mV) pour être exprimées en logarithme népérien à l'aide du tableur Excel (Microsoft Office, 2003).
- le E_h final : la moyenne (\bar{x}) des trois dernières mesures à T_{80} , T_{85} et T_{90} , afin de tenir compte des variations à la fin de chaque cinétique de 90 min.

Pour chaque souche et dose de levure, les valeurs initiales de E_h à T_0 et les moyennes sont traitées par analyse de variance univariée (SPSS Version 13.0 pour Windows, SPSS Inc., IL, USA). Le test de Tukey a été choisi pour les comparaisons multiples. Les pentes des courbes modélisées ont été ajustées par la fonction de covariance pour lisser l'effet du E_h à T_0 et comparées entre elles par le Least Square Difference (LSD) en comparaisons par paires par le même logiciel.

Le modèle statistique est le suivant :

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + S_j + V_k + R_l + (D \times S)_{ij} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = variable étudiée ; μ = moyenne de la population ; D_i = effet fixé de la dose ; S_j = effet fixé de la souche ; V_k = effet aléatoire de la vache ; R_l = effet fixé de la répétition des cinétiques ; $(D \times S)_{ij}$ = interaction entre la dose et la souche ; e_{ijkl} = erreur résiduelle. Seules les différences déclarées significatives à $P < 0,05$ sont rapportées.

II. RÉSULTATS

Dans un premier temps, nous présentons les résultats relatifs aux variations des valeurs du E_h lors d'un apport d' O_2 dans le jus de rumen d'abord sans levure puis avec la levure Sc 47 (souche **B**) apportée à deux doses différentes. Ensuite, nous présentons les résultats obtenus lors d'une comparaison entre 7 différentes souches de levures et un témoin sans levure, analysés à partir des valeurs initiales et finales de E_h et de la pente de rétablissement du E_h . Toutes les courbes d'évolutions du E_h sont présentées en Annexe 3.

II. 1. Effet de l'oxygène sur l'évolution du E_h du jus de rumen

Avec le régime témoin sans levure, les résultats moyens de l'ensemble des cinétiques (4×3), montrent que l'apport de peroxyde d'hydrogène provoque une remontée du E_h et donc une diminution de pouvoir réducteur du milieu ruminal. Après l'injection

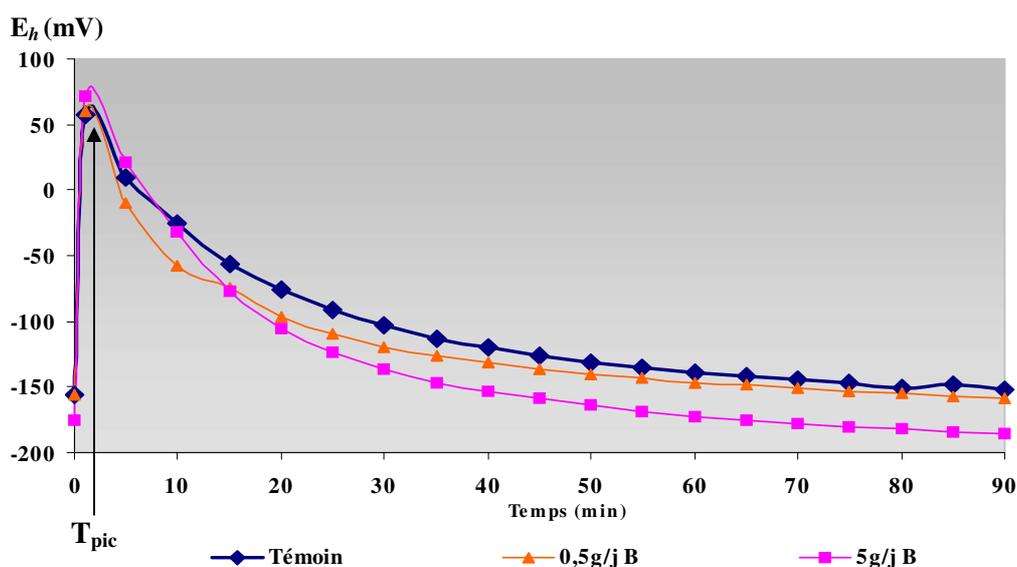


Fig. 32. Evolution du E_h ruminal en présence ou non de la levure Sc 47 suite à un apport d' O_2

d'H₂O₂, une rapide augmentation du potentiel redox est observée, de l'ordre de +200 mV par rapport à la valeur initiale, pour atteindre au pic une valeur relative de + 60 mV (Figure 32).

Après le pic, le E_h diminue progressivement, avec une baisse rapide pendant les 30 premières minutes (-5,3 mV/min) pour atteindre une valeur de E_h d'environ de -100 mV et après une heure, elle diminue lentement et le E_h tend vers sa valeur de départ.

II. 2. Effet de la levure Sc 47 (souche B) sur le E_h du jus de rumen soumis à un apport d'oxygène

L'effet d'un apport d'O₂ a été expérimenté sur la phase liquide ruminale en présence de deux doses de la souche **B** (0,5 et 5g/j) incorporées successivement dans le régime alimentaire des animaux. En prenant en compte l'ensemble des cinétiques C₁, C₂, C₃ et C₄ réalisées sur la période de mesure, avec la dose de 0,5g, la valeur initiale du E_h est de -155,6 mV et ne montre aucune différence significative par rapport au régime **T**. Après l'injection d'H₂O₂ dans la cellule de mesure, un pic identique et une évolution de la cinétique quasi similaire au témoin sont observés. Comme pour le régime **T**, le régime supplémenté avec 0,5g de **B** montre une diminution du E_h plus rapide pendant la première demi heure avec une vitesse moyenne d'environ - 6 mV/min. Le E_h atteint sa valeur initiale à T₈₀ et finalement une valeur de -158 mV après les 90 min. Aucune différence significative n'est mise en évidence par rapport au témoin.

Avec la dose de 5g de **B**, le E_h à T₀ est inférieur de -11 mV à celui du régime témoin. Après l'injection d'H₂O₂ dans la cellule de mesure, un pic identique à celui du régime **T** et la dose de 0,5g **B**, est observé. La courbe de E_h évolue respectivement à partir de T₁₀ et T₁₅ en dessous de la courbe témoin et 0,5g **B**. Par rapport à ces deux traitements, la dose de 5g/j de la souche **B** entraîne une diminution moyenne plus rapide pendant les 30 premières minutes (- 7 mV/min). Le E_h atteint sa valeur initiale plus rapidement à 65 min après l'injection d' H₂O₂ pour encore diminuer vers une valeur finale de - 186 mV à T₉₀.

II. 3. Effet de différentes souches et de deux doses de levures sur le potentiel redox initial

La valeur à T₀ est donnée par la mesure du potentiel redox avant l'injection d'H₂O₂ qui s'effectue dans la cellule de mesure. Cette valeur traduit le caractère du milieu en

Tableau 12. Effet de la souche et de la dose de levure sur le potentiel redox initial, sur l'ensemble de la période post prandiale.

	E_h à T_0								ESM _{γ}	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S ^k	Cinétique
0,5g par jour	-164,3 ^{ab}	-151,5 ^{by}	-163,1 ^{ab}	-161,6 ^{ab}	-168,8 ^{ab}	-149,6 ^b	-179,3 ^{1x}	-	4,7	< 0,05	< 0,05
5g par jour	-164,3 ^{ab}	-175,3 ^{ax}	-163,4 ^{ab}	-163,3 ^{ab}	-160,8 ^{ab}	-148,5 ^b	-153,8 ^{aby}	-168,0 ^{ab}	5,5		

Tableau 13. Effet de la souche et de la dose de levure sur le potentiel redox initial, sur les quatre premières heures post prandiales.

	E_h à T_0								ESM	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S	Cinétique
0,5g par jour	-162,3 ^a	-157,7 ^{ab}	-149,8 ^{ab}	-160,7 ^{ab}	-160,5 ^{ab}	-137,8 ^b	-167,7 ^{ax}	-	5,6	< 0,05	> 0,05
5g par jour	-162,3	-161,5	-155,2	-149,2	-151,7	-141,6	-148,5 ^y	-162,2	8,8		

Tableau 14. Effet de la souche et de la dose de levure sur le potentiel redox initial, sur les quatre dernières heures post prandiales.

	E_h à T_0								ESM	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S	Cinétique
0,5g par jour	-166,2 ^{bc}	-145,3 ^{cy}	-176,3 ^{ab}	-162,5 ^{bc}	-177,0 ^{ab}	-161,3 ^{bc}	-191,0 ^{ay}	-	7,8	< 0,05	> 0,05
5g par jour	-166,2 ^{ab}	-189,0 ^{ax}	-171,7 ^{ab}	-177,3 ^{ab}	-170,0 ^{ab}	-155,3 ^b	-159,2 ^{bx}	-173,8 ^{ab}	8,0		

^k Interaction entre la dose apportée et la souche utilisée

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles (P>0,05)

^{x,y} Les valeurs moyennes sur une même colonne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles (P>0,05)

^{γ} ESM : erreur standard à la moyenne

présence ou en absence de levures et permet d'évaluer les effets probables des différentes souches de levures utilisées ainsi que la dose administrée.

En considérant l'ensemble de la période post-prandiale (Tableau 12), et à la dose de 0,5g/j, seule la souche **L30** entraîne, par rapport aux souches **B** et **L13**, un E_h plus faible ($P < 0,05$) : l'écart étant compris entre 28 et 30 mV. Pour la dose de 5g/j, une différence significative est observée uniquement entre les souches **B** et **L13**, cette dernière montrant un E_h plus élevé (-148,5 vs -175,3 mV). Les résultats montrent que les valeurs présentent une grande variabilité ($P < 0,05$) : de -179,3 à -151,5 mV avec la dose de 0,5g/j et de -175,3 à -148,5 mV avec une dose 10 fois plus élevée.

Sur les quatre premières heures post-prandiales (Tableau 13), un effet souche est uniquement observé pour la dose la plus faible. La souche **L13** se démarque par un E_h significativement plus élevé que celui enregistré pour la souche **L30** et le régime **T** : -137,8 vs -165 mV en moyenne. A partir de la 5^{ème} heure post-prandiale (Tableau 14), la souche **L30** provoque un E_h plus faible ($P < 0,05$) que ceux enregistrés pour **T** et les souches **B**, **YS** et **L13** : -191 vs -159 mV en moyenne. Pour une dose 10 fois plus élevée, c'est avec la souche **B** que le E_h est le plus faible ($P < 0,05$) comparativement à la souche **L13** et **L30**, soit un écart de 30 à 34 mV.

Par rapport à la dose la plus faible, sur l'ensemble de la période post-prandiale, alors que 5g de **B** entraîne une baisse significative du E_h (-23,8 mV), 5g de **L30** provoque une augmentation ($P < 0,05$) du E_h de + 25,5 mV. Pour cette dernière souche, la même observation peut être faite sur les quatre premières heures post-prandiales avec un écart relativement moins important, de l'ordre de + 19 mV. A partir de la 5^{ème} heure post-prandiale, si un apport 10 fois plus élevé de **L30** se caractérise aussi par un E_h significativement plus élevé (-159,2 vs -191 mV), 5g/j de **B** entraîne au contraire une baisse du E_h (-189 vs -145,3 mV).

II. 4. Effet de la souche et de la dose sur la vitesse de rétablissement du E_h

A la dose de 0,5g/j, et quelle que soit la plage horaire post-prandiale considérée, (Tableau 15) les valeurs des pentes pour les différentes souches de levures ne sont différentes ni entre elles, ni par rapport au témoin ($P > 0,05$). Par contre, à la dose de 5g/j, les pentes des courbes obtenues avec les souches **B** et **LC** sont significativement plus importantes que celle de **T** et de la souche **L13** sur l'ensemble de la période. Sur les 4 premières heures post-prandiales (Tableau 16), seules les souches **B** et **LC** se caractérisent

Tableau 15. Effet de la souche et de la dose de levure sur la vitesse de rétablissement* du E_h après injection d'eau oxygénée, sur l'ensemble de la période post prandiale.

	Pente de la courbe								ESM r	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S ^k	Cinétique
0,5g par jour^l	-0,242	-0,193 ^y	-0,250 ^y	-0,264	-0,281	-0,254 ^x	-0,290	-	0,024	< 0,05	< 0,05
5g par jour²	-0,242 ^b	-0,295 ^{ax}	-0,303 ^{ax}	-0,262 ^{ab}	-0,270 ^{ab}	-0,225 ^{by}	-0,285 ^{ab}	-0,262 ^{ab}	0,017		

^{1,2} Les covariables apparaissant dans le modèle sont évaluées respectivement pour les valeurs de E_h à T_0 de -162,6 et de -161,3 mV.

Tableau 16. Effet de la souche et de la dose de levure sur la vitesse de rétablissement* du E_h après injection d'eau oxygénée, sur les quatre premières heures post prandiales.

	Pente de la courbe								ESM	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S	Cinétique
0,5g par jour³	-0,228	-0,185 ^y	-0,274 ^y	-0,253 ^y	-0,284	-0,295 ^x	-0,286	-	0,034	< 0,05	> 0,05
5g par jour⁴	-0,228 ^b	-0,334 ^{ax}	-0,316 ^{ax}	-0,277 ^{abx}	-0,283 ^{ab}	-0,250 ^{aby}	-0,282 ^{ab}	-0,282 ^{ab}	0,020		

^{3,4} Les covariables apparaissant dans le modèle sont évaluées respectivement pour les valeurs de E_h à T_0 de -156,6 et de -153,4 mV.

Tableau 17. Effet de la souche et de la dose de levure sur la vitesse de rétablissement* du E_h après injection d'eau oxygénée, sur les quatre dernières heures post prandiales.

	Pente de la courbe								ESM	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S	Cinétique
0,5g par jour⁵	-0,253	-0,215	-0,225 ^y	-0,276 ^x	-0,269	-0,232 ^x	-0,270	-	0,035	< 0,05	> 0,05
5g par jour⁶	-0,253	-0,254	-0,290 ^x	-0,248 ^y	-0,258	-0,203 ^y	-0,290	-0,241	0,026		

^{5,6} Les covariables apparaissant dans le modèle sont évaluées respectivement pour les valeurs de E_h à T_0 de -168,5 et de -170,3 mV.

* Calculée sur 30 min après l'obtention du pic de E_h

^k Interaction entre la dose apportée et la souche utilisée

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

^{x,y} Les valeurs moyennes sur une même colonne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

^r ESM : erreur standard à la moyenne

par une pente plus forte comparativement au témoin : $-0,325$ en moyenne *vs* $-0,228$. Aucune différence n'apparaît entre les traitements ($P > 0,05$), au cours des 4 heures post prandiales suivantes (Tableau 17). Un effet dose est uniquement observé pour les souches **B**, **LC**, **YS** et **L13**. Les pentes des courbes obtenues avec les traitements **B** et **LC** sont plus importantes ($P < 0,05$) avec un apport de 5g/j de levures comparativement à une dose quotidienne de 0,5g, quelle que soit la plage horaire post-prandiale considérée. L'inverse est observé pour la souche **L13**. La pente de la courbe obtenue avec le traitement **YS** est significativement plus forte sur les 4 premières heures post-prandiales et elle est plus faible sur les 4 dernières heures.

II. 5. Effet de la souche et de la dose sur le potentiel redox final

La valeur du E_h final représente la moyenne calculée à partir des 3 dernières mesures effectuées à T_{80} , T_{85} et T_{90} . Cette valeur traduit le caractère du milieu en présence ou en absence de levures et permet d'évaluer les effets éventuels, en fin de cinétique, des différentes souches de levures utilisées ainsi que de la dose administrée.

Sur l'ensemble de la période (Tableau 18), comme au cours des 4 premières heures post-prandiales, à la dose de 0,5g/j (Tableau 19), seul le traitement **L30** conduit, à un E_h plus faible ($P < 0,05$) par rapport aux traitements **T**, **B**, **L13** et **YS**, avec un écart moyenne de -30 à -35 mV. Pour une dose supérieure de levure, une différence significative est observée uniquement entre le traitement **B** et les traitements **T** et **L13**, ces derniers se caractérisant par des valeurs de E_h plus élevées de -28 à -29 mV. Les résultats montrent que les valeurs présentent une grande variabilité ($P < 0,05$) : de $-183,5$ à $-137,3$ mV avec la dose de 0,5g/j et de $-184,0$ à $-153,9$ mV avec une dose 10 fois plus élevée. A partir de la 5^{ème} heure post-prandiale (Tableau 20), les traitements **BT** et **L30** à 0,5g/j conduisent à un E_h plus faible ($P < 0,05$) que ceux enregistrés pour les souches **B** et **YS** : en moyenne -184 *vs* -138 mV. Pour une dose de 5g/j, le traitement **B** se caractérise par un E_h final plus faible ($P < 0,05$) que ceux enregistrés avec les traitements **T**, **L13** et **L30**.

Quelle que soit la plage de la période postprandiale considérée, le E_h final est significativement plus faible (de -34 à -59 mV) avec un apport de **B** à la dose de 5g qu'à la dose de 0,5g. L'apport de 5g/j de **YS** se caractérise aussi par un E_h significativement plus bas ($-171,0$ mV) qu'avec une dose 10 fois moins élevée ($-147,7$ mV), mais seulement à partir de la 5^{ème} heure post-prandiale. Par contre, le E_h final est plus élevé (de 24 mV en

Tableau 18. Effet de la souche et de la dose de levure sur la moyenne de E_h (\bar{x}), sur l'ensemble de la période post prandiale.

	moyenne de T_{80} , T_{85} et T_{90} (\bar{x})								ESM r	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S ^k	Cinétique
0,5g par jour	- 156,2 ^{bcd}	- 137,3 ^{dy}	- 164,8 ^{ac}	- 147,7 ^{cd}	- 175,4 ^{ab}	- 155,1 ^{bcd}	- 183,5 ^{ax}	-	6,5	< 0,05	< 0,05
5g par jour	- 156,2 ^b	- 184,0 ^{ax}	- 169,0 ^{ab}	- 165,8 ^{ab}	- 164,1 ^{ab}	- 153,9 ^b	- 158,3 ^{aby}	-171,5 ^{ab}	5,9	< 0,05	< 0,05

Tableau 19. Effet de la souche et de la dose de levure sur la moyenne de E_h (\bar{x}), sur les quatre premières heures post prandiales.

	moyenne de T_{80} , T_{85} et T_{90} (\bar{x})								ESM	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S	Cinétique
0,5g par jour	- 150,6 ^b	- 146,8 ^{by}	- 158,2 ^{ab}	- 147,7 ^b	- 170,4 ^{ab}	- 147,4 ^b	- 178,2 ^{ax}	-	8,5	< 0,05	> 0,05
5g par jour	- 150,6 ^b	- 181,0 ^{ax}	- 163,7 ^{ab}	- 160,6 ^{ab}	- 160,7 ^{ab}	- 152,7 ^b	- 154,9 ^{by}	- 170,1 ^{ab}	9,0	< 0,05	> 0,05

Tableau 20. Effet de la souche et de la dose de levure sur la moyenne de E_h (\bar{x}), sur les quatre dernières heures post prandiales.

	moyenne de T_{80} , T_{85} et T_{90} (\bar{x})								ESM	Signification (P)	
	T	B	LC	YS	BT	L13	L30	L11		D × S	Cinétique
0,5g par jour	- 161,8 ^{ab}	- 127,7 ^{by}	- 171,3 ^{ab}	- 147,7 ^{bx}	- 180,4 ^a	- 162,8 ^{ab}	- 188,8 ^a	-	10,1	< 0,05	> 0,05
5g par jour	- 161,8 ^b	- 187,0 ^{ax}	- 174,3 ^{ab}	- 171,0 ^{aby}	- 167,6 ^{ab}	- 155,2 ^b	- 161,8 ^b	- 172,8 ^{ab}	8,7	< 0,05	> 0,05

^k Interaction entre la dose apportée et la souche utilisée

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

^{x,y} Les valeurs moyennes sur une même colonne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

^r ESM : erreur standard à la moyenne

moyenne) avec le traitement **L30** sur l'ensemble de la période comme sur les 4 premières heures post-prandiales.

III. DISCUSSION

Les résultats de cette étude illustrent les effets sur le potentiel redox d'un apport d' H_2O_2 dans le contenu ruminal. Nous avons choisi le peroxyde d'hydrogène comme source d'oxygène parce qu'il a déjà été utilisé avec le même objectif par Broberg (1957d) et aussi en raison de la difficulté technique à utiliser l' O_2 sous sa forme gazeuse. Sous forme gazeuse l'oxygène est très peu soluble à 39 °C (Power and Stegall, 1970 ; Morris, 1976) et son mélange homogène avec la phase liquide est difficile à obtenir. En insufflant directement de l'air dans le rumen, Broberg (1957a) n'a d'ailleurs détecté aucun effet sur le E_h . La solution de H_2O_2 est supposée libérer instantanément une quantité donnée d'oxygène (Wardle and Renninger, 1975) diffusée de façon homogène dans le milieu. Toutefois en présence de Fe^{++} , le H_2O_2 , serait pourtant susceptible (Réaction de Fenton controversée pour les milieux biologiques) de libérer des anions superoxydes ($^{\circ}OH$) modifiant le déroulement de certaines réactions d'oxydo-réduction. L'effet observé de cet apport de H_2O_2 sur la flore ruminale est pour ces différentes raisons assez difficile à interpréter.

III. 1. Effet d'un apport d'oxygène sur la flore ruminale

Le contenu du rumen est réducteur et anaérobie. L'apport théorique de 4,8 ml d' O_2 /L de contenu, sous forme de peroxyde d'hydrogène, en modifie profondément les caractéristiques physico-chimiques comme le prouve la cinétique du E_h enregistrée pendant les 90 minutes qui suivent cet apport.

Le E_h initial du jus de rumen témoin a une valeur proche de -160 mV. Il est caractéristique d'un rumen de vache tarie recevant une ration riche en GRF. La pression partielle calculée de l' O_2 , exprimée en log de PO_2 est voisine de - 66. Ce qui signifie comme nous l'avons déjà rappelé que l'absence d' O_2 est totale. En conséquence, il était pour nous, légitime d'attendre une remontée brutale du E_h suite à l'apport d'une quantité considérable d' O_2 au regard du caractère particulièrement réducteur du milieu. Au lieu d'une remontée instantanée et brutale du E_h , c'est une progression relativement lente qui est observée puisque le pic n'est atteint qu'après une minute suivant l'injection et tout se

passé comme si l'oxygène apporté était soustrait en grande partie aux réactions d'oxydoréduction attendues. Nous ne sommes en mesure d'expliquer ni les raisons qui limitent la remontée du E_h , ni les modalités de cette phase ascendante qui s'avère moins marquée que celle attendue. Lorsque le E_h s'arrête de croître à + 60 mV, le calcul par la relation de Nernst de la pression partielle de l' O_2 montre que la quasi-totalité de l' O_2 injecté a disparu. L'hypothèse qui nous semble la plus probable est une réduction en eau par les ions H^+ normalement présents dans ce milieu.

Contrairement à la phase ascendante de la cinétique qui compte tenu de sa courte durée ne semble pas être dépendante d'une activité microbienne particulière, la phase de décroissance qui suit et au cours de laquelle le E_h reprend sa valeur initiale, est lente et progressive. Son allure de type exponentielle inverse suggère, par sa similitude avec la courbe de disparition d'un substrat, l'intervention d'une activité fermentaire (Chiaramonti *et al.*, 1997). Elle signifierait donc que la microflore du rumen n'est pas totalement inhibée ou détruite par un apport d' H_2O_2 équivalant à 4,8 ml/L d' O_2 . Selon Morris (1976) et Onderdonk *et al.* (1976), l' O_2 est toxique pour les bactéries anaérobies strictes, pourtant l'activité fermentaire qui rabaisse le E_h à son niveau initial ne peut être que le résultat de l'activité de la biocénose anaérobie du contenu ruminal. En l'absence d'apport exogène de substance réductrice, cette activité semble être la seule responsable du renforcement du pouvoir réducteur et elle est capable de recréer à l'identique le caractère anaérobie du milieu. Certains auteurs (Lloyd *et al.*, 1982) expliquent ce phénomène par une utilisation de l' O_2 par la microflore ruminale, d'autres (Ellis *et al.*, 1991) l'attribuent clairement et spécifiquement à une consommation de l' O_2 par les bactéries et les protozoaires ruminants qui sont plus ou moins tolérants à la présence de l' O_2 . Cette capacité qu'a la flore ruminale à abaisser le E_h après un apport d' O_2 , nous incite à attribuer une grande part de ce pouvoir réducteur aux bactéries anaérobies dominantes du milieu que sont les amylolytiques.

III. 2. Effet de la levure probiotique sur le E_h ruminal lors d'un apport d' O_2

La présence de levure probiotique dans une ration riche en GRF chez la vache tarie permet avant tout de maintenir un E_h à un niveau plus bas que n'ait capable de le faire la flore dominante spécifique de cette ration sans levure. Les résultats sur le E_h initial montrent que les souches **B** et **L30** ont la capacité de favoriser le caractère réducteur et l'anaérobiose du milieu. Les caractéristiques métaboliques propres à différentes souches de levures peuvent influencer les fermentations dans le rumen (Newbold *et al.*, 1995). Avec

l'apport d'O₂, nous montrons que parmi les 7 souches utilisées, seules quelques souches se distinguent en augmentant le caractère réducteur du milieu, notamment la souche **L30** à 0,5g par jour et la souche **B** à 5g par jour alors que cette même souche apportée à 0,5g/j ne montre aucun effet. L'effet souche et l'effet dose observés dans cet essai confirment les observations de Kutasi *et al.* (2004) qui par des tests *in vitro*, montrent que l'utilisation de l'O₂ serait étroitement liée à l'activité de la souche commerciale **B**, mais qu'elle est aussi corrélée à la quantité de levures apportées, exprimée en UFC.

L'apport d'oxygène dans le contenu ruminal en présence de levure s'accompagne d'une redescente plus rapide du E_h que chez le témoin sans levure. Cette observation en accord avec les résultats de Brydl *et al.* (1994), tend à montrer la capacité de levure à détoxifier le milieu. En considérant que la hauteur du pic dépend de la quantité d'oxygène injectée et du niveau de E_h initial, la vitesse de redescente du E_h exprimée par la pente, montre que les souches **B** et **LC** à la dose unique de 5g/j peuvent rétablir le niveau réducteur du milieu plus rapidement pendant les 30 premières minutes après injection de H₂O₂. L'effet précédemment observé sur le E_h initial avec la souche **L30**, n'est pas confirmé par la pente. Ceci peut être lié au fait que la modélisation des données avec le E_h à T₀ comme covariable, supprime l'effet levure qui abaisse comme nous l'avons montré le E_h initial. Ainsi l'utilisation de la covariable supprime l'effet qui est spécifique de la levure, celui qui justifie son utilisation en élevage. Par contre, les souches **L30** à 0,5g et **B** à 5g par jour se démarquent significativement des autres souches et du témoin car elles atteignent plus rapidement leurs valeurs de départ et elles procurent au milieu ruminal un caractère plus réducteur à celui avant l'introduction de l'O₂.

IV. CONCLUSION

L'adaptation de la méthode *ex vivo* a permis de mesurer l'effet d'un apport d'H₂O₂ dans le milieu ruminal sur l'évolution du potentiel redox. La flore anaérobie par son activité fermentaire a la capacité de rétablir progressivement le E_h du contenu ruminal qui a été augmenté par l'apport d'oxygène. L'effet de la levure probiotique est complémentaire de celui de la flore ; elle en renforce le caractère réducteur. L'effet levure varie selon la souche et la dose et d'après l'ensemble des résultats, les souches **L30** et **B** apportées aux doses respectives de 0,5g et 5g quotidiennement ont des effets significatifs.

4^{ème} PARTIE

MODÈLE “VACHE EN LACTATION”

Chapitre 1

**Effet de deux niveaux d'apport
de la levure *S. cerevisiae* Sc 47
chez la vache en production**

Chez la femelle laitière, au cours des semaines qui suivent la mise-bas, les besoins nutritionnels augmentent proportionnellement à la quantité de lait produite. Le début de la lactation se caractérise par un accroissement important des quantités ingérées par l'animal mais qui se révèle généralement insuffisant pour couvrir la totalité des besoins lorsque le potentiel de production est élevé (Journet and Rémond, 1976). Pourtant, si le besoin énergétique n'est pas entièrement satisfait, l'animal après avoir puisé dans ses réserves lipidiques, réagit en produisant moins de lait. Afin d'optimiser la production, des régimes plus concentrés sont utilisés où l'incorporation des céréales, vise essentiellement à combler ce déficit. L'augmentation du niveau énergétique des rations qui stimule l'ingestion mais s'accompagne d'une plus grande vitesse de transit des digesta, réduit la digestibilité de la partie fibreuse de la ration et contribue ainsi au déficit énergétique de l'animal (Dulphy and Faverdin, 1987). En outre avec les régimes concentrés, le rumen de ces animaux doit traiter des quantités plus importantes de matières rapidement fermentescibles provoquant des désordres fermentaires souvent à l'origine de l'acidose ruminale (Peyraud and Apper-Bossard, 2006). Pour éviter ces troubles digestifs, la levure probiotique a été préconisée (Williams *et al.*, 1991) et notamment pendant les périodes de stress (Wohlt *et al.*, 1998).

Dans un premier temps, nous avons pu montrer qu'un apport quotidien de 4g de levure Sc 47 chez la vache tarie consommant un régime enrichi en GRF mais ingéré en quantité limitée, était en mesure d'éviter la baisse du pH ruminal déterminante de l'acidose. En élevage laitier, une acidose ainsi induite n'est pas courante chez ces animaux à faibles besoins dont le régime habituel est majoritairement fibreux. A l'opposé, chez la vache à haut niveau de production en début de lactation, la production qui s'installe, génère un besoin énergétique grandissant. Il implique naturellement de fournir un régime enrichi en GRF susceptible d'être ingéré en plus grande quantité. Dans ces conditions, l'acidose n'a plus besoin d'être induite volontairement, elle l'est naturellement si des précautions particulières ne sont pas prises.

Entre le modèle "vache tarie" et le modèle "vache en lactation", des différences profondes apparaissent dans la fonction d'alimentation qui découlent d'une consommation de MS de 3 à 4 fois plus grandes chez la vache en production que pendant son tarissement. Cette différence de quantité de MS ingérée peut avoir une répercussion sur les paramètres physico-chimiques du rumen que nous nous proposons de vérifier en même temps que l'effet levure.

La levure ne se multiplie pas dans le rumen (Newbold *et al.*, 1989). En fait, comme la levure probiotique est une levure vivante pourvue de son métabolisme propre, il paraît donc préférable de dire que son rythme de croissance est inférieur à son rythme de disparition (par lyse et fuite avec les digesta). Il est donc nécessaire d'apporter une dose appropriée quotidiennement. Les produits commercialisés, à base de levures revivifiables ont un statut d'additif alimentaire ; il n'en reste pas moins qu'ils ne sont pas caractérisés par la même concentration en cellules revivifiables par unité de poids (UFC/g). Malgré cela, les doses préconisées ont pendant longtemps été exprimées en grammes de produit alors qu'il serait plus judicieux d'exprimer la dose recommandée en UFC.

Paradoxalement si l'effet dose (exprimé en gramme ou en UFC) a sans doute fait l'objet de nombreux essais par les firmes commercialisant les levures probiotiques, peu de résultats ont été publiés. Wohlt *et al.* (1991) montrent que l'addition de 10 ou 20g d'une levure probiotique dans la ration des vaches laitières en début de lactation augmente la quantité de MS ingérée ainsi que la production de lait sans mettre très clairement en évidence un effet dose. Kung *et al.* (1997) ont testé deux niveaux d'apports de la même souche sur des vaches en lactation mais, compte tenu des caractéristiques de la ration (apport de 210 g de bicarbonate de sodium par vache et par jour), aucune des deux doses n'a eu d'effet. L'utilisation de la levure probiotique a prouvé son efficacité en atténuant la baisse du pH ruminal mais d'après la littérature la quantité apportée est très variable ne permettant pas ainsi de comparaison cohérente entre les essais (Chaucheyras *et al.*, 1997).

L'objectif de cette recherche est de transposer les travaux conduits sur le modèle "vache tarie" à des vaches en production pour vérifier la capacité de la levure à stabiliser le pH et à abaisser le potentiel redox du rumen malgré un niveau d'ingestion élevé favorisant naturellement un état d'acidotique. L'objectif est aussi de tester deux doses de levure, dans un rapport d'une unité log en nombre d'UFC ; une dose de 0,5g apportant quotidiennement 5×10^9 UFC et une dose de 5g équivalente à 5×10^{10} UFC (dose commerciale), pour tenter d'approcher la dose optimale de BIOSAF® susceptible d'apporter le meilleur compromis entre efficacité et coût.

I. DÉROULEMENT DE L'ESSAI

I. 1. Animaux

Les animaux utilisés sont des vaches laitières de la race Prim'Holstein équipées d'une canule ruminale. Elles sont maintenues en box individuel sur tapis matelassé. Elles sont en début lactation (40 jours après vêlage) et sont traitées individuellement deux fois par jour à 8h et 16h. Elles produisent en moyenne 33 ± 2 kg de lait par vache et par jour.

I. 2. Régimes

Un régime complet et mélangé VL 1 est distribué en deux repas par jour (à 9h et 17h) et les quantités allouées sont ajustées à la capacité d'ingestion moyenne des vaches qui est 21 kg MS/j. Le régime, dont la BACA¹ calculée avoisine 200 mEq/kg MS, est constitué de 61% de EMPE²; 8% de luzerne déshydratée (Rumiluz[®]) ; 30% de concentrés et 1% de minéraux (Tableau 6). Il représente sous cette composition le régime témoin (**T**) qui est formulé pour satisfaire les besoins d'entretien et de production des animaux mais aussi pour induire une acidose latente. Deux régimes expérimentaux sont formulés. Ils sont composés du régime **T**, supplémenté par 0,5g (régime **0,5B**) ou 5g (régime **5B**) de la levure BIOSAF[®] à 10^{10} UFC/g.

I. 3. Plan expérimental et analyse statistique

Les animaux sont disposés en carré Latin 3×3 et reçoivent alternativement les régimes Témoin et expérimentaux pendant 3 périodes consécutives. Initialement, la recherche était prévue sur un dispositif expérimental 4×4 qui permettait de comparer 3 doses et un témoin. Malheureusement, une des quatre vaches préparées à cette intention a développé une mammite clinique qui nous a contraint à un dispositif 3×3 statistiquement moins puissant. Chaque période consiste en 14 jours d'adaptation au régime, 4 jours de mesures (pH et E_h) et 3 jours de désadaptation au régime. Les mesures sont effectuées avant (T_{-1}), pendant (T_0) et après (T_1 à T_8) le repas. Les échantillons de contenu ruminal sont prélevés de façon concomitante avec les mesures de pH et E_h pour le dosage des AGV, de l'acide lactique et de l'ammoniac.

¹ Bilan Alimentaire Cations Anions

² Ensilage de maïs plante entière

Les résultats sont traités par le General Linear Model (SPSS Version 13.0 pour Windows, SPSS Inc., IL, USA) en mesures répétées qui tient compte de la non-indépendance des mesures entre les temps de prélèvements. Le modèle statistique est comme suit :

$$Y_{ijkl} \text{ pour les heures de mesures} = \mu + T_i + V_j + P_k + Ts_l + (T \times Ts)_{il} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = variable étudiée ; μ = moyenne de la population ; T_i = effet fixé du traitement ; V_j = effet aléatoire de la vache ; P_k = effet fixé de la période ; Ts_l = effet du temps de mesure ; $(T \times Ts)_{il}$ = interaction entre le traitement et le temps de mesure ; e_{ijkl} = erreur résiduelle aléatoire. Seules les différences déclarées significatives à $P < 0,05$ sont rapportées.

II. RÉSULTATS

Les résultats obtenus dans cet essai mettent en évidence les évolutions des paramètres physico-chimiques pH, E_h et $\log PO_2$ ainsi que les variations des paramètres fermentaires que sont les AGV, le lactate et l'ammoniaque. Les modifications apportées au milieu ruminal par les deux niveaux d'apport de levures sont aussi rapportées.

II. 1. Effet sur le pH ruminal

Pour le régime **T**, la plage de variation du pH est de 6,29 à 5,38 ($\bar{x} = 5,81$) ; la valeur la plus élevée se situant au moment du repas (Figure 33).

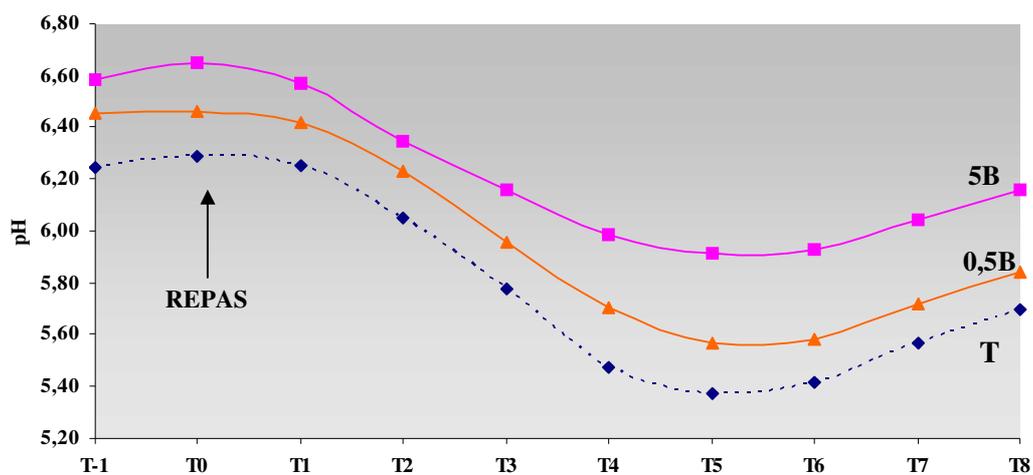


Fig. 33. Evolution du pH ruminal chez la vache en lactation (effet dose)

Le pH ruminal entame une baisse vers sa valeur minimale à T₅ (5^{ème} heure post-prandiale) à une vitesse moyenne de 0,18 unité par heure pour ensuite remonter vers un pH de 5,70 avant le 2^{ème} repas. Avec les régimes supplémentés en levure, les valeurs du pH ruminal se trouvent entre 6,46 et 5,57 (\bar{x} = 5,99) pour le régime **0,5B** et de 6,65 à 5,91 (\bar{x} = 6,23) pour le régime **5B**. Les deux courbes se placent au dessus de la courbe témoin avec une valeur de pH de départ déjà plus élevée pour le régime **5B**. Les valeurs de pH diminuent dès la 2^{ème} heure après la distribution du repas et sont à leur point le plus bas à T₅.

Pour le régime **0,5B**, ces valeurs diminuent à une vitesse identique au témoin alors qu'avec le régime **5B**, la vitesse de la chute du pH est moindre (0,15 unité par heure). Ensuite, elles remontent vers des valeurs plus élevées avec une augmentation plus rapide pour le régime **5B**.

Tableau 21 : Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur le pH ruminal

	Traitements				P		
	T	0,5B	5B	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
pH	5,81 ^a	5,99 ^b	6,23 ^c	0,03	<0,05	<0,01	<0,05

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles (P>0,05)

ESM : erreur standard à la moyenne

Des différences significatives (P<0,05) de +0,18 et +0,42 unités de pH sont enregistrées respectivement pour les régimes **0,5B** et **5B** en comparaison au régime **T** (Tableau 21). Les allures de courbes ne présentent aucune différence significative entre T₁ et T₄, temps à partir duquel la courbe **5B** se démarque du témoin et de **0,5B** en raison d'une interaction linéaire temps × traitement significative.

II. 2. Effet sur le E_h ruminal

Les valeurs du potentiel redox de la phase liquide ruminale varient entre – 114 et – 155 mV (\bar{x} = – 134 mV) pour le régime **T** avec une valeur nadir au cours du 1^{er} et avant le 2^{ème} repas. Durant la majeure partie de la cinétique, le E_h se situe à des valeurs moins réductrices (entre T₃ et T₇). La plage des valeurs pour le régime **0,5B** est de – 133 à – 167 mV (\bar{x} = –150 mV), et pour le régime **5B**, elle est comprise entre –153 et – 207 mV (\bar{x} =

-184 mV) tout au long de la période de mesure (Figure 34). Les courbes relatives aux deux niveaux d'apport se maintiennent en dessous de la courbe témoin.

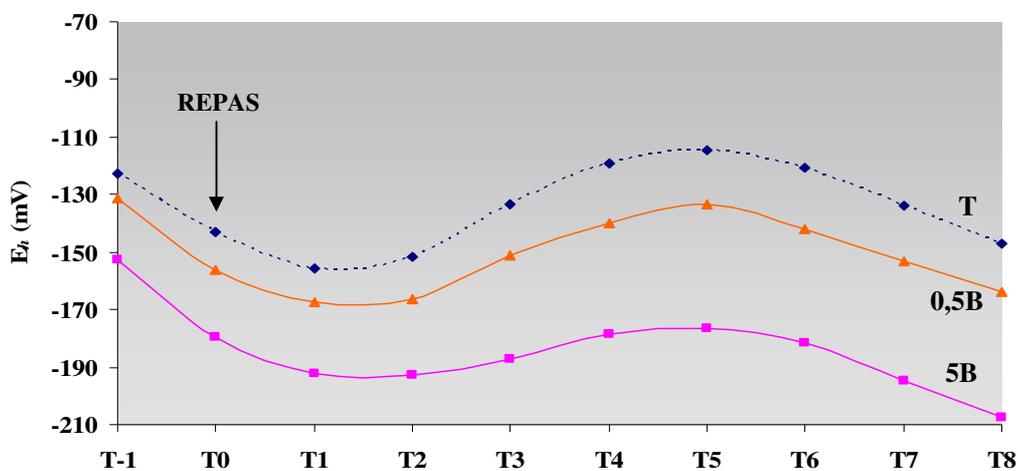


Fig. 34. Evolution du E_h ruminal chez la vache en lactation (effet dose)

Des différences hautement significatives sont observées (Tableau 22) entre les régimes **T** et **5B** (-50,1 mV), entre les régimes **0,5B** et **5B** (-33,9 mV) et entre les régimes **T** et **0,5B** (-16,2 mV). Une interaction linéaire temps \times traitement est significative au cours de période de mesure.

Tableau 22. Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur le E_h ruminal

	Traitements				P		
	T	0,5B	5B	ESM	Trait	Temps	Trait \times Temps
E_h (mV)	-134,3 ^c	-150,5 ^b	-184,4 ^a	3,22	<0,05	<0,01	<0,05

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 3. Effet sur la pression partielle en oxygène du rumen

Les valeurs de $\log PO_2$ calculées (Figure 35) se situent entre -61,6 et -65,3 ($\bar{x} = -64,0$) pour le régime **T**, entre -61,3 et -65,8 ($\bar{x} = -64,4$) pour le régime **0,5B** et entre -62,1 et -67,1 ($\bar{x} = -65,6$) pour le régime **5B**. Les valeurs du régime **5B** montre une diminution plus prononcée de la pression partielle en O_2 que les deux autres courbes.

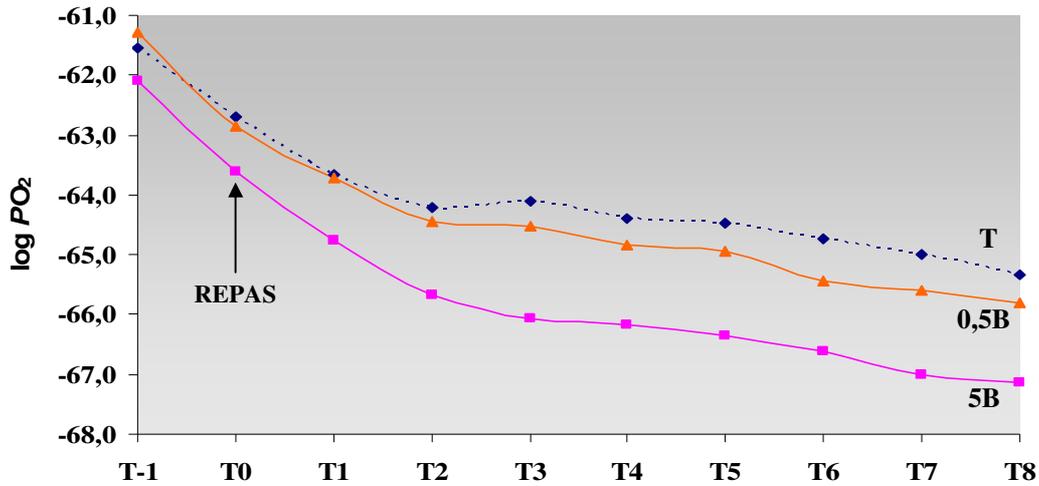


Fig. 35. Evolution du log PO_2 du rumen chez la vache en lactation (effet dose)

L'ajout de 5g de levure à la ration témoin diminue significativement ($P < 0,01$) de 1,6 unité en moyenne le log PO_2 (Tableau 23) alors que l'apport de 0,5g qui tend aussi à abaisser le log PO_2 moyen de 0,4 unité, a un effet non significatif. Une interaction linéaire temps \times traitement est significative à partir de T₂.

Tableau 23. Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur le log (PO_2)

	Traitements				P		
	T	0,5B	5B	ESM	Trait	Temps	Trait \times Temps
log (PO_2)	- 64,0 ^b	- 64,3 ^b	-65,6 ^a	0,18	<0,05	<0,01	<0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 4. Effet sur les concentrations ruminales en AGV

Au cours de la période expérimentale, les concentrations moyennes en AGV_t sont respectivement de 86,3, 87,9 et 101,7 mM pour les régimes T, 0,5B et 5B (Tableau 24). Dans la phase liquide ruminale, ces teneurs sont maximales à T₄ pour tous les régimes (101,8 mM pour T, 102,4 mM pour 0,5B et 119,7 mM pour 5B). Des différences significatives ($P < 0,05$) sont observées entre le régime 5B et le témoin (+ 15,4 mM) et entre les régimes 5B et 0,5B (+13,8 mM).

Tableau 24. Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur la teneur totale et le profil en AGV du milieu ruminal

	Traitement				P		
	T	0,5B	5B	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
AGV _t (mM)	86,3 ^a	87,9 ^a	101,7 ^b	3,88	<0,01	<0,01	>0,05
C ₂ (mM)	54,6	54,2	57,3	1,38	>0,05	<0,01	>0,05
C ₃ (mM)	18,1 ^a	20,7 ^a	29,1 ^b	1,11	<0,01	<0,01	<0,1
C ₄ (mM)	9,5 ^a	9,3 ^a	10,7 ^b	0,39	0,05	<0,01	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

L'incorporation de 0,5g de levure sur le profil des AGV ne modifie pas significativement le profil des AGV du régime T. Par contre, la dose de 5g de levure augmente de façon significative la concentration en propionate (+61%) ainsi que la teneur en butyrate (+13%) par rapport au témoin. Aucune différence significative n'a été notée sur la concentration de l'acétate. Les rapports C₂/C₃ sont respectivement de 3,0, 2,6 et 2,0 pour les régimes T, 0,5B et 5B.

II. 5. Les teneurs ruminales en lactate

La teneur en lactate total (D- et L-) est nettement supérieure à celle observée chez la vache tarie (Tableau 25).

Tableau 25. Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur la teneur en lactate

	Traitement				P		
	T	0,5B	5B	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
D-lactate (mM)	6,9 ^b	5,6 ^b	2,2 ^a	0,90	<0,05	<0,01	<0,01
L-lactate (mM)	6,3 ^c	4,0 ^b	1,8 ^a	0,96	<0,05	<0,01	>0,05
D et L lactate (mM)	13,2 ^c	9,6 ^b	4,0 ^a	0,99	<0,05	<0,01	<0,01

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

Les pics de lactate total observés se situent principalement dès la 2^{ème} heure après la distribution du repas (interaction traitement × temps de prélèvement à $P < 0,01$) avec des concentrations de 48,9 mM pour le **T**, 30,2 mM pour le régime **0,5B** et 13,9 mM pour le régime **5B**. Les teneurs moyennes en lactate sur la période de mesure sont respectivement de 4,0, 9,6 et 13,2 mM pour les régimes **5B**, **0,5B** et **T**. Ces valeurs diffèrent significativement lorsque la levure probiotique est incluse à des doses de 0,5g ou 5g par rapport au témoin. Une baisse des teneurs en lactate total de 27,3 et 69,7 % sont obtenues respectivement avec les régimes **0,5B** et **5B** par rapport au régime **T**. Cependant, pour le D-lactate, aucune différence n'est observée lorsque la dose de 0,5g est apportée.

II. 6. La concentration ruminale en ammoniac

La concentration en NH₃ dans le milieu ruminal est globalement diminuée par la supplémentation de 0,5 et 5g de levure (Tableau 26). Les écarts respectifs entre les régimes **0,5B**, **5B** et **T** sont significatifs et les différences moyennes sont de 24 et 78 mg/L. Les dosages effectués pendant la période de mesure mettent en évidence un pic de la teneur en NH₃ après 2h post-prandiales pour les trois régimes. Les régimes **T** et **0,5B** sont caractérisés par des pics de NH₃ à T₂ similaires, de l'ordre de 366,8 mg/L en moyenne, alors que pour régime **5B** est caractérisé par un pic limité à 208 mg/L.

Tableau 26. Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur la teneur ruminale en ammoniac

	Traitements			P			
	T	0,5B	5B	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
NH ₃ (mg/L)	192,2 ^c	168,5 ^b	114,2 ^a	5,23	<0,05	<0,01	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

III. DISCUSSION

Les résultats obtenus dans ce travail, renseignent sur les valeurs et les variations des paramètres physico-chimiques ruminiaux, le pH et le E_h, et sur les concentrations de certains produits terminaux de la fermentation ruminale qui leur sont associées chez la

vache en lactation. Ces résultats, qui confirment le risque d'acidose chez la vache laitière à haut niveau de production recevant une ration moyennement enrichie en GRF vont nous permettre de discuter les modifications de ces paramètres provoquées par deux niveaux d'apport de levure probiotique pour en comprendre le mode d'action.

III. 1. L'évolution des paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen.

Le modèle "vache en lactation" a permis, à la différence du modèle "vache tarie", de retenir un régime alimentaire en accord dans sa composition avec les pratiques habituelles en élevage. La richesse de ce régime en GRF associée à la grande quantité de MS volontairement ingérée a, comme attendu, provoqué une acidification du contenu ruminal amorcée au cours de la 2^{ème} heure après le repas, et non encore terminée lors de la distribution du 2^{ème} repas. Au regard de ce paramètre, les vaches recevant le régime témoin développent une acidose au sens défini par Sauvante *et al.* (2006), c'est-à-dire un pH inférieur à 6 pendant plus de 4 heures consécutives.

L'acidose ruminale que nous observons, est associée à une concentration moyenne en AGV totaux dans le rumen de 86,3 mM. Cette concentration n'est pas particulièrement élevée si on la compare aux valeurs habituellement rencontrées chez la vache laitière et qui se situent entre 90 et 110 mM (Coe *et al.*, 1999 ; Hristov *et al.*, 2001). Bien que l'acidose soit généralement attribuée et associée à une forte concentration ruminale en AGV (Burrin and Britton, 1986 ; Goad *et al.*, 1998), celle-ci est à considérer comme étant une résultante ou un équilibre entre la production et l'absorption des AGV. Quand le niveau d'ingestion s'accroît, il s'accompagne d'une augmentation de la matière organique fermentescible dans le rumen et donc d'une augmentation de la production des AGV. Des concentrations ruminales supérieures à 110 mM sont souvent enregistrées (Doreau *et al.*, 1997), mais le pH du rumen est déterminant pour l'absorption des AGV. Une tendance à l'acidification favorise la non dissociation des AGV qui facilite leur absorption alors qu'une remontée du pH favorable à leur dissociation peut ralentir leur absorption. Selon que le pH du rumen est acide ou au voisinage de la neutralité, une concentration donnée en AGV peut ne pas traduire exactement le même niveau de production.

L'état acidotique du contenu ruminal chez la vache laitière souvent associé à un régime enrichi en GRF, est caractérisé par un changement du profil des AGV qui se traduit généralement par une diminution de la proportion de C₂ et une augmentation de la

proportion de C_3 . Le ratio C_2/C_3 qui en résulte, est dans ces conditions généralement inférieur à 2,5 (Sauvant *et al.* 1999). Les concentrations en C_2 et C_3 que nous avons déterminées pour le régime témoin sont dans un rapport de 3,0 et laissent à penser que le régime proposé n'avait pas, au regard du ratio C_2/C_3 un caractère acidogène très marqué, mais il a cependant été suffisant pour abaisser le pH du milieu. Alors, si la concentration et le profil des AGV ne sont pas caractéristiques d'une situation acidotique du rumen telle que définie par les valeurs de pH que nous avons enregistrées, l'acidification doit sans doute être rapprochée de la concentration élevée en lactate.

Dans les conditions normales de la fermentation ruminale, le lactate ne s'accumule pas à des concentrations supérieures à $5\mu M$ alors que dans des cas d'acidose sévères, sa concentration peut dépasser 40 mM (Owens *et al.*, 1998). Dans les situations d'acidose latente, la teneur en acide lactique est généralement faible, souvent inférieure à 10 mM (Martin *et al.*, 2006) ce qui a conduit de nombreux auteurs à caractériser l'acidose latente comme étant une acidose non lactique (Schwartzkopf-Genswein *et al.*, 2003 ; Brossard *et al.*, 2006). La concentration de 13,2 mM de lactate trouvée ici, chez les vaches consommant le régime témoin confirme la capacité du régime proposé, pourtant proche des pratiques des éleveurs, à provoquer une acidose chronique à caractère lactique chez les vaches en production.

Les cinétiques de potentiel redox que nous avons établies traduisent les variations du pouvoir réducteur du contenu ruminal, mais nous n'avons pu trouver dans la littérature les éléments de comparaison faisant référence aux vaches en lactation et permettant d'expliquer les variations et les évolutions du potentiel redox de ce milieu anaérobie. Ces valeurs négatives du potentiel redox du contenu ruminal ne peuvent être attribuées qu'à l'activité de la flore dominante, caractéristique des rations, du fait qu'aucune substance réductrice exogène n'est introduite dans la panse. Compte tenu de la présence d'une biocénose ruminale active dans la dégradation de différents substrats, toute modification qualitative ou quantitative du régime entraîne des changements dans la micropopulation (Fonty *et al.*, 1995 ; Nocek, 1997). Ainsi avec des régimes riches en GRF on observe une prolifération des bactéries amylolytiques (*S. bovis*) dès que le pH est inférieur à 6,0. Les résultats que nous avons exposés lors de la validation des méthodes de mesures ont permis de mettre en évidence une différence entre les valeurs de E_h trouvées pour un régime fibreux et pour un régime concentré enrichi en céréales. Une ration fibreuse génère dans le

rumen un pouvoir réducteur supérieur à celui d'une ration concentrée et seule l'activité de populations microbiennes différentes peut expliquer ces niveaux réducteurs différents.

Une ration fibreuse est réputée comme étant le substrat préférentiel des bactéries cellulolytiques (Bryant, 1973). Sa fermentation ruminale génère un pH élevé et un E_h bas. Il est admis que les bactéries cellulolytiques qui sont des anaérobies strictes ont une activité qui régresse lorsque les fibres dans la ration laissent leur place aux GRF (Russell and Wilson, 1996). Une ration concentrée est réputée comme étant le substrat préférentiel des bactéries amylolytiques. Sa fermentation génère un pH bas et un E_h élevé. Il nous paraît légitime de dire que la nature de la ration est déterminante de la flore ruminale dominante, elle-même déterminante du niveau de potentiel redox du milieu. Alors, les bactéries cellulolytiques, anaérobies strictes par excellence, favorisées par une ration fibreuse (Hungate, 1950), abaisseraient par leur propre métabolisme le E_h du milieu qui leur est ainsi d'autant mieux adapté. A l'opposé, une ration riche en amidon favorable à l'activité des bactéries amylolytiques considérées comme des anaérobies moins exigeantes sur le degré d'anaérobiose que les cellulolytiques (Hungate, 1966) abaisserait dans une moindre mesure le E_h du milieu qui deviendrait ainsi moins favorable aux anaérobies strictes (bactéries cellulolytiques et utilisatrices de lactate). Cette différence métabolique entre cellulolytiques et amylolytiques qui à notre connaissance n'a jamais été signalée pourrait traduire une capacité différente des deux populations à échanger des électrons avec des accepteurs faibles. Les méthanogènes notamment, échangent des électrons avec le CO_2 qui est alors réduit en méthane (Weimer, 1998).

Les vaches en lactation soumises à une ration riche en GRF et ingérée à hauteur de 21 kg MS/v/j, développent une acidose lactique chronique. Cette dernière, caractérisée par une baisse marquée du pH ruminal, est attribuée à la concentration élevée en acide lactique plutôt qu'aux teneurs en AGV. L'activité d'une flore amylolytique à l'origine de cet état d'acidose est augmentée et provoque ainsi un milieu ruminal moins réducteur, défavorable aux bactéries anaérobies strictes.

III. 2. Effet de la levure probiotique sur les paramètres ruminiaux

Généralement préconisée à la dose de 5g par jour en élevage, la levure BIOSAF[®] a pour effet, dans nos conditions expérimentales, de stabiliser le pH ruminal (+0,4 unité par rapport au témoin) malgré une augmentation significative de la concentration ruminale des

AGV. Cet effet observé par de nombreux auteurs, notamment chez la vache laitière (Doreau and Jouany, 1998) ou dans d'autres productions (Fiems *et al.*, 1993 ; Kumar *et al.*, 1994 ; Roa *et al.*, 1997), se traduit par une hausse du pH moyen au cours des heures qui suivent la prise de nourriture. Il est bien établi que l'effet levure est dépendant de la nature du régime. Celui que nous avons retenu génère naturellement une acidose caractérisée par des valeurs de pH inférieures à 6. Lorsque la levure probiotique est incorporée à la ration, la remontée du pH observée confirme un effet levure marqué pour des régimes acidogènes (Zelenak *et al.*, 1994). Dans une méta-analyse regroupant les résultats de pH acquis lors de 78 expérimentations intégrant 186 traitements, Sauvante *et al.* (2004) confortent nos observations lorsqu'ils ne rapportent aucun effet significatif de la levure probiotique alors que le pH moyen donné par les régimes témoins est de 6,32.

Avec une alimentation riche en concentrés, la flore ruminale subit d'intenses modifications. L'équilibre entre les espèces productrices et utilisatrices de lactate est perturbé à l'avantage de *S. bovis* moins sensible au pH acide que les secondes selon Russell (1991). La présence de levure dans de telles rations permet une stabilisation du pH ruminal qui est à relier avec la faible teneur en lactate du milieu. Dans notre étude, une baisse significative de -69,7% du lactate total est observée. Plusieurs études *in vivo* (Williams *et al.*, 1991 ; Erasmus *et al.*, 1992) et *in vitro* (Rossi *et al.*, 1995 ; Newbold *et al.*, 1998) font état du même résultat en présence de levure avec des diminutions de lactate allant de 10 à 60%. Les auteurs attribuent ces modifications à la capacité de la levure (vivante ou extrait de levure) d'accroître l'activité du métabolisme des bactéries utilisatrices de lactate, notamment celle de *M. elsdenii* et *S. ruminantium*. Or, Fonty et Chaucheyras-Durand (2006) considèrent que seule la levure vivante influe sur les teneurs en lactate alors que les extraits de levures ou les levures mortes n'ont strictement aucun effet, car ne pouvant, comme la levure vivante, modifier le pH ou le E_h du rumen par leur propre métabolisme.

La flore utilisatrice de lactate du rumen est une flore anaérobie stricte évoluant dans un milieu très réducteur (Bryant, 1959). Pour capter l'énergie dont elle a besoin afin d'assurer sa croissance, la bactérie *S. ruminantium* fermente l'acide lactique en succinate puis en propionate (Sokatch, 1969). La voie métabolique adoptée par *M. elsdenii* est la fermentation du lactate en propionate par la voie de l'acrylate (Baldwin *et al.*, 1962 ; Marounek *et al.*, 1989). La voie de l'acrylate régie par l'enzyme *acrylyl CoA reductase* chez *M. elsdenii* implique aussi, bien évidemment, un transfert d'électrons indispensable à

la captation d'énergie nécessaire pour former l'ATP dont elle a besoin (Brockman and Wood, 1975). Elle requiert un niveau d'anaérobiose tel, qu'il ne peut être établi par la seule flore ruminale amylolytique dominante. Une ration acidogène a plutôt tendance à rendre le milieu moins réducteur et donc moins favorable à ces bactéries. L'apport de levure probiotique dans la ration capable d'induire une baisse significative du log PO_2 de $-1,6$ unité et de -50 mV pour le E_h , rend le milieu ruminal plus réducteur. Il devient alors légitime de penser que la présence de levure vivante capable de renforcer le caractère réducteur du rumen, stimule par ce biais l'activité des bactéries anaérobies, telles *M. elsdenii* qui transforme le lactate en propionate et les bactéries cellulolytiques qui assurent une meilleure digestion des fibres.

Plusieurs études appuient cette hypothèse parce qu'elles mettent en évidence une stimulation de la propionogénèse (Harrison *et al.*, 1988 ; Newbold *et al.*, 1990 ; Plata *et al.*, 1994). Cette production accrue de propionate augmente d'autant la concentration en AGV totaux qui améliore la disponibilité énergétique de la ration vis-à-vis de l'animal (Gray and Ryan, 1989). Alors qu'il est bien établi qu'une ration acidogène diminue le pH ruminal ainsi que le rapport C_2/C_3 , en présence de levure cette observation n'est pas vérifiée ici. Le renforcement du pouvoir réducteur du milieu augmente la teneur en propionate qui entraîne une forte diminution du ratio C_2/C_3 . Ce dernier passe de 3,0 avec le régime témoin à 2,0 avec la levure probiotique qui maintient cependant le pH ruminal à un niveau plus élevé.

Dans les conditions de cette étude, la mesure du potentiel redox apparaît comme un paramètre physico-chimique de première importance dont l'intérêt vient compléter celle du pH pour aider à la compréhension du mode d'action de la levure et plus globalement de l'activité fermentaire ruminale. Elle permet partiellement d'envisager les mécanismes de captation d'énergie par les microorganismes autochtones du rumen et suggère qu'à des valeurs très basses de E_h , les bactéries cellulolytiques et utilisatrices de lactate comme la plupart des méthanogènes sont les seules à pouvoir utiliser des accepteurs d'électrons faibles comme le CO_2 , pour satisfaire leur besoin énergétique et augmenter les produits de fermentation utiles pour l'hôte.

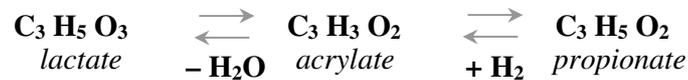
L'effet de la levure probiotique Sc 47 à raison de 5g/v/j a été confirmé sur des animaux en production. Lors d'une importante ingestion de GRF, la levure a un effet stabilisateur plus important sur les paramètres physico-chimiques du rumen. La levure renforce le caractère réducteur du milieu favorisant une meilleure activité de

la microflore grâce à un échange d'électrons. Les bactéries utilisatrices de lactate voient leur métabolisme fermentaire augmenter et transforment le lactate en propionate. Ainsi, la levure évite une accumulation de lactate souvent à l'origine des risques d'acidification du rumen.

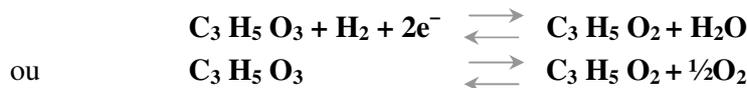
III. 3. La transformation du lactate en propionate : une hypothèse qui intègre la thermodynamique

La baisse du pH semble être consécutive à une accumulation d'acide lactique. Un apport de BIOSAF® dans cette ration en favorisant la réduction du lactate en propionate, évite l'accumulation d'acide lactique et stabilise le pH. De par leur contribution au pH ruminal, les concentrations du couple lactate-propionate offrent la possibilité de calculer une pression partielle d'O₂ (log *PO*₂) en intégrant ce couple redox dans l'équation de Nernst.

Le propionate est produit à partir du lactate *via* la voie de l'acrylate par *M. elsdenii* (Baldwin *et al.* 1962 ; Marounek *et al.* 1989). Cette transformation en deux étapes comporte une déshydratation du lactate en acrylate puis une réduction de l'acrylate en propionate selon l'équation :



L'équation illustrant la stoechiométrie de la transformation du lactate en propionate implique deux molécules de NAD⁺ qui participent à un échange d'hydrogène et d'électrons :



En appliquant la loi d'action de masse, la constante d'équilibre de cette dernière équation est exprimée comme suit :

$$\log K_r = \left\{ \frac{-\Delta_r G^\circ}{RT \times \ln 10} \right\} = \log \left\{ \frac{[\text{propionate}]}{[\text{lactate}]} \right\} + \frac{1}{2} \log PO_2$$

où $\Delta_r G^\circ$ est l'énergie libre de Gibbs de la réaction (kJ.mol⁻¹), *R* est la constante des gaz parfaits (8.314 J.K⁻¹.mol⁻¹) et *T* est la température en Kelvin.

Selon Chang (2000), l'énergie libre de Gibbs de la réaction ($\Delta_r G^\circ$) peut être calculée à partir des valeurs thermodynamiques qui sont respectivement de $-364,7$ et de $-514,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ à $312,15 \text{ K}$ pour le propionate et le lactate.

En substituant les valeurs de $\Delta_r G^\circ$, R et T , le $\log PO_2$ permettant la transformation du lactate en propionate est défini par :

$$\log PO_2 = 2 \log \left\{ \frac{[\text{lactate}]}{[\text{propionate}]} \right\} - 50.16$$

L'équation ci-dessus décrit la relation entre le niveau de PO_2 dans le rumen et le rapport lactate-propionate. Lorsque les concentrations en lactate et en propionate sont similaires, le $\log PO_2$ est de $-50,16$. Selon la loi d'action de masse, la diminution du $\log PO_2$ (augmentation du pouvoir réducteur), modifie l'équilibre de la réaction qui tend vers une formation de propionate alors qu'une augmentation du $\log PO_2$ traduit une accumulation de lactate dans le milieu ruminal. En intégrant les concentrations en lactate et en propionate enregistrées dans cet essai, des valeurs $\log PO_2$ de $-50,4$ et de $-51,9$ sont obtenues respectivement pour les régimes **T** et **5B**. Ces valeurs diffèrent de celles calculées avec le pH et le E_h mais montrent une même différence de 1,5 unité log entre les deux régimes, comme si à une valeur donnée de $\log PO_2$ correspondaient des concentrations précises de lactate et de propionate. L'expression $\log PO_2$ dépourvue de signification biologique a été utilisée pour illustrer l'impact que peut avoir le caractère plus ou moins réducteur du rumen sur la nature des produits issus de la fermentation.

Une diminution de la pression partielle de l'oxygène dans le rumen favoriserait la chaîne des réductions qui en permettant la production du lactate et sa transformation en propionate, limiterait ainsi l'abaissement du pH. L'anaérobiose ainsi favorisée par la présence de levure, permet une meilleure activité de l'ensemble des bactéries anaérobies et notamment les bactéries chargées de la transformation du lactate.

III. 4. Effet de deux niveaux d'apport de la levure probiotique sur les paramètres physico-chimiques ruminiaux

L'autre objectif de cet essai était de comparer les effets de plusieurs niveaux d'apport de levure BIOSAF[®] afin d'en optimiser les recommandations commerciales. Pour des raisons uniquement dépendantes de la disponibilité des animaux, nous n'avons pu comparer entre elles et par rapport au témoin que deux doses : la dose commerciale (5g) et une dose 10 fois inférieure (0,5g) au travers des paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen. Par rapport à la dose commerciale de 5g, la dose de 0,5g entraîne une moindre augmentation du pH ruminal, mais celui-ci demeure significativement différent du témoin ($P < 0,05$). Les études réalisées dans ce sens chez la vache laitière ne mettent en évidence aucun effet dose (Kung *et al.*, 1997 ; Wohlt *et al.*, 1998) sans doute parce que l'écart en nombre d'UFC entre les doses n'est pas assez important. Dans notre étude, l'effet levure à la dose la plus faible se révèle toujours inférieur à celui qui est obtenu lorsque la levure est apportée à la dose la plus élevée. Cela confirme les conclusions de Doležal *et al.* (2005) qui ont établi une corrélation positive entre la dose de la levure BIOSAF[®] apportée et les teneurs en AGV, préconisant pour son utilisation en élevage, une dose supérieure à 4g par vache et par jour.

La dose de 0,5g de la levure probiotique qui apporte 5×10^9 UFC paraît insuffisante pour modifier le caractère réducteur du milieu et provoquer les transformations de la flore que permet la dose de 5g. Ceci nous amène à suggérer que la dose commerciale de 5g (5×10^{10} UFC/j) serait optimale pour éviter les cas d'acidose latente chez la vache laitière haute productrice.

IV. CONCLUSIONS

Afin satisfaire leurs besoins d'entretien et de production, les vaches en lactation recevant une alimentation riche en GRF, sont plus susceptibles de développer une acidose latente. Caractérisée par une chute du pH ruminal, l'acidose induite dans cette étude est plutôt attribuée à une concentration élevée en acide lactique qu'à la concentration en AGV. Ainsi, une flore amylolytique se développe et diminue le pouvoir réducteur du rumen créant par conséquent une situation défavorable aux bactéries anaérobies strictes. L'apport quotidien de 5g de BIOSAF[®] renforce le caractère réducteur du milieu autorisant la

transformation du lactate en propionate et évite ainsi la chute du pH ruminal après la prise de nourriture. Le calcul des pressions partielles d'oxygène au regard des énergies propres de formation et de réaction des principaux produits intermédiaires ou terminaux du métabolisme microbien dans le rumen montre que, lorsque le milieu devient plus réducteur, il est plus favorable à la formation du propionate que du lactate. Par contre, une supplémentation inférieure à cette dose commerciale paraît être insuffisante.

Chapitre 2

Comparaison entre 3 souches de levures probiotiques chez la vache en lactation

Chez le ruminant, les principaux additifs microbiens utilisés concernent les levures probiotiques faisant partie de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*. Plus d'un millier de souches sont recensées au sein de la National Collection of Yeast Culture (NCYC) du Royaume Uni et de l'American Type Culture Collection (ATCC) des Etats-Unis. Elles font partie de la liste de "GRAS" (Generally Recognized As Safe) par l'Association of American Feed Control Officials. En Europe, pour être admises sur le marché, elles doivent répondre à des critères de sécurité (pour l'animal), de qualité (stabilité) et d'efficacité (effet zootechnique) selon la réglementation des additifs en alimentation animale (Directive 96/51 CE).

Parmi ces probiotiques à base de la seule composante active, *S. cerevisiae*, quelques souches sont autorisées et notamment NCYC Sc 47 (**B**), CNCM I-1077 (**LC**) et CBS 493.94 (**YS**). Ces microorganismes présentent l'avantage de pouvoir être produits à grande échelle dans des fermenteurs en aérobiose mais les critères qui les distinguent relèvent des applications industrielles originelles des souches (brasserie, boulangerie, œnologie). Par conséquent, les caractéristiques biochimiques, moléculaires et les concentrations en cellules revivifiables des produits commercialisés dépendent du mode de fabrication et du conditionnement de ces additifs. Dans certaines préparations, comme c'est le cas pour **YS**, le milieu de croissance est associé aux cellules vivantes représentant ainsi un apport supplémentaire de métabolites (substrats et/ou facteurs de croissance) disponibles pour les micro-organismes du rumen. D'autres additifs tels que **B** et **LC** sont constitués par des souches pures non associées à leur milieu de culture.

Les effets attendus de la levure probiotique chez le ruminant sont basés sur la capacité de souches de levures à stimuler la croissance et l'activité des bactéries du rumen. Plusieurs études (Dawson and Hopkins, 1991 ; Newbold *et al.*, 1995) montrent que ces effets diffèrent en fonction des souches et qu'il serait ainsi possible de définir des utilisations spécifiques pour chacune. Ainsi Lyons *et al.* (1993) suggèrent que certaines levures sélectionnées pour la stimulation et la croissance des bactéries utilisatrices de lactate, peuvent être utiles chez les ruminants de boucherie et laitiers nourris avec des régimes concentrés. D'un autre côté, des souches qui stimuleraient l'activité des bactéries cellulolytiques pourraient être plus bénéfiques pour des animaux recevant des fourrages de mauvaise qualité ou des régimes à base de foin. Nous avons vu au chapitre précédent que la stimulation des bactéries cellulolytiques comme celle des bactéries utilisatrices de lactate par l'apport de levures tient à la capacité de cet additif à abaisser le potentiel redox

du rumen chez des animaux consommant un régime acidogène, créant des conditions plus favorables pour la multiplication et l'activité de la microflore.

Par le biais de la mesure des paramètres physico-chimiques et fermentaires ruminiaux, l'objectif de cet essai est de mettre en évidence cette capacité et de différencier ainsi l'effet de différentes souches de levure chez la vache en production. La souche **LC** a été retenue en se basant sur les résultats obtenus dans l'essai relatif à l'effet d'un apport d'oxygène (Partie 3, Chapitre 2) au cours duquel nous avons pu montrer que cette souche permettait, comme la souche **B**, de renforcer le caractère réducteur du milieu ruminal. La souche **YS** a aussi été testée en raison de son autorisation d'utilisation, au même titre que les deux autres, sur le marché des additifs pour ruminants, mais surtout parce qu'elle représente une autre forme d'apport *i.e.* des levures associées à leur milieu de culture.

I. DÉROULEMENT DE L'ESSAI

I. 1. Animaux et régimes

Trois vaches laitières de race Prim'Holstein, porteuses d'une canule ruminale, sont utilisées et maintenues en box individuel sur tapis matelassé. Elles sont en milieu de lactation (150 jours *post-partum*) et traitées individuellement deux fois par jour (8h et 16h). Le niveau de production moyen est de 30 ± 2 kg de lait par vache et par jour. Les animaux reçoivent le régime VL 1 – T (Tableau 6), distribué deux fois par jour (9h et 17h) à raison de 21 kg MS/v/j pour induire l'acidose attendue. Les trois régimes expérimentaux formulés sont composés du régime T supplémenté successivement avec 5g de Sc 47 (régime **B**), 6g de LC (régime **LC**) et 640g de YS (régime **YS**) par jour. Les doses de LC et YS sont calculées en fonction de la dose généralement préconisée pour la souche Sc 47 *i.e.* 5×10^{10} UFC, de manière à comparer des traitements équivalents en terme d'UFC.

I. 2. Plan expérimental et analyse statistique

Les animaux sont disposés en carré Latin 3×3 [⊕] et reçoivent alternativement les régimes complémentés en levures pendant 3 périodes. Chaque période consiste en 14 jours

[⊕] Le dispositif expérimental était à l'origine un carré latin 4×4 . Un problème de santé sur une vache nous a contraint à modifier ce dispositif selon un carré latin 3×3 . L'objectif principal de cet essai étant de comparer entre elles les trois souches de levures, le régime témoin a été écarté. Toutefois, ce régime a été testé après la fin du carré latin afin d'avoir des valeurs de référence qui n'ont pas fait l'objet de traitement statistique.

d'adaptation au régime, 4 jours de mesures (pH et E_h) et 3 jours de désadaptation au régime. Les mesures sont effectuées avant (T_{-1}), pendant (T_0) et après (T_1 à T_8) le repas. Des échantillons de contenu ruminal sont prélevés pour le dosage ultérieur des AGV, de l'acide lactique et de l'ammoniac, de façon concomitante avec les mesures de pH et de E_h .

Les résultats sont traités par le General Linear Model (SPSS Version 13.0 pour Windows, SPSS Inc., IL, USA) en mesures répétées qui tient compte de la non-indépendance des mesures entre les temps de prélèvements. Le modèle statistique est le suivant :

$$Y_{ijkl} \text{ pour les heures de mesures} = \mu + T_i + V_j + P_k + Ts_l + (T \times Ts)_{il} + e_{ijkl}$$

Y_{ijkl} = variable étudiée ; μ = moyenne de la population ; T_i = effet fixé du traitement ; V_j = effet aléatoire de la vache ; P_k = effet fixé de la période ; Ts_l = effet du temps de mesure ; $(T \times Ts)_{il}$ = interaction entre le traitement et le temps de mesure ; e_{ijkl} = erreur résiduelle aléatoire.

II. RÉSULTATS

II. 1. Effet sur le pH ruminal

Les courbes d'évolution du pH ruminal (Figure 36) affichent une même tendance pour tous les traitements. La plage des valeurs mesurées se situe entre 6,36 et 5,76 pour le régime B, entre 6,31 à 5,74 pour le régime LC et entre 6,20 et 5,66 pour le régime YS. Pour le régime T, le pH moyen, s'établissant à 5,71, varie entre 6,14 et 5,41.

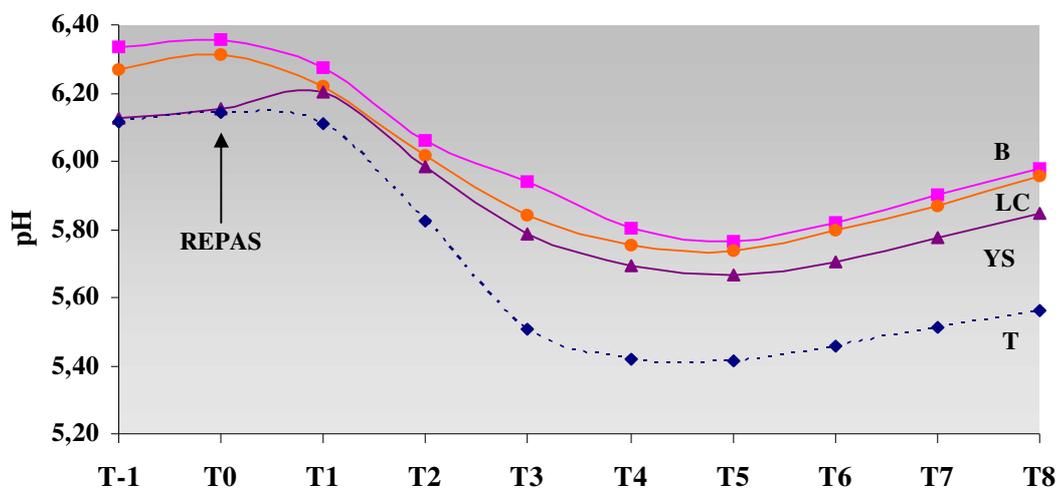


Fig. 36. Evolution du pH ruminal chez la vache en lactation (effet souche)

Les valeurs initiales de pH enregistrées pour les régimes **B** et **LC** sont significativement plus élevées que celles obtenues pour le régime **YS** ; la valeur relevée pour ce dernier apparaissant de même niveau que celle du régime **T**. Quel que soit le traitement, la baisse du pH ruminal s’amorce dès la 2^{ème} heure post-prandiale pour atteindre une valeur minimale 4 à 5h après la distribution du repas. Sur l’ensemble de la période de mesures, seule une différence significative (Tableau 27) de + 0,13 unité pH est observée entre les régimes **B** et **YS**. Comparativement à la valeur obtenue pour le régime **T**, les régimes **B**, **LC** et **YS** se caractérisent par des valeurs de pH numériquement plus élevées, respectivement de + 0,31, de + 0,27 et de + 0,18 unité pH.

Tableau 27 : Effet d’apport de différentes souches de levure sur le pH ruminal.

	Traitements				P		
	B	LC	YS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
pH	6,02 ^a	5,98 ^{ab}	5,89 ^b	0,04	<0,05	<0,01	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d’un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 2. Effet sur le E_h ruminal

L’apport de 5g de la souche Sc 47 (régime **B**) dans la ration abaisse le niveau du E_h qui évolue entre -122 et -180 mV et se situe en moyenne à -163,9 mV (Figure 37).

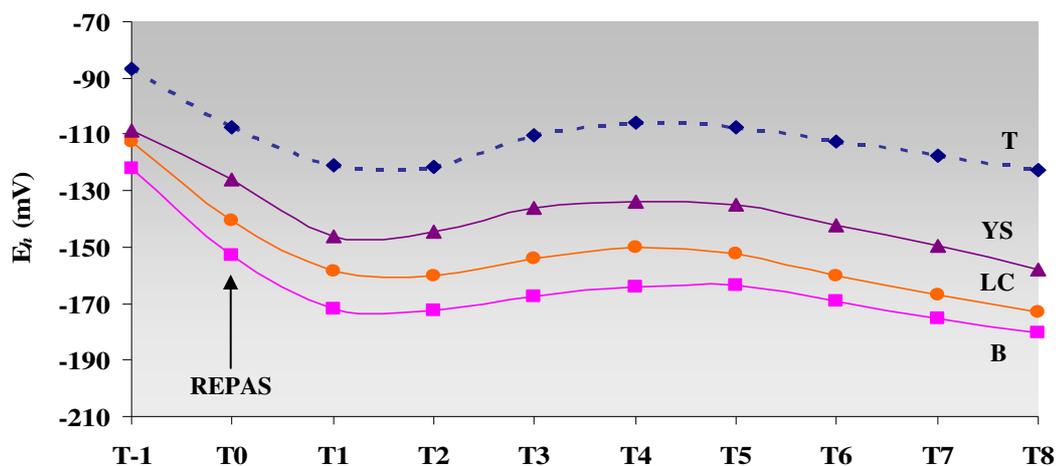


Fig. 37. Evolution du E_h ruminal chez la vache en lactation (effet souche)

Les valeurs enregistrées pour les régimes **YS** et **LC** sont plus élevées et varient entre -109 et -158 mV pour le régime **YS** et entre -113 et -173 mV pour le régime **LC**. Le E_h caractérisant le régime **T**, de l'ordre de $-111,3$ mV en moyenne, évolue entre -87 et -123 mV.

Tableau 28 : Effet d'apport de différentes souches de levure sur le E_h ruminal.

	Traitements				P		
	B	LC	YS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
E_h (mV)	-163,9 ^a	-152,8 ^b	-138,0 ^b	4,12	<0,05	<0,01	>0,05

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

Les trois traitements conduisent à des valeurs de E_h significativement différentes entre elles (Tableau 28). Le régime **B** se démarque avec une différence de -11 mV et de -26 mV par rapport aux régimes **LC** et **YS**.

II. 3. Effet sur la pression partielle en oxygène

En intégrant les valeurs de pH et de E_h , les régimes **B** et **LC** présentent des pressions partielles en oxygène plus basses que celle calculée pour le régime **YS**.

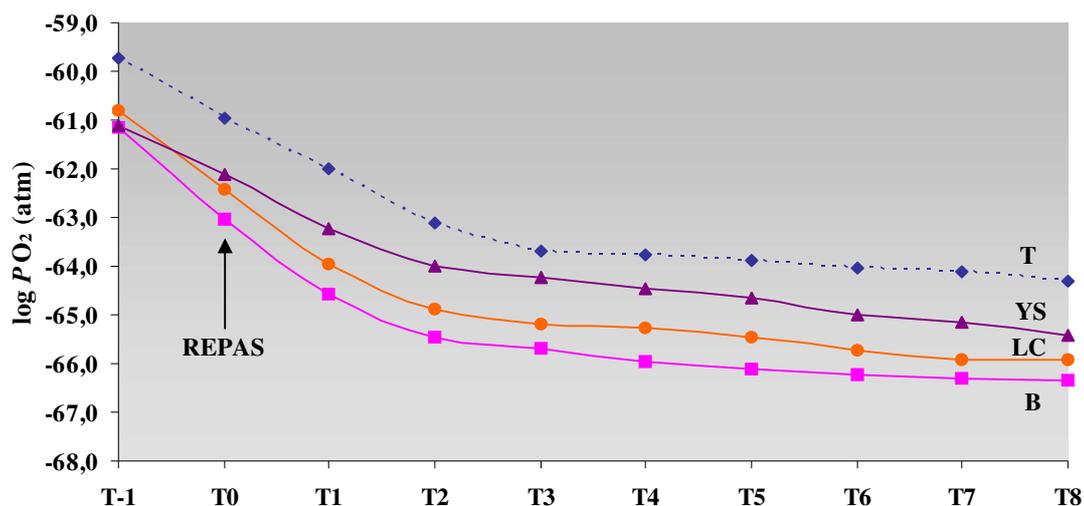


Fig. 38. Evolution du $\log PO_2$ ruminal chez la vache en lactation

Les valeurs de log PO_2 varient entre $-61,2$ et $-66,4$ pour le régime **B**, entre $-60,8$ et $-65,9$ pour le régime **LC** et entre $-61,1$ et $-65,4$ pour le régime **YS** (Figure 38). Les moyennes de log PO_2 des différents régimes sont présentées dans le Tableau 29. Si les régimes **B** et **LC** conduisent à des valeurs de log PO_2 identiques, ils diffèrent ($P < 0,05$) du régime **YS** par des écarts respectifs de $-1,2$ et de $-0,7$. Le log PO_2 calculé pour le régime **T** varie de $-59,7$ à $-64,3$, avec une valeur numériquement plus élevée, de l'ordre de $-63,0$.

Tableau 29. Effet d'apport de différentes souches de levure sur le log (PO_2) du rumen

	Traitements				P		
	B	LC	YS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
log (PO_2)	- 65,1 ^a	- 64,6 ^a	- 63,9 ^b	0,27	<0,05	<0,01	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 4. Effet sur les concentrations ruminales en AGV

Les concentrations moyennes en AGV totaux sont de 102,6, 101,7 et 98,3 mM respectivement pour les régimes **B**, **LC** et **YS**, mais aucune différence significative n'est observée entre les différents traitements (Tableau 30).

Tableau 30. Effet d'apport de différentes souches de levure sur la teneur totale et le profil en AGV du milieu ruminal.

	Traitement				P		
	B	LC	YS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
AGV _t (mM)	102,6	101,7	98,3	3,22	>0,05	<0,01	>0,05
C ₂ (mM)	57,6	60,3	57,9	0,84	>0,05	<0,01	>0,05
C ₃ (mM)	31,1 ^b	25,6 ^a	25,4 ^a	1,49	<0,05	<0,01	<0,05
C ₄ (mM)	10,0	11,1	10,5	0,53	>0,05	>0,05	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

En ce qui concerne les proportions d'AGV, la concentration moyenne en C_3 est significativement plus importante (+ 22%) pour le régime **B** que pour les régimes **LC** et **YS**. Une interaction linéaire significative traitement \times temps de prélèvement ($P < 0,05$) est observée à partir de T_2 . Aucune différence significative n'est notée sur les teneurs en C_2 et en C_4 . La concentration en AGV totaux enregistrée pour le régime **T** s'établit à 84,3 mM avec des teneurs en C_2 , C_3 et C_4 respectives de 53,4, 18,0 et 9,8 mM.

II. 5. Effet sur les teneurs ruminales en lactate

Les teneurs en lactate dosé dans la phase liquide ruminale sont présentées dans le Tableau 31. Les traitements **B** et **LC** diffèrent significativement du traitement **YS** par des teneurs en L-lactate et en lactate total (D et L) deux fois moins importantes. Des interactions traitement \times temps de prélèvement de type quadratique sont observées pour le L- et le lactate total. Aucune différence pour les teneurs en D-lactate n'est constatée entre les 3 souches. A titre comparatif, les valeurs enregistrées pour le régime **T** sont de 10,1, 7,1 et 17,2 mM respectivement pour le D-, le L- et le lactate total.

Tableau 31. Effet d'apport de différentes souches de levure sur la teneur en lactate

	Traitement				P		
	B	LC	YS	ESM	Trait	Temps	Trait \times Temps
D-lactate (mM)	3,6	4,0	6,2	1,72	>0,05	<0,01	>0,05
L-lactate (mM)	2,9 ^a	3,4 ^a	6,5 ^b	0,98	<0,01	<0,05	<0,05
D et L lactate (mM)	6,5 ^a	7,4 ^a	12,7 ^b	1,98	<0,05	<0,01	<0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 6. Effet sur la concentration ruminale en ammoniac

Pour les régimes **B** et **LC**, les concentrations moyennes en NH_3 sont significativement plus faibles que celle enregistrée pour le régime **YS**, de 61,8 et 63,3 mg/L respectivement (Tableau 32). La concentration moyenne en NH_3 pour le régime **T** s'élève à 198,6 mg/L.

Tableau 32: Effet d'apport de différentes souches de levure sur la teneur ruminale en ammoniac

	Traitements				P		
	B	LC	YS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
NH ₃ (mg/L)	153,4 ^a	151,9 ^a	215,2 ^b	4,57	<0,01	<0,01	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

III. DISCUSSION

Les résultats de cette étude, dont l'objectif est de tenter de différencier l'effet de trois souches de levures, font apparaître des différences que l'on peut attribuer aux caractéristiques intrinsèques de chacune. Bien qu'aucune comparaison statistique n'ait pu être faite par rapport à la ration sans levure, l'apport de l'une ou l'autre des souches de levures testées permet de maintenir un pH ruminal moyen plus élevé que celui enregistré pour la ration témoin ; l'écart relevé pour des souches de levures vivantes (**B** et **LC**) étant plus important que celui enregistré avec la souche de levure associée à son milieu de culture (**YS**). Toutefois, quelle que soit la souche, et pour la dose retenue dans notre essai, les valeurs de pH les plus faibles enregistrées entre 4 et 5h après l'ingestion du repas, restent numériquement plus élevées que celle mesurée pour le témoin, avec un écart plus important pour les souches **B** et **LC** (+0,35 et +0,33 unité pH) que pour la souche **YS** (+0,25 unité pH). Ces résultats appellent plusieurs commentaires.

Ils confirment d'une part, l'effet stabilisateur généralement admis des levures sur le pH ruminal lorsqu'elles sont associées à des rations riches en glucides rapidement fermentescibles. Cet effet, notamment pour la souche **B**, a déjà été rapporté dans les chapitres précédents de notre travail. En ce qui concerne la souche **YS**, les données de la littérature semblaient plus hétérogènes avec des effets sur le pH, positifs (Roa *et al.*, 1997 ; Koul *et al.*, 1998) ou absents (Erasmus *et al.*, 1992 ; Newbold *et al.*, 1995, 1996 ; Lila *et al.*, 2006) selon les essais. L'analyse détaillée de ces derniers, notamment des doses apportées et du type d'expérimentation conduite, montre que pour cette souche un effet positif sur le pH est uniquement observé pour des essais menés *in vivo* et pour des doses, exprimées en UFC/jour, non inférieures à 10^{10} , donc proches de celle utilisée dans notre

présente étude. Seul l'essai de Erasmus *et al.*, (1992) ne va pas dans ce sens, alors que la dose quotidienne administrée correspondrait à 5×10^{10} UFC. Ces auteurs, contrairement aux autres, n'ayant pas précisé la quantité de levures vivantes présentes dans le produit, nous nous sommes basés pour calculer la dose sur la valeur donnée pour le produit commercial *i.e.* 5×10^9 UFC/g. Or Newbold *et al.* dans deux essais (1995 ; 1996), ont trouvé des valeurs plus faibles ($6,7 \times 10^8$ UFC/g) que celle annoncée. Dans ces conditions, la valeur que nous avons déterminée pour l'essai d'Erasmus *et al.* (1992) pourrait très bien être surestimée et l'absence d'effet sur le pH pourrait alors dans ce cas être attribuée à une dose d'utilisation du produit trop faible.

Il semblerait, d'autre part, que les souches de levures vivantes limitent mieux la chute post-prandiale du pH qu'une souche de levure associée à son milieu de culture. Il est difficile de l'affirmer pour la souche **LC**, car les essais concernant cette dernière sont plus rares, conduits *in vitro*, avec des doses quotidiennes de l'ordre de 10^9 UFC et aucune modification du pH ruminal.

La teneur en AGV totaux, généralement considérée comme un paramètre caractérisant l'état d'acidification du milieu ruminal, ne permet pas de différencier les souches entre elles. Par contre les teneurs en lactate, diminuées en présence de **B** et de **LC**, pourraient expliquer les différences de pH enregistrées. L'effet de la levure probiotique sur le métabolisme des bactéries utilisatrices de lactate a été maintes fois étudié. Selon Chaucheyras *et al.* (1996), il s'agirait d'une compétition entre la levure **LC** et *S. bovis* pour l'utilisation des sucres dans le rumen qui limiterait la production de lactate et/ou d'une fourniture par la levure **LC** de facteurs de croissances qui stimuleraient l'activité des bactéries utilisatrices de lactate. Nisbet et Martin (1991) montrent aussi que la levure **YS**, ne fournirait des acides aminés, peptides et vitamines qu'à la flore utilisatrice de lactate et non aux autres bactéries telles que les cellulolytiques. Dans notre essai, nous avons déterminé une concentration en lactate du même ordre de grandeur pour la ration renfermant la souche **YS** et pour la ration témoin, ce qui ne permet pas d'envisager, pour cette souche, un effet stimulateur de l'activité des bactéries responsables de la dégradation du lactate. Par ailleurs, avec la levure **B**, la proportion de propionate est plus élevée que celles enregistrées avec les rations renfermant les souches **LC** et **YS**. Cela confirme nos résultats et notre hypothèse antérieure qui mettent en avant la capacité de cette souche à rendre le milieu ruminal plus favorable permettant à l'ensemble des bactéries anaérobies strictes de transformer le lactate en propionate. Il semblerait que le niveau de E_h requis

pour la transformation du lactate en propionate ne soit pas atteint après un apport de **LC** et de **YS** dans la ration.

En mesurant le E_h du rumen d'animaux adaptés à la levure **B**, les valeurs obtenues se démarquent clairement des autres traitements. Les valeurs de E_h enregistrées avec les souches **LC** et **YS** sont en moyenne à des niveaux supérieurs, respectivement de l'ordre de -153 mV et de -138 mV et significativement différentes entre elles. Elles traduisent un environnement moins réducteur que celui provoqué par la souche **B**. En prenant en compte la valeur numériquement plus élevée obtenue pour le régime **T**, des baisses respectives de -53 , -42 et -27 mV sont calculées pour les régimes **B**, **LC** et **YS**. L'effet levure présent, conforte les résultats de Jouany *et al.* (1999) chez le mouton. D'autres mesures du E_h ont été aussi effectuées chez le veau dans le but d'observer la colonisation des microbes dans le rumen de nouveaux nés en présence de la levure **LC** (Durand-Chaucheyras and Fonty, 2002). Bien que ces auteurs aient exprimé des différences de potentiel au lieu du E_h , les résultats montrent que la souche **LC** renforce le pouvoir réducteur du milieu ruminal par rapport à un témoin sans levure.

Cette baisse du E_h est responsable d'une amélioration des conditions écologiques plus favorables aux bactéries anaérobies strictes autochtones du milieu. Plusieurs études vont dans ce sens. Ainsi, *in vitro*, la levure stimule la croissance de *Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus albus*, *R. flavefasciens* FD1 et *Butyrivibrio fibrisolvens* D1 (Girard and Dawson, 1994). De plus, Callaway et Martin (1997) montrent que la levure est capable d'augmenter la vitesse de dégradation de la cellulose. *In vivo*, l'effet levure est observé sur l'activité des bactéries responsables de la dégradation de la partie cellulosique dans une ration riche en GRF (Michalet-Doreau *et al.*, 1997). Chez des agneaux gnotoxéniques hébergeant comme seule flore des cellulolytiques, la présence de levure probiotique stimule l'activité des enzymes *polysaccharidase* et *glycoside-hydrolase* (Durand-Chaucheyras and Fonty, 2001). Ces résultats expliquent en effet la meilleure valorisation des fibres de la ration observée chez les animaux recevant des levures (Weidmeier *et al.*, 1987 ; Mir and Mir, 1994).

Selon certains travaux, l'augmentation du pouvoir réducteur du rumen exprimée par une baisse de E_h , serait due à une consommation de l' O_2 par la levure. Nos faibles valeurs calculées de PO_2 signifient que le milieu ruminal est totalement privé d' O_2 . Cependant, elles mettent en évidence des différences entre les souches, particulièrement entre **YS** et les souches **B** et **LC**, ces dernières "créant" des PO_2 inférieures. Contrairement à nos résultats

sur l'animal, Newbold *et al.* (1993) ont mesuré *in vitro* une utilisation de l'O₂ respectivement de 164, 189 et 146 nmol/min/ml par les diverses souches NCYC 240, NCYC 1026 et **YS** dans le contenu ruminal. Ils ont observé une meilleure croissance des bactéries anaérobies strictes alors que les souches mutantes dépourvues de gènes respiratoires n'ont aucun effet. Bien que des précautions rigoureuses ont été prises pour éviter toute contamination du RUSITEC par l'O₂, les consommations d'O₂ rapportées dans ces conditions, ne peuvent néanmoins pas être comparées à nos baisses de PO_2 obtenues chez l'animal. A la différence des valeurs de PO_2 qui sont de l'ordre de 10^{-64} atm, les valeurs du E_h traduisent mieux le caractère réducteur du milieu ruminal.

IV. CONCLUSIONS

Les variations de pH, E_h et $\log PO_2$ ainsi que celles de certains produits terminaux issus de la fermentation ruminale ont été étudiées lors de la supplémentation en levures d'un régime riche en GRF chez la vache en lactation. La comparaison des souches de levures **B**, **LC** et **YS** a permis de mettre en évidence des différences lorsqu'elles sont distribuées à un nombre d'UFC équivalent. Il en ressort principalement que les souches **B** et **LC** ont une meilleure capacité à augmenter le caractère réducteur du milieu ruminal qui évite l'accumulation de lactate contrairement à la souche **YS**. Mais la concentration élevée en propionate avec la souche **B** suggère que seule cette dernière en abaissant suffisamment le E_h ruminal parvient à autoriser la transformation du lactate en propionate alors que les souches **LC** et **YS** n'en sont pas capables.

Chapitre 3

Effets d'un apport de levure et de substance tampon chez la vache en production

L'acidose chez le ruminant a fait l'objet de nombreuses synthèses bibliographiques où sont rapportés les principaux mécanismes d'installation et les conséquences zootechniques (Oetzel, 2000 ; Martin *et al.*, 2006). Il en ressort que le facteur déclanchant de l'acidose est une production accrue et une accumulation d'AGV et d'acide lactique. Ces productions d'acides ne sont pas suffisamment compensées par leur absorption et surtout par le recyclage des tampons salivaires. La production des tampons salivaires est limitée par une baisse de l'activité de mastication provoquée par une diminution de la fibrosité (moins de parois végétales et diminution de la taille des particules) de la ration quand parallèlement la proportion de GRF augmente (Sauvant *et al.*, 2006).

L'importance de la baisse du pH lors d'une fermentation intense dépend du pouvoir tampon (PT) du milieu ruminal et de sa capacité à rétablir l'équilibre acido-basique du rumen. Le PT peut être défini comme étant le nombre de moles de protons (ions H⁺) requis pour provoquer une modification du pH (Segel, 1976) ou la capacité du milieu ruminal à résister à un changement de pH soit par l'ajout ou le retrait d'un acide ou d'une base. Pour qu'une substance puisse agir comme tampon dans des conditions physiologiques particulières, plusieurs critères doivent être respectés : elle doit avoir une grande solubilité dans l'eau, être un acide, une base ou un sel faible et doit posséder un pK_a proche du pH physiologique du milieu à tamponner (Erdman, 1988).

Lorsqu'une importante production d'acide est générée dans le rumen par une ration très "acidogène", le ruminant possède trois moyens pour tamponner son contenu ruminal. D'abord, il peut naturellement tamponner le rumen par une sécrétion plus abondante de salive. En effet, le flux salivaire chez la vache varie selon certaines estimations entre 110 et 310 litres par jour (Bailey, 1961 ; Cassida and Stokes, 1986) avec une moyenne de 170 litres par jour selon Erdman (1988). Chez la vache, la production de salive est corrélée au temps de mastication (ingestion et rumination) de telle sorte que les fluctuations enregistrées sont fonction à la fois de la quantité de MS ingérée, de la nature de la ration notamment la teneur en fibres (Mertens, 1997) et de la taille des particules (Sauvant *et al.*, 1999). Chez la vache laitière à haut potentiel de production, l'augmentation de la MSI due à l'enrichissement en concentrés et d'une réduction de la fibrosité de la ration, se traduit par une forte baisse de la production salivaire augmentant le risque d'une acidification du rumen (Beauchemin and Buchanan-Smith, 1989).

La capacité intrinsèque des aliments à tamponner le milieu ruminal est le deuxième facteur à considérer. Chaque ingrédient de la ration présente différentes caractéristiques qui

sont susceptibles de modifier le pH ruminal (Giger-Reverdin and Duvaux-Ponter, 1998 ; Giger-Reverdin *et al.*, 1999). Il s'agit en particulier des teneurs naturelles en protéines, en carbonates et en phosphates des aliments. Les protéagineux ont aussi un PT élevé puisque la dégradation des protéines qu'ils contiennent en grande quantité, produit des ions carbonate lorsque la protéolyse va jusqu'au stade de la désamination (Sauvant *et al.*, 1999). Les fourrages grossiers ont aussi un PT intrinsèque élevé ; leur mélange avec l'ensilage de maïs dans la ration augmente le PT de ce dernier (Playne and Mc Donald, 1966). Les constituants pariétaux jouent donc un rôle important à la fois par la mastication (ingestion et rumination) mais aussi par leur propre PT.

Enfin, l'intensification de élevage a donné lieu à l'utilisation de substances tampons, des consommatrices de protons ou plus généralement des agents neutralisants, pour compenser le déficit de production salivaire. L'oxyde de magnésium (MgO), plus communément appelé magnésie, est souvent considéré comme une substance tampon ; elle est régulièrement utilisée en élevage laitier. Cependant, le MgO est relativement peu soluble dans l'eau bien qu'il soit très efficace pour augmenter le pH ruminal et le taux butyreux du lait (Thomas *et al.*, 1984). Par ailleurs, le PT des phosphates, a été étudié par Counotte *et al.*, (1979), il est caractérisé par 3 valeurs distinctes de son pK_a (2,1 ; 7,2 et 12,4) très éloignées du pH ruminal. Il présente en conséquence peu d'intérêt bien qu'étant un des composés de la salive qui lui confère un excellent pouvoir neutralisant. Le bicarbonate de sodium (BS) ou $NaHCO_3$, caractérisé par un pK_a de 6,25 est beaucoup plus proche du pH ruminal. C'est dans ces conditions, une substance tampon efficace. Elle est très couramment utilisée en production laitière.

Les effets zootechniques en production laitière ou en production de viande des substances tampons, notamment du BS, ont fait l'objet de quelques synthèses bibliographiques (Erdman, 1988 ; Meshy *et al.* 2004). L'incorporation des substances tampons dans la ration chez la vache laitière (Meshy *et al.* 2004), se traduit naturellement par une élévation du pH ruminal mais aussi par une augmentation significative de l'ingestion (+0,51 kg MS/j), de la production laitière (+0,52 kg/j) et du taux butyreux du lait (+1,5 g/kg). Lors d'un apport de BS dans la ration, la concentration en AGV n'est pas affectée mais la proportion molaire de l'acétate et du butyrate augmente au détriment du propionate. Les auteurs soulignent en outre que l'effet des tampons est significatif lorsque les animaux sont en situation de sub-acidose alors que l'effet est absent lorsque la ration contient plus de 30 % de fibre. Selon Erdman (1988), les effets zootechniques du BS

apporté dans une ration à base d'ensilage de maïs peuvent être expliqués par un accroissement de la digestibilité apparente de la MS (+1,6%), du NDF (+3,5%) et de l'ADF (+4,1%).

Chez des animaux en production, l'emploi d'un additif stabilisateur de pH a d'abord pour effet de corriger une trop forte acidité ruminale mais l'objectif essentiel est bien de favoriser l'activité des microorganismes du rumen pour améliorer le rendement dans l'utilisation de la ration en vue de meilleurs résultats de production. Nous avons pu montrer précédemment que la levure probiotique utilisée chez la vache laitière, possède aussi une capacité à stabiliser le pH ruminal lorsque la ration a un caractère acidogène. La levure présente en conséquence une certaine similitude avec le bicarbonate de sodium lorsque l'un et l'autre sont utilisés comme additifs alimentaires mais elle n'a pas d'effet tampon. Par son métabolisme propre, elle provoque une diminution du potentiel redox dont une répercussion se fait sentir sur le pH alors que le bicarbonate de sodium agit directement sur le pH en captant des protons. Peut-on dire qu'il y a une similitude entre l'effet de la levure et l'effet du bicarbonate?

Pour répondre à cette question, un essai sur vaches en lactation a été conduit, qui a permis de comparer à un témoin, les effets d'un apport de 5g/j de levure BIOSAF® à ceux d'un apport de 150g/j de BS sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen, et sur la digestibilité apparente des fibres.

I. DÉROULEMENT DE L'ESSAI

I. 1. Animaux

Les vaches utilisées sont équipées d'une canule ruminale. Elles sont en début de lactation (40 jours après vêlage) et sont traitées 2 fois par jour à 8h et 16h. Les productions enregistrées quotidiennement, sont en moyenne de 45 ± 5 kg de lait par vache et par jour. Les animaux sont maintenus en box individuel sur tapis matelassé.

I. 2. Régimes

Un régime mélangé est distribué en deux repas par jour (9h et 17h) et les quantités distribuées ne sont pas offertes *ad libitum*, mais ajustées à la capacité d'ingestion moyenne

des vaches (28 kg MS/v/j). Le régime VL 2 dont la valeur BACA¹ se situe à environ 200 mEq/kg MS, est constituée de 51,5 % de EMPE² ; 5,7 % de luzerne déshydratée (Rumiluz[®]) ; 35,9 % de concentrés³ ; 6,0% de maïs concassé ; et 0,9 % de minéraux⁴. Il représente ainsi le régime témoin (**T**) et il est formulé pour satisfaire les besoins d'entretien et de production des animaux mais aussi pour favoriser l'acidose latente qui apparaît généralement chez des vaches à haut potentiel. La composition chimique des constituants de la ration témoin est présentée dans le Tableau 33.

Tableau 33. Composition chimique des constituants de la ration

Ingrédients de la ration					
	EMPE	Luzerne	Conc. Production	Conc. Azoté	Maïs concassé
MS (%)	28,1	84,6	87,8	88,6	88,9
MO (%)	95,8	90,6	94,3	93,4	97,8
NDF (%)	48,0	47,5	29,1	21,8	20,4
ADF (%)	26,3	35,9	12,2	10,2	4,3

Les régimes expérimentaux sont composés comme le régime **T** mais complétés en levures revivifiables (régime **5B**) ou en bicarbonate de sodium (régime **BS**) déposés en top-dressing. Les 5g de levure représentent la dose commerciale recommandée ; une dose dont nous avons montré qu'elle provoque une élévation moyenne du pH ruminal de 0,4 unité. La quantité de BS apportée dans la ration a été déterminée par l'équation de Henderson-Hasselbalch (Kohn and Dunlap, 1998), de telle sorte que le pH ruminal (régime **T**) soit aussi augmenté de 0,4 unité par rapport au régime (de 5,80 à 6,20).

$$\text{pH}_{\text{rumen}} = 7,74 + \log [\text{HCO}_3^-] / \text{PCO}_2$$

comme la PCO_2 dans la phase gazeuse ruminale est voisine de 0,7 atm,

$$[\text{HCO}_3^-] = 0,7 \text{ inverse log} (\Delta\text{pH} - 7,74) \cong 150\text{g}$$

¹ Bilan Alimentaire Cations Anions

² Ensilage de maïs plante entière

³ 50 % d'un concentré azoté CB 102 (Aliso, France) : Prot. Bt (46-47 %), MG Bt (2-3 %), Cellulose Bt (8-9 %), Cendres Bt (8-10 %), Cu sulfate (15 mg/kg), vitamine A (6,000 UI/kg), vitamine D₃ (2,000 UI/kg), vitamine E (15 mg/kg) ; et 50 % d'un concentré de production B 107 (Aliso, France) : Prot.Bt (20 %), MG Bt (2-3 %), Cellulose Bt (6-9 %), Cendres Bt (7-8 %), Cu sulfate (15 mg/kg), vitamine A (6,000 UI/kg), vitamine D₃ (2,000 UI/kg), vitamine E (15 mg/kg)

⁴ Aliment minéral vitaminé contenant : P (50 g/kg), Ca (140 g/kg), Na (60 g/kg), Zn (4 g/kg), Mn (3,2 g/kg), Fe (3 g/kg), Cu (0,8 g/kg), vitamine A (250,800 UI/kg), vitamine D₃ (62,700 UI/kg), vitamine E (112 UI/kg).

I. 3. Plan expérimental

Les animaux sont disposés en carré Latin 3×3 . Chaque période expérimentale, d'une durée de 21 jours, consiste en 14 jours d'adaptation à la ration, 4 jours de mesures du pH et du E_h et de prélèvement de jus ruminal pour les AGV, le lactate et le NH_3 (incluant le protocole de la digestibilité sur 3 jours) et 3 jours de désadaptation à la ration traitement.

I. 3. 1. Les mesures des paramètres physico-chimiques et fermentaires

Les mesures (pH et E_h) et les prélèvements (AGV, lactate et NH_3) du contenu ruminal sont effectués selon le protocole décrit dans le chapitre matériel et méthodes.

I. 3. 2. La digestibilité apparente de la ration

Au cours des 4 jours de mesure des paramètres physico-chimiques du rumen, un essai de digestibilité apparente a été mis en place sur le même plan expérimental. Pour chaque période, pendant les 14 jours d'adaptation au régime, les quantités ingérées (MSI) ont été suivies quotidiennement par mesure des quantités offertes et refusées sur la base de la matière sèche (MS). Des échantillons des constituants entrant dans la composition de la ration mélangée ont été pris une fois par période pour la détermination de la MS, de la MO, du NDF et de l'ADF.

La collecte des matières fécales a été réalisée manuellement durant le jour pendant le temps de présence auprès des animaux et à l'aide des bacs métalliques disposés à l'arrière des stalles pendant la nuit. La quantité de fèces récoltée quotidiennement est pesée et un échantillon représentatif prélevé pour les analyses de la MS, de la MO, du NDF et de l'ADF.

La détermination de la digestibilité apparente de la ration est basée sur les quantités ingérées J1, J2, J3 de la période expérimentale et sur les quantités de fèces récoltées à J2, J3 et J4 afin de tenir compte de la durée du transit alimentaire. Pour chaque paramètre (Y) mesuré, la digestibilité apparente est calculée selon la formule:

$$d Y (\%) = \frac{\text{Quantité ingérée (J}_1) - \text{Quantité excrétée (J)}}{\text{Quantité ingérée (J}_1)} \times 100$$

I. 4. Les techniques analytiques

I. 4. 1. Matière sèche (MS)

La matière sèche des aliments est déterminée sur des échantillons par dessiccation à l'étuve à 103 °C jusqu'à poids constant (environ 24h). La durée de séchage pour les fèces est de 48 h à la même température.

I. 4. 2. Matière organique (MO) et minérale

La teneur en matière organique est obtenue après calcination des échantillons secs à 550 °C pendant 12h dans un four électrique à moufle. La perte de poids observée au cours d'incinération correspond à la MO et le résidu aux cendres ou matières minérales.

I. 4. 3. Constituants pariétaux

Les constituants pariétaux NDF (Neutral Detergent Fibre) et ADF (Acid Detergent Fibre) sont dosés par la méthode⁸⁹ de Van Soest *et al.* (1991). Le principe de cette méthode consiste à solubiliser les sucres solubles, les polysaccharides de réserve et les substances pectiques par une solution neutre (NDS). Le résidu NDF, composé d'hémicelluloses, de cellulose et de lignine, est successivement traité par l'action d'une solution acide (ADS) pour l'obtention du résidu ADF contenant de la cellulose et lignine. Le NDF et le ADF sont exprimés sans cendres résiduelles.

I. 5. Analyse statistiques

Les données relatives aux pH, E_h , $\log PO_2$, AGV_t , proportions d'AGV, concentrations de lactate et d'ammoniac sont analysées avec le GLM du logiciel SPSS Version 13.0 pour Windows, SPSS Inc., IL, USA) en mesures répétées. Le model choisi est identique à celui utilisé dans le chapitre précédent.

Pour chaque paramètre, les données de la digestibilité apparente sont traitées par GLM en mesures univariées par le même logiciel et une comparaison par paire a été effectuée. Le modèle statistique est comme suit :

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + V_j + P_k + e_{ijk}$$

⁸⁹ Voir Annexe 4

Y_{ijkl} = variable étudiée ; μ = moyenne de la population ; T_i = effet fixé du traitement ; V_j = effet aléatoire de la vache ; P_k = effet fixé de la période ; e_{ijk} = erreur résiduelle aléatoire. Seules les différences déclarées significatives à $P < 0,05$ et les tendances à $P < 0,1$ sont rapportées.

II. RÉSULTATS

II. 1. Effet sur le pH ruminal

Le pH du contenu du rumen avec le régime **T** varie entre 6,41 et 5,57, soit un écart moyen de 0,84. Avec l'apport de 5g de levure, cet écart est de 0,63 pour une plage de variation qui se situe entre 6,53 et 5,90 (Figure 39). L'apport de 150g de BS génère un écart de 0,57 pour une plage de variation qui varie entre 6,51 et 5,94. Pour les 3 régimes, la chute du pH amorcée une heure après le repas et qui se prolonge 4 heures durant, atteint une valeur minimale au temps T_5 . Au terme de ces 4 heures, le pH ruminal se stabilise puis

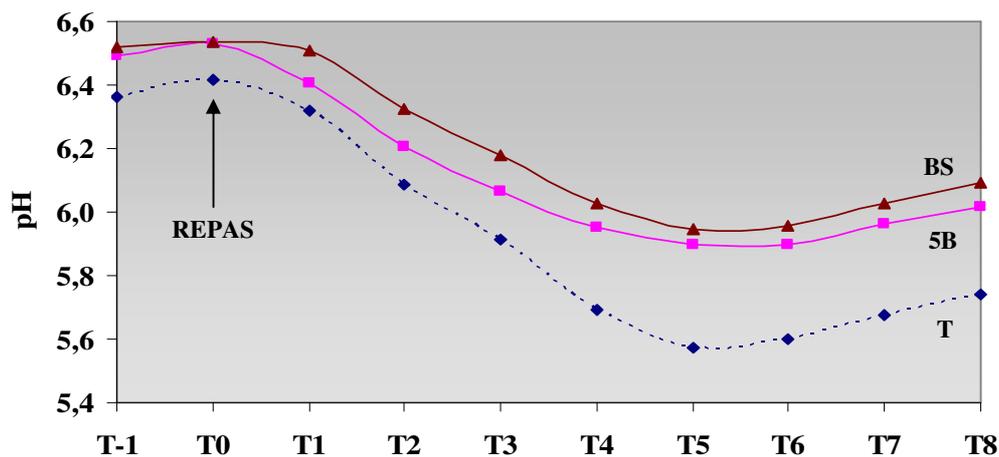


Fig. 39. Evolution du pH ruminal chez la vache en lactation (effet levure vs. bicarbonate) remonte progressivement vers la valeur initiale pour les régimes **5B** et **BS** tandis que pour le régime **T**, le pH se maintient en permanence au dessous de 6.

Tableau 34. Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur le pH ruminal

	Traitements				P		
	T	5B	BS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
pH	5,94 ^a	6,14 ^b	6,21 ^b	0,02	<0,05	<0,01	<0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

Les valeurs moyennes de pH sur la période de mesures sont respectivement de 5,94, 6,14 et 6,21 pour les régimes **T**, **5B** et **BS**. Les pH de **5B** et **BS** ne sont pas différents entre eux mais significativement différents du pH témoin à $P < 0,05$ et entre T_3 et T_8 à $P < 0,01$ (Tableau 34).

II. 2. Effet sur le E_h ruminal

Le potentiel redox du régime **T** évolue entre -88 et -134 mV ; la valeur moyenne sur la période étant de -115 mV (Figure 40).

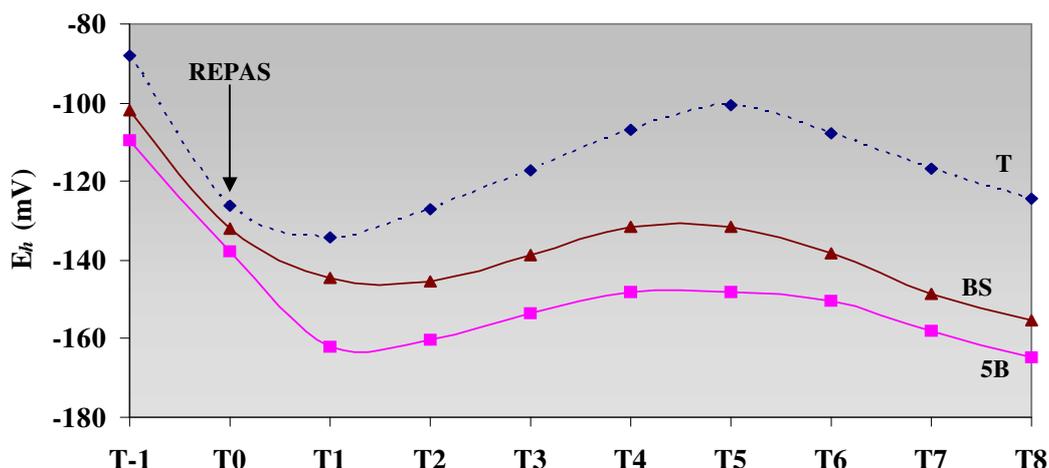


Fig. 40. Evolution du E_h ruminal chez la vache en lactation (effet levure vs. bicarbonate)

L'apport de 5g de levure probiotique (**5B**) abaisse le niveau du E_h qui évolue alors entre -109 et -165 mV pour une moyenne sur la période de $-149,3$ mV. Avec le régime **BS**, le E_h en situation intermédiaire, se situe entre -102 et -155 mV pour une valeur moyenne sur la période de $-136,8$ mV. Les apports respectifs de 5g de levure et de 150g de BS abaissent significativement par rapport au témoin, le E_h ruminal de 34,3 et 21,8 mV mais l'effet levure sur le E_h est significativement ($P < 0,05$) plus élevé que celui du bicarbonate de sodium (Tableau 35).

Tableau 35. Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur le E_h ruminal

	Traitements				P		
	T	5B	BS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
E_h (mV)	$-115,0^a$	$-149,3^c$	$-136,8^b$	5,35	$<0,05$	$<0,01$	$<0,05$

^{a, b, c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 3. La pression partielle en oxygène du rumen

Les cinétiques du log (PO_2) qui illustrent le caractère anaérobie du milieu montrent une même tendance évolutive pré et postprandiale pour les trois régimes (Figure 40). Les valeurs de log (PO_2) pour le régime T varient entre -59 et -64 avec une moyenne de -62,3.

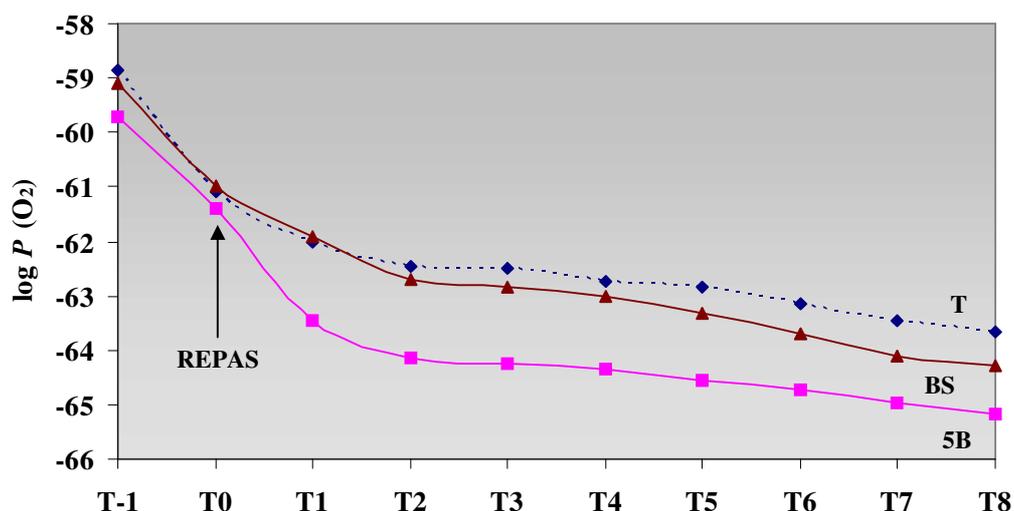


Fig. 40. Evolution du log PO_2 ruminal chez la vache en lactation (effet levure vs. bicarbonate)

Pour les régimes **5B** et **BS**, les courbes de la pression partielles de l' O_2 évoluent entre -60 et -65 (moyenne de -63,7) et entre -59 et -64 (moyenne de -62,6) respectivement. Cette augmentation du pouvoir réducteur du milieu ruminal sous l'effet d'un apport de levure, se traduit par une différence significative 1,4 unité log de la pression partielle en oxygène (Tableau 36). Par contre, aucune différence n'est observée entre le régime **BS** et le régime **T**.

Tableau 36. Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur le log (PO_2) ruminal

	Traitements				P		
	T	5B	BS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
log (PO_2)	- 62,3 ^a	- 63,7 ^b	- 62,6 ^a	0,25	<0,05	<0,01	>0,05

^{a,b} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P>0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 4. Effet sur les concentrations ruminales en AGV et lactate

Entre les régimes **5B** et **BS**, les concentrations en AGV (respectivement 99,4 et 95,3 mM) sont semblables mais diffèrent significativement avec le régime témoin (85,3 mM).

Tableau 37. Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur les paramètres fermentaires

	Traitement				P		
	T	5B	BS	ESM	Trait	Temps	Trait x Temps
AGV _t (mM)	85,3 ^a	99,4 ^b	95,3 ^b	1,52	<0,05	<0,01	>0,05
C ₂ (mM)	53,2 ^a	59,1 ^b	60,8 ^b	0,99	<0,05	<0,01	<0,05
C ₃ (mM)	18,0 ^a	25,8 ^b	20,0 ^a	0,49	<0,01	<0,01	<0,05
C ₄ (mM)	10,6	10,2	10,1	0,25	>0,05	>0,05	>0,05
D-lactate (mM)	8,1 ^b	3,5 ^a	8,7 ^b	0,81	<0,05	<0,01	<0,05
L-lactate (mM)	8,4 ^c	1,9 ^a	3,5 ^b	1,14	<0,05	<0,01	<0,05
D- et L- lactate (mM)	16,5 ^b	5,4 ^a	12,2 ^b	1,57	<0,05	<0,01	<0,05

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P > 0,05$)

ESM : erreur standard à la moyenne

Par rapport au témoin, une augmentation significative de la concentration en AGV_t de 16,5% est observée avec le régime **5B** alors qu'elle n'est que de 11,7% avec le régime **BS**. Les teneurs en acétate sont modifiées par la levure probiotique et le bicarbonate de sodium par rapport au régime **T** (59,1 et 60,8 vs 53,2 mM). L'apport de levure augmente la concentration en propionate (+ 43%) par rapport aux régimes **T** et **BS**. Aucune différence pour le butyrate, n'est observée entre les régimes. Les rapports C₂/C₃ sont respectivement pour les régimes **T**, **5B** et **BS** de 3,0, 2,3 et 3,0.

Avec le régime **5B**, la teneur en lactate est significativement diminuée de 67% ($P < 0,05$) par rapport au régime **T** (5,4 vs 16,5 mM) alors qu'aucun effet n'est noté avec le régime **BS** (Tableau 37). Des baisses significatives en L-lactate sont observées pour les deux régimes **5B** et **BS** alors que seul le régime **5B** a un effet significatif sur le D-Lactate.

II. 5. La concentration ruminale en ammoniac

Pour les régimes **T**, **B** et **BS**, les teneurs ruminales en NH_3 (Tableau 38) sont non significatives avec des moyennes respectives de 271,8, 256,8 et 248,4 mg/L.

Tableau 38. Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur la concentration en ammoniac

	Traitements				P		
	T	5B	BS	ESM	Trait	Temps	Trait × Temps
NH₃ (mg/L)	271,8	256,8	248,4	12,6	>0,05	<0,01	>0,05

ESM : erreur standard à la moyenne

II. 6. La digestibilité apparente de la ration

Les résultats de la digestibilité de la MS, de la MO, du NDF et de l'ADF sont reportés dans le Tableau 39. En comparaison aux régimes **T** et **BS**, la complémentation par la levure se traduit par une tendance ($P < 0,1$) à une meilleure utilisation digestive de la MS (+ 5%) et de la MO (+ 4,4%).

Tableau 39. Effet d'un apport de levure probiotique et de substance tampon sur la digestibilité apparente de la ration

	Traitement				P
	T	5B	BS	ESM	Trait
d MS (%)	59,0 ^x	64,0 ^y	58,5 ^x	1,81	<0,1
d MO (%)	62,2 ^x	66,6 ^y	61,7 ^x	2,30	<0,1
d NDF (%)	29,6 ^a	41,6 ^b	34,3 ^a	2,62	<0,05
d ADF (%)	18,1 ^a	32,3 ^c	24,2 ^b	2,89	<0,05

^{a,b,c} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P \geq 0,05$)

^{x, y} Les valeurs moyennes sur une même ligne affectées d'un même exposant ne sont pas statistiquement différentes entre elles ($P \geq 0,1$)

ESM : erreur standard à la moyenne

La digestibilité de la fraction NDF est améliorée ($P < 0,05$) par l'apport de levures au regard de **T** et de **BS** (41,6% vs 29,6 et 34,3%). Les valeurs concernant la digestibilité de la fraction ADF diffèrent de façon significative entre les régimes **T**, **5B** et **BS**,

(respectivement 18,1, 32,3 et 24,2 %). L'effet est plus marqué pour le régime **5B** que pour le régime **BS** ; les augmentations sont respectivement de 78,5% et 33,7% par rapport au régime **T**.

III. DISCUSSION

Les résultats obtenus dans cette partie de notre travail relatifs à une comparaison des effets de la levure probiotique et du bicarbonate de sodium comme additifs dans une ration acidogène ingérée par des vaches en lactation, vont nous permettre de confirmer leur efficacité comme stabilisateur du pH ruminal.

III. 1. L'effet du bicarbonate de sodium (BS) sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen et son mode d'action.

Au cours de cette étude, l'addition de BS dans le régime provoque une hausse du pH moyen de 0,27 unité par rapport au témoin et cela confirme la différence de 0,26 unité pH obtenue par une méta-analyse (Erdman, 1988). Plusieurs modes d'action du tampon bicarbonate ont été évoqués et un des premiers schémas (Davis *et al.*, 1964) a montré que le BS augmentait le flux salivaire. Lors d'une alimentation riche en concentrés, la fermentation de la matière organique dans le rumen résulte en la formation d'acides qui peuvent s'accumuler jusqu'à des concentrations de 57 à 162 mM (Turner and Hodgetts, 1954) qui correspondent aux valeurs de pH variant de 7,03 à 5,80. Puisque, le rumen ne sécrète pas de substances tampons, il a été suggéré que le milieu ruminal dépend principalement de la sécrétion issue des glandes salivaires pour neutraliser l'excès de protons dans le milieu (Stokes and Bull, 1986). Herold *et al.* (1978) ont montré *in vitro* que l'addition de BS accroît le pouvoir tampon du milieu ruminal évitant ainsi une baisse de pH. D'autres travaux chez la vache laitière (Kilmer *et al.*, 1981 ; Erdman *et al.*, 1982) montrent que l'effet tampon se produit habituellement entre 4 et 8h post-prandiales, lorsque le pH ruminal est minimal. L'effet des substances tampons seraient plus prononcé selon Kohn et Dunlap (1998) à des valeurs de pH inférieures à 6 alors qu'un moindre effet est noté à des valeurs supérieures à 6.

Cependant, cette stabilisation du pH ruminal ne semble ni être associée à une augmentation des concentrations d'AGV ni à des teneurs ruminales en lactate élevées lorsque la ration comporte du BS. Elle résulte du fait que le bicarbonate de sodium a une forte capacité à capter des protons, exerçant ainsi son effet tampon (Le Ruyet and Tucker,

1992). L'ajout de BS (NaHCO_3) dans le rumen se dissocie en Na^+ et HCO_3^- . A un pH bas, l'ion bicarbonate reste sous la forme d'ion dissocié alors qu'à des valeurs élevées de pH, l'ion HCO_3^- est converti en H_2CO_3 pour ensuite être éructer du rumen sous forme de CO_2 (Turner and Hodgets, 1954 ; Russell and Chow, 1993).

Certains auteurs (Harrison *et al.*, 1975 ; Rogers *et al.*, 1982) ont aussi suggéré que le bicarbonate influence la pression osmotique du rumen en augmentant le taux de dilution. Incorporé dans la ration ou directement dans le rumen, le bicarbonate provoque une augmentation du taux de dilution qui est attribuée à un transit rapide de l'amidon du milieu ruminal. Cela entraînerait alors une diminution de 50% du propionate alors que la concentration en acétate augmente de 28 % (Thomson *et al.*, 1978). Bien que la quantité de BS utilisée dans ces travaux était largement supérieure (0,28 kg BS/j) à celle apportée généralement dans la ration des vaches en lactation, la dégradation de l'amidon et la teneur en propionate semblent être influencer par la dilution ruminale générée (Russell and Chow, 1993) et expliquerait par conséquent nos concentrations inchangées en propionate lors de l'ajout de BS dans la ration.

Il est généralement admis que la digestibilité des constituants d'une ration est améliorée lorsque le pH ruminal est maintenu au dessus d'un seuil critique (Mould and Orskov, 1983). De plus, il est bien établi que la dégradation des fibres est inhibée à des pH inférieurs à 6, ceci étant probablement liée à l'énergie disponible pour la croissance d'une certaine flore ruminale ainsi qu'aux voies de fermentations microbiennes (Russell and Wilson, 1996). Le cellulolyse serait donc pH-dépendante. L'addition de BS dans la ration améliorerait la digestion de la fraction ADF de la ration en évitant la chute du pH ruminal (Terry *et al.*, 1969 ; Erdman, 1988).

L'apport de bicarbonate de sodium dans l'alimentation des vaches laitières a pour effet de réduire les fluctuations du pH ruminal post-prandiales. La stabilisation chimique du pH est due au seul pouvoir tampon du bicarbonate et son effet sur la digestion des fibres est limité à la fraction ADF.

III. 2. Comparaison entre la levure probiotique et le bicarbonate de sodium

L'incorporation de la levure probiotique dans la ration montre aussi une stabilisation du pH ruminal. Dans la présente étude, une différence de +0,2 unité pH est enregistrée en comparaison avec le témoin. Elle est partiellement en accord avec les

résultats enregistrés précédemment mais la différence notée est inférieure à celle prévue (0,4 unité) en raison d'un caractère moins acidogène de la ration utilisée. Elle confirme cependant les travaux antérieurs rapportés par Fiems *et al.* (1993) et par Michalet-Doreau et Morand (1996). Par sa seule présence pourtant, la levure ne peut comme le bicarbonate améliorer le pouvoir tampon du rumen. Elle intervient comme nous l'avons déjà précisé par sa capacité à diminuer le potentiel redox du milieu offrant ainsi aux bactéries utilisatrices de lactate, un environnement ruminal favorable à la transformation du lactate en propionate comme le confirment encore les résultats obtenus dans cet essai. Ainsi par des voies différentes, le bicarbonate de sodium et la levure probiotique parviennent l'un et l'autre à stabiliser le pH ruminal chez des animaux en production soumis à des régimes à tendance acidogène.

La levure probiotique semble être à l'origine d'une baisse significative de la teneur ruminale en lactate. Comme parallèlement la proportion de propionate est augmentée, la levure en améliorant l'environnement semble favoriser la réduction du lactate en propionate par la voie de l'acrylate (Baldwin *et al.*, 1962). La présence de lactate en concentration non négligeable est principalement le résultat du niveau d'ingestion et de la nature de la ration (Counotte and Prins, 1979). Lors d'une fermentation intense, le rumen possède une microflore spécifique qui fermente le lactate, particulièrement *Megasphaera elsdenii* et *Selenomonas ruminantium*. En présence de levure, l'activité de ces bactéries anaérobies utilisatrices de lactate est augmentée (Newbold *et al.*, 1996). Ainsi, le pH ruminal est maintenu au dessus d'un seuil qui permettrait selon Roger *et al.* (1990), la digestion de la partie fibreuse grâce à une meilleure adhésion des bactéries cellulolytiques.

Quelques bactéries du rumen présentent la capacité d'utiliser les tissus pariétaux comme seule source de carbone (Chen and Wolin, 1979 ; Henderson *et al.*, 1981). Les trois espèces bactériennes cellulolytiques les plus importantes sont *Bacteriodes succinogenes*, *Ruminococcus flavefasciens* et *Ruminococcus albus*. *B. succinogenes* est impliqué dans la digestion de fibre ayant une faible digestibilité telle que la paille de céréales (Stewart *et al.*, 1979) alors que les ruminococcidies digèrent plus facilement les fibres moins structurées (Mackie *et al.*, 1978). L'activité de ces bactéries dans le milieu ruminal est très sensible aux fluctuations de pH qui, à de faibles valeurs inhiberaient fortement la cellulolyse (Russell and Wilson, 1996). Cependant, l'étude de Mould et Orskov (1983) fait ressortir que lors d'un apport de bicarbonate par infusion dans le rumen, la cellulolyse n'est que partiellement restaurée chez le mouton alimenté avec une ration riche en GRF. Cela

prouverait comme le suggère Offer (1993) que le pH pourrait ne pas être le seul paramètre à définir l'activité des bactéries cellulolytiques.

Comme la mesure du potentiel redox est un indicateur de l'activité de la flore ruminale (Marounek *et al.*, 1982), notre étude pourrait apporter avec cette approche un autre élément déterminant pour la compréhension de l'activité cellulolytique du rumen. Etant des anaérobies strictes, les cellulolytiques requièrent en conséquence un niveau d'anaérobiose particulier et seraient donc plus avantageées par un apport de levure probiotique que par apport de bicarbonate.

En présence de levure, une baisse significative des valeurs du E_h est enregistrée qui corrobore les résultats de Mathieu *et al.* (1996) et caractérise ainsi un milieu plus réducteur que celui de la ration sans levure. Weidmeier *et al.* (1987) ont montré chez la vache que la levure probiotique stimule la croissance de l'ensemble des bactéries anaérobies du rumen et que chez le mouton (Chaucheyras *et al.*, 1997), des augmentations de la proportion d'ARN ribosomal de bactéries cellulolytiques sont rapportées en présence de levure. Comme la digestion des fibres avec le régime levure est améliorée, il nous semble évident de mettre en relation la diminution du E_h avec l'accroissement de la population bactérienne anaérobie responsable de cette dégradation.

L'apport de levure comme celui du bicarbonate a pour effet de stabiliser le pH ruminal. Cette stabilisation qui ne peut être attribuée à un effet tampon résulte d'une stimulation de l'activité des bactéries anaérobies strictes que sont les bactéries utilisatrices de lactate. En abaissant le potentiel redox du milieu ruminal, la levure favorise l'activité de l'ensemble des bactéries anaérobies strictes (bactéries utilisatrices de lactate et bactéries cellulolytiques) qui explique la meilleure utilisation digestive observée des fibres.

IV. CONCLUSIONS

Cet essai comparatif a permis de différencier les modes d'action de ces deux additifs alimentaires. Le bicarbonate de sodium a pour fonction première de tamponner le milieu ruminal par la captation des protons sans pour autant modifier les conditions réductrices du rumen. Cette étude confirme donc que l'apport de bicarbonate dans la ration stabilise le pH ruminal et influence légèrement l'activité des bactéries cellulolytiques. La

levure dans le rumen augmente le pouvoir réducteur et favorise ainsi l'activité des bactéries anaérobies strictes qui se répercute à la fois sur la stabilisation du pH et sur la digestion des fibres.

**DISCUSSION GÉNÉRALE,
CONCLUSIONS
& PERSPECTIVES**

Ce mémoire rassemble l'essentiel des résultats que nous avons obtenu dans le cadre d'une recherche dont l'objectif était de préciser le mode d'action de la levure probiotique utilisée en qualité d'additif alimentaire chez la vache laitière. Nous avons voulu contribuer à une meilleure connaissance et à une meilleure compréhension de l'activité ruminale de *Saccharomyces cerevisiae* au bénéfice de l'animal hôte. En nous appuyant sur les travaux antérieurs (Rose, 1987 ; Wallace, 1994 ; Newbold *et al.*, 1995 ; Newbold *et al.*, 1996), nous avons attribué *a priori* à la levure une aptitude particulière à abaisser la pression partielle de l'oxygène dans le contenu ruminal et en conséquence, celle d'en renforcer le caractère réducteur. Pour mesurer l'activité fermentaire ruminale, nous avons retenu dans notre démarche méthodologique le suivi des paramètres physico-chimiques (pH et E_h) et fermentaires (AGV, lactate et NH_3) dans des conditions respectant au mieux les propriétés digestives intrinsèques du rumen. Nous avons évalué la pression partielle de l' O_2 , calculée en terme de $\log P(O_2)$ selon la relation de Nernst en fonction des valeurs de pH et E_h . L'objectif était de préciser l'effet levure sur le caractère plus ou moins anaérobie du milieu de fermentation sans ignorer que la signification biologique d'une telle mesure peut paraître discutable.

Les résultats acquis chez des vaches tarées et chez des vaches en lactation, montrent que la levure *S. cerevisiae* peut modifier l'ensemble de ces paramètres lorsque la ration proposée contient une partie importante de GRF qui lui confère un caractère acidogène. La levure probiotique, dans nos conditions expérimentales, a la capacité de stabiliser le pH ruminal, d'abaisser le potentiel redox et de renforcer le caractère réducteur du milieu.

Contrairement à la chimie des sols qui a largement fait appel à l'application de la thermodynamique (Rowell, 1981 ; Tardy *et al.*, 1999 ; Picek *et al.*, 2000 ; Antonini *et al.*, 2001), les chercheurs, pour une meilleure compréhension des processus fermentaires dans le tractus digestif des herbivores monogastriques ou des ruminants, n'ont jusqu'à présent que peu utilisé ces concepts (Kohn and Dunlap, 1998 ; Kohn and Boston, 2000 ; Offner and Sauvant, 2006). En conséquence, les conclusions auxquelles nous parvenons ne peuvent être confrontées pour confirmation à des résultats antérieurs. Il en résulte que l'originalité de notre démarche apparaît alors comme un handicap qui a tendance à restreindre en simples hypothèses ou en pures spéculations des conclusions qui adhèrent pourtant à la rigueur des lois de la thermodynamique.

Le mode d'action de la levure probiotique

De l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail, il ressort que la capacité de la levure à exercer son effet probiotique chez le ruminant réside dans la stabilisation du pH ruminal comme l'ont déjà mis en évidence de nombreux auteurs (Williams *et al.*, 1991 ; Wallace and Newbold, 1992 ; Fiems *et al.*, 1993 ; Kumar *et al.*, 1994 ; Michalet-Doreau and Morand, 1996). D'après nos résultats, cette stabilisation du pH s'accompagne d'une augmentation de la concentration en AGV totaux et d'une modification des teneurs en propionate et en lactate de la phase liquide ruminale. En accord avec Williams *et al.* (1991), la stabilisation du pH a été attribuée à une moindre concentration en lactate due au maintien en activité des bactéries utilisatrices de lactate telles que *S. ruminantium* et *M. elsdenii*, qui le transforment en propionate (Waldrip and Martin, 1993 ; Rossi *et al.*, 1995). Si nous avons pu observer que la levure permet de gérer le pH ruminal avec des rations à tendance acidogène, son mode d'action vis-à-vis de ce paramètre demande à être discuté.

Les hypothèses attribuant à la levure la production et la fourniture de molécules facteurs de croissance à certaines flores bactériennes ou sa capacité à entrer en compétition avec elles pour l'utilisation des oses dans le milieu ruminal ont été abordées dans notre synthèse bibliographique. Sans toutefois les écarter complètement, c'est le concept d'une levure capable de renforcer le caractère anaérobie du milieu que nous avons privilégié. En effet nous avons montré que la levure abaisse le potentiel redox du contenu du rumen lorsque le régime a un caractère acidogène. En accord avec Giger-Reverdin *et al.* (2006), les résultats obtenus lors d'un apport d'O₂ sur la microflore ruminale confirment que les variations du E_h dépendent plus de l'intensité des activités fermentaires microbiennes que de l'effet négatif de l'O₂. En conséquence, nous n'avons utilisé les valeurs calculées de PO₂ que pour donner une image du niveau d'anaérobiose caractérisant certaines situations fermentaires du rumen, mais en aucun cas pour traduire l'activité métabolique de la levure même si cette dernière se répercute sur les valeurs de PO₂ comme s'il y avait une véritable consommation d'oxygène. Nous retiendrons que dans ce milieu fermentaire particulier, les microorganismes anaérobies au même titre que la levure, possèdent leur propre pouvoir réducteur : c'est cette capacité qu'ils ont à libérer des électrons qui leur assure leur approvisionnement énergétique. Cet aspect du métabolisme énergétique des microorganismes sera développé plus loin.

Le caractère acidogène de la ration offerte à l'animal se traduit par une baisse du pH ruminal provoquée par une accumulation plus ou moins importante de lactate. La

stabilisation du pH obtenue par l'apport de levure, trouve son explication dans le renforcement du pouvoir réducteur qu'elle génère et qui devient plus favorable à l'activité des bactéries anaérobies strictes utilisatrices de lactate. Toutefois, le caractère acidogène d'une ration selon certains auteurs (Brossard *et al.*, 2006 ; Martin *et al.*, 2006 ; Peyraud and Apper-Bossard, 2006 ; Sauvart *et al.*, 2006) se traduit par une accumulation de butyrate et par l'absence de lactate. Dans ces conditions, il est probable que les mécanismes envisagés ici pour la levure demeurent sans effet mais cela demande à être vérifié.

Les travaux qui ont eu pour objectif de mettre en évidence par des techniques *in vitro* l'effet de la levure probiotique sur la stabilisation du pH n'ont à notre connaissance jamais clairement abouti (Martin *et al.*, 1989 ; Dawson *et al.*, 1990 ; Jouany *et al.*, 1994 ; Zelenak *et al.*, 1994 ; Kung *et al.*, 1997 ; Miller-Webster *et al.*, 2002). Deux raisons pourraient en être responsables. La première réside dans le fait que les méthodes *in vitro* mises en œuvre par la plupart des auteurs (Warner, 1956 ; Czerkawski and Breckenridge, 1977 ; Newbold *et al.*, 1995) en RUSITEC ou culture en batch, utilisent un milieu fortement tamponné. La salive artificielle contenant des phosphates et des bicarbonates a un pH voisin de la neutralité. Dans ces conditions, si le milieu témoin ne peut s'acidifier, il paraît difficile à la levure d'exprimer ses capacités intrinsèques. Une deuxième raison pourrait être attribuée au concept même de la fermentation *in vitro*. Le contenu du rumen est un milieu fortement réducteur qui abrite une biocénose variée au sein de laquelle prolifèrent des groupes bactériens anaérobies stricts comme les *Archaea* bactéries parmi lesquelles figurent les méthanogènes. Selon Smith et Hungate (1958), les méthanogènes requièrent un niveau d'anaérobiose tel qu'il est quasi impossible de les cultiver. L'apport de substances réductrices comme le dithiothréitol ou dithioérythritol (Newbold *et al.*, 1996) qui abaissent le E_h à -50 mV (Walden and Hentges, 1975) n'est pas convaincant parce que le E_h généré n'est pas comparable à celui de l'environnement naturel et parce que des risques de toxicité ne sont pas à écarter (Fonty *et al.*, 1995). Comme la levure semble agir par le biais de son propre pouvoir réducteur et du E_h qu'elle génère, si le milieu n'est pas en tout point comparable au milieu naturel, les différentes populations bactériennes qui composent la biocénose ne peuvent correctement s'exprimer.

Par ailleurs, de nombreux essais zootechniques réalisés pour la majorité sur les bovins viande et aussi sur les bovins laitiers n'ont pu mettre clairement en évidence d'effet significatif de la levure probiotique (Plata *et al.*, 1994 ; Soder and Holden, 1999 ; Cabrera *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2001). Dans la plupart des cas, les régimes alloués ne présentent pas de caractère acidogène car ils sont le plus souvent à base de fourrage. Alors pourquoi

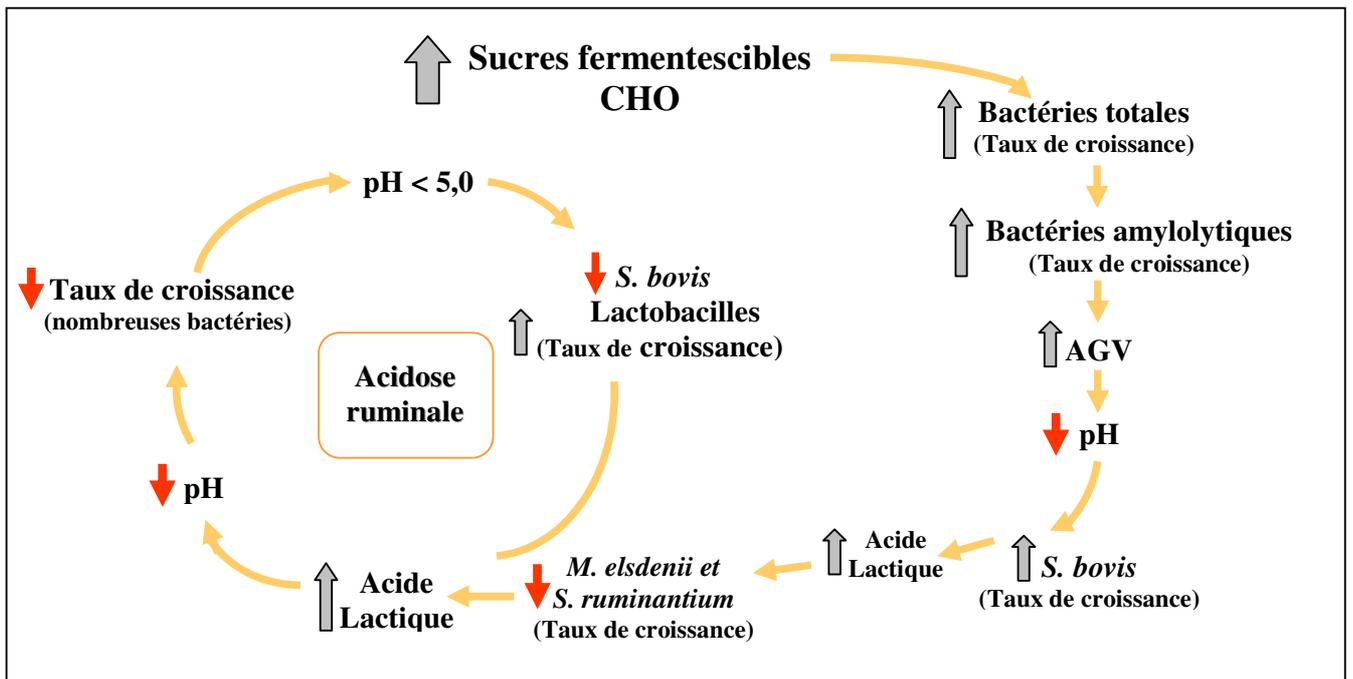


Fig. 42. Concept organisé autour du pH relatant les événements associés à l'installation de l'acidose ruminale (Adaptée de Nocek, 1997)

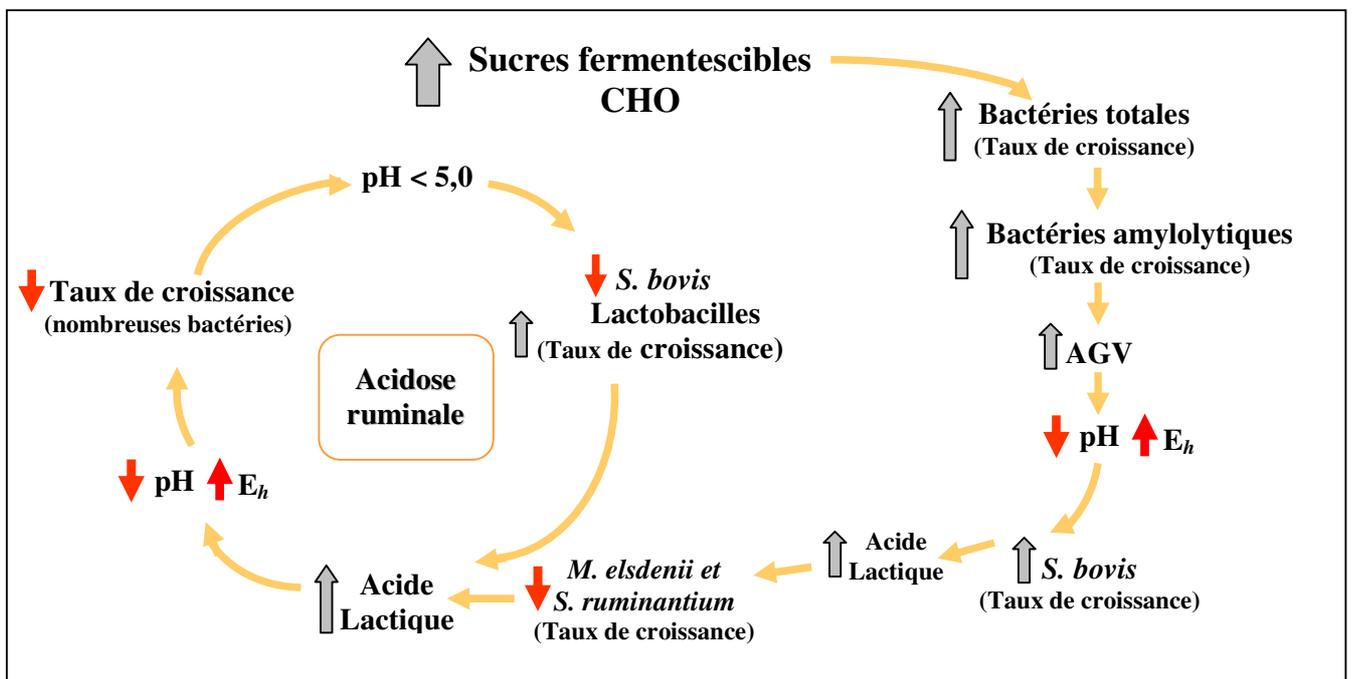


Fig. 43. Organisation des événements faisant intervenir le pH et le E_h lors de l'installation de l'acidose ruminale

dans ces conditions la levure reste-t-elle sans effet ? Un régime riche en GRF est favorable au développement et la croissance des bactéries amylolytiques notamment de *S. bovis* (Russell and Hino, 1985) qui fermentent le glucose en lactate initiant ainsi une acidification du milieu ruminal (Figure 42). Le potentiel redox que l'on mesure avec un tel régime est de l'ordre de -130 à -150 mV, variant avec le niveau d'ingestion et la vitesse de transit (Figure 43). Un régime riche en fourrage est favorable au développement des bactéries cellulolytiques. Le E_h que l'on mesure avec ce régime est de l'ordre de -180 mV. Le E_h du milieu ruminal semble être dépendant du pouvoir réducteur du groupe bactérien dominant ou d'un groupe bactérien en activité. Le pouvoir réducteur des amylolytiques, dans leur quête d'énergie, serait ainsi moins accentué que celui des cellulolytiques en croissance. Perry et Briggs (1955) suggéraient déjà que les bactéries amylolytiques étaient moins exigeantes sur la valeur négative du E_h que les bactéries cellulolytiques, mais ne leur avaient pas conféré de pouvoir réducteur.

La levure *S. cerevisiae* incorporée dans une ration riche en GRF a pour effet d'abaisser le potentiel redox (Figure 44) et de le positionner au niveau de celui enregistré avec une ration à base de fourrage. La levure aurait ainsi un pouvoir réducteur dont le niveau serait équivalent à celui d'une biocénose cellulolytique.

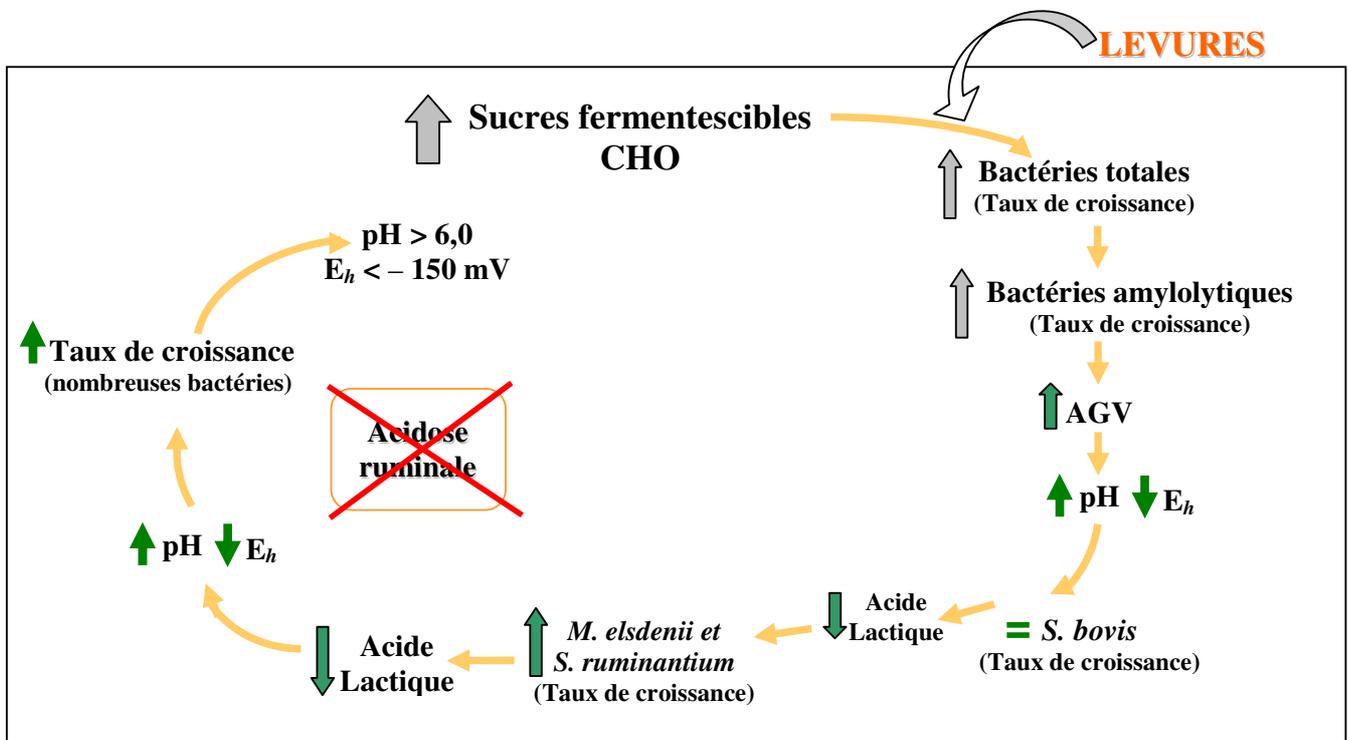


Fig. 44. Le mode d'action de la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae*

Avec une ration riche en fourrage, la levure ne peut abaisser le potentiel redox et exercer une action bénéfique sur les bactéries anaérobies strictes que sont les cellulolytiques et les utilisatrices de lactate qui se trouvent déjà dans un milieu favorable.

Au-delà de l'activité de la levure, l'utilisation du potentiel redox apparaît comme un paramètre essentiel pour caractériser un milieu biologique et notamment le rumen où d'intenses fermentations se produisent.

De la signification chimique à la signification biologique du potentiel redox

Le potentiel redox (E_h) traduit l'intensité du caractère oxydant et/ou réducteur susceptibles d'intervenir selon différentes voies sur le métabolisme et la physiologie de la cellule microbienne dans son aptitude à la croissance (Aubert *et al.*, 2002). Dans l'approche des fermentations ruminales, il est considéré comme critère d'évaluation du niveau d'anaérobiose (Giger-Reverdin *et al.*, 2006). Le E_h dans sa signification concrète exprime la capacité d'une espèce chimique à donner ou à capturer des électrons, *i.e.* la tendance d'un milieu à échanger des électrons lors de réactions d'oxydo-réduction qui sont à l'origine des transferts d'énergie entre la flore et son substrat (Jacob, 1970). Selon Hentges et Maeir (1972), le E_h est la force électromotrice exprimée en Volts des couples d'oxydo-réduction dominants ou actifs dans le milieu.

Le sens du transfert des électrons est réglé par la thermodynamique. Chaque espèce chimique existe sous deux formes, la forme oxydée et la forme réduite, qui définissent un couple d'oxydo-réduction affecté d'un potentiel (Pelmont, 1993). Un transfert d'électrons d'un donneur à un accepteur ne s'effectue spontanément que si la variation de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) entre l'état initial (espèce oxydée) et l'état final (espèce réduite) est négative, c'est-à-dire si la réaction est exergonique. Une réaction libère de l'énergie si le transfert d'électrons s'effectue en remontant dans l'échelle des potentiels, des valeurs négatives vers des valeurs moins négatives ou positives. L'énergie libre d'une réaction exergonique est d'autant plus grande que les demi réactions sont éloignées (Prescott *et al.*, 2003).

Ainsi dans le monde du vivant, la récupération de l'énergie libre par le métabolisme associe dans une réaction couplée, une réaction exergonique du catabolisme à une réaction endergonique de l'anabolisme. Il est évident que les électrons échangés au cours du

métabolisme cellulaire sont portés par paliers successifs à un potentiel de moins en moins négatif vers l'accepteur final.

En aérobiose, l'oxygène est cet accepteur final et le potentiel du couple O_2/H_2O qui est de + 0,815 V fait de l' O_2 un accepteur préférentiel d'électrons (Onderdonk *et al.*, 1976). Lorsque dans un milieu l' O_2 dans sa quasi-totalité se trouve sous sa forme réduite, d'autres oxydants moins puissants sont souvent en mesure de prendre le relais mais pour une moindre libération d'énergie. Les bactéries aérobies strictes ne peuvent se passer d'oxygène car elles ne disposent d'aucun mécanisme alternatif suffisant pour assurer leur métabolisme énergétique (Morris, 1976). *A contrario*, les bactéries anaérobies strictes ne disposent pas d'oxygène comme accepteur final d'électrons mais se développent selon une voie métabolique différente, la respiration anaérobie. Dans ce cas, les échanges d'électrons sont rendus possibles par un accepteur final lui-même produit par le métabolisme microbien : le CO_2 peut jouer ce rôle (Fonty *et al.*, 1995).

Dans la phase liquide du rumen, le E_h mesuré indique que le rumen est un milieu fortement réducteur. Bien qu'on ne connaisse pas tous les couples d'oxydo-réduction concernés par cette fourchette de valeurs, lorsque selon Rowell (1981) les valeurs mesurées se rapprochent de -168 mV à pH 6, le couple CO_2/CH_4 pourrait être le couple impliqué et déterminant. Un potentiel redox mesuré à -168 mV signifie que tous les accepteurs d'électrons dont le potentiel est supérieur à cette valeur sont présents en quasi-totalité sous leur seule forme réduite. Quand l' O_2 pénètre en quantité dans le rumen, il est d'abord présent dans la phase gazeuse mais lorsqu'il pénètre dans la phase liquide, il est prioritairement et rapidement utilisé comme accepteur d'électrons et immédiatement réduit en eau. Si l' O_2 était présent dans le milieu ruminal, le E_h prendrait une valeur positive et hors des limites acceptables pour les bactéries anaérobies strictes (Kurtz, 2003). La biocénose hébergée dans le rumen, ne peut avoir accès à l'énergie contenue dans les substrats disponibles qu'en mettant en œuvre des voies métaboliques telles que la fermentation ou la respiration anaérobie.

En milieu dépourvu d'oxygène, les bactéries extraient l'énergie dont elles ont besoin dans des réactions métaboliques en échangeant des électrons avec un accepteur final qui ne peut être l' O_2 , mais un produit issu de leur propre activité fermentaire. Le CO_2 est un accepteur final d'électrons pour des organismes en activité à un potentiel redox voisin de - 180 mV.

La flore ruminale détentrice d'un pouvoir réducteur

La fermentation ruminale est un processus exergonique qui convertit les aliments en AGV, en acide lactique, en ammoniac et en méthane. L'énergie ainsi libérée est utilisée par les microorganismes autochtones du rumen pour accroître ou maintenir leur activité et leur croissance (Russell, 1998). L'efficacité de l'activité microbienne se répercute sur les performances zootechniques du ruminant. La population microbienne ruminale majoritairement constituée de bactéries anaérobies qui ne cherche qu'à accroître sa biomasse, est parfois limitée par des perturbations telles que l'ingestion des aliments, l'eau de boisson et l'accumulation des produits terminaux de la digestion (Rémond *et al.*, 1995). Les espèces impliquées dans les fermentations métaboliques ont été isolées et leurs activités caractérisées (Hungate 1966). Puisque l'O₂ n'est pas disponible en tant qu'accepteur final d'électrons, d'autres moyens de récupération de l'énergie comme la respiration anaérobie, sont mis en œuvre pour la production d'ATP, monnaie énergétique indispensable à la croissance de la microflore.

Les bactéries du groupe *Archaea* auquel appartiennent les méthanogènes, sont présentes et familières des environnements extrêmes situés aux limites en termes de température, de pH, de salinité et/ou d'anaérobiose (Scäfer *et al.*, 1999). L'absence d'oxygène et le niveau du E_h désigne le rumen comme un environnement extrême, anaérobie, hautement réducteur et particulièrement favorable à la croissance les méthanogènes (Sauer and Teather, 1987). Les bactéries méthanogènes sont très sensibles à la présence d'O₂ et ne peuvent se développer tant que toute trace d'oxygène n'a pas été préalablement soustraite du milieu de culture (Smith and Hungate, 1958). Elles captent leur énergie en réduisant le CO₂ comme accepteur final d'électrons, en CH₄. La production de CH₄ semble être plus conséquente chez des animaux à la pâture (Johnson and Johnson, 1995) que chez des animaux recevant des rations riches en concentrés : la quantité de méthane est réduite de moitié à savoir de 28 à 15g de CH₄/L de lait produit (Sauvant, 1993). Il s'agit là principalement d'un effet ration qui permet à l'animal de mieux valoriser l'énergie alimentaire en limitant les pertes sous forme de méthane qui sont estimées à environ 8% de l'énergie brute ingérée et 12% de l'énergie digestible (Rochette *et al.*, 2005). Des additifs chimiques notamment le nitrate et le sulfate ont été expérimentés comme accepteurs d'électrons à la place du CO₂ (Weimer, 1998), ainsi que des additifs organiques tels que l'acrylate et le fumarate (Newbold *et al.*, 2005). La réduction du nitrate en nitrite toxique et la formation de H₂S ont révélé la nocivité du nitrate et du sulfate

utilisés en tant qu'additifs. Selon Joblin (1999), la voie alternative serait de produire d'avantage d'acétate par le processus d'acétogénèse réductrice. L'acétogénèse à partir du CO₂ a deux avantages : l'abondante disponibilité d'accepteurs d'électrons et la production d'acétate utilisable par l'animal. En Australie, des inoculations de flores acétogènes provenant de marsupiaux ont été tentées chez la vache et chez le mouton. Mais elles n'ont pas été entièrement satisfaisantes car les bactéries acétogènes très difficile à manipuler hors de leurs habitats naturels, requièrent un milieu plus réducteur que celui des méthanogènes.

Ces observations rejoignent la relation entre la nature de la ration et le E_h ruminal. Les valeurs de E_h enregistrées chez la vache tarie montrent qu'une ration fibreuse entraîne un caractère réducteur marqué (E_h = -192 mV) alors qu'une ration riche en concentrés amylicés est responsable d'un milieu ruminal moins réducteur (E_h = -176 mV). Au cours de essais chez les vaches en lactation qui consomment plus de matière sèche en comparaison aux vaches taries, le potentiel redox a tendance à augmenter de -176 à -134 mV. Bien que les rations ne soient pas comparables, une plus grande ingestion semble influencer grandement sur l'état réducteur du rumen par le biais de la vitesse de transit. Avec des rations comportant plus de sucres facilement fermentescibles et donc présentant un plus caractère acidogène le pouvoir réducteur diminue. On peut en déduire que c'est soit la ration soit les processus métaboliques de la flore ruminale associés aux différents types de régimes qui ont un rôle déterminant dans l'obtention d'un niveau réducteur. Mais comme la ration ne contient pas d'agents oxydants ou réducteurs permettant de réguler le E_h, il semble logique d'admettre avec Baldwin et Emery (1960a), que c'est la flore ruminale dominante qui exerce son effet sur le pouvoir réducteur du rumen. Ainsi, une flore amylolytique proliférerait à un niveau faiblement réducteur (Hungate, 1966) alors qu'une flore cellulolytique évoluerait à des valeurs de E_h très basses.

La flore ruminale dominante ou en activité serait déterminante du potentiel redox du rumen, environ de -150 mV pour les amylolytiques et environ de -180 mV pour les cellulolytiques, mais c'est la nature ou la composition de la ration qui détermine la flore ruminale dominante en fonction d'un apport plus ou moins élevé en énergie accessible aux différents groupes bactériens (amylolytiques, cellulolytiques et méthanogènes).

CONCLUSIONS

Dans l'objectif de préciser les effets de la levure chez la vache laitière, nous avons fondé notre réflexion sur une consommation de l'oxygène qui, selon divers auteurs, est une des hypothèses déjà formulées à l'égard du mode d'action du probiotique. Au cours de cette démarche, nous avons fait appel à l'équation de Nernst et au couple O_2/H_2O pour calculer la pression partielle ($\log PO_2$) dans le milieu ruminal à partir des valeurs mesurées de pH et de E_h . Dans les conditions ruminales, les valeurs de PO_2 calculées n'ont cependant pas de signification biologique en termes de nombre fini de molécules. Cet argument est vérifié par l'injection de l' O_2 sous forme de peroxyde d'hydrogène, qui montre la flore arrive à elle seule à détoxiquer le milieu et qu'en aucun cas celui-ci ne devient oxydant. Selon les résultats obtenus, un E_h d'environ -180 mV ne correspond pas à celui du couple d'oxydo-réduction O_2/H_2O mais plutôt au couple CO_2/CH_4 . Il est donc difficile d'admettre que la levure a la capacité de consommer l' O_2 qui n'est thermodynamiquement pas disponible car, à un $E_h = -180$ mV l' O_2 est immédiatement réduit en eau. L'absence de l' O_2 suggère que la levure en milieu anaérobie assure son métabolisme énergétique *via* une fermentation ou une respiration de type anaérobie qui est moins rentable en terme d'énergie et qui implique un transfert d'électrons échangés avec des accepteurs encore disponibles malgré un tel E_h .

L'apport quotidien de 5g de BIOSAF® dans une ration riche en GRF se traduit par une stabilisation du pH ruminal. La levure intervient sur le pH en renforçant le pouvoir réducteur qui est à l'origine de la diminution de la teneur en lactate et de l'augmentation de la concentration en AGV du contenu ruminal. En abaissant le E_h , la levure favorise l'activité des bactéries anaérobies strictes, celles qui transforment le lactate en propionate permettant au pH de se maintenir au dessus de 6, et celles responsables d'une production accrue d'AGV due à la dégradation des glucides pariétaux. La nature de la ration détermine la flore dominante ou en activité du rumen. La mesure du potentiel redox dans un tel milieu signifie un transfert d'électrons nécessaire pour la formation de l'ATP utilisé pour la croissance de la biocénose. Les amylolytiques semblent évoluer à un E_h de -150 mV alors que les cellulolytiques demandent un niveau réducteur plus bas, à un E_h de -180 mV. Ceci laisse donc penser qu'avec une ration riche en fibres, la levure n'a aucun effet sur le potentiel redox et n'agit pas sur les bactéries anaérobies strictes que sont les cellulolytiques et les utilisatrices de lactate qui se trouvent déjà dans un milieu favorable.

Par contre, dans une ration riche en GRF, la levure génère de par son métabolisme, un pouvoir réducteur dont le niveau serait équivalent à celui d'une biocénose cellulolytique.

La comparaison entre la levure et une substance tampon qui ont tous deux un effet stabilisateur sur le pH, nous a permis de différencier leur mode d'action. La mesure du potentiel redox apparaît comme un paramètre physico-chimique important qui vient compléter celle du pH pour aider à la compréhension du mode d'action de la levure et plus globalement de l'activité fermentaire ruminale. Elle permet partiellement d'envisager les mécanismes de captation d'énergie par les microorganismes autochtones du rumen et suggère qu'à des valeurs très basses de E_h , les bactéries cellulolytiques et utilisatrices de lactate comme la plupart des méthanogènes sont les seules à pouvoir utiliser des accepteurs d'électrons faibles comme le CO_2 , pour satisfaire leur besoin énergétique et augmenter les produits de fermentation utiles pour l'hôte.

En faisant ressortir que la nature de la ration est le déterminant majeur de la biocénose ruminale nous rejoignons complètement le concept qui associe ration, pH et biocénose mais nous retenons au delà de ce concept que le E_h généré par la microflore joue un rôle essentiel dans le fonctionnement du rumen.

LES PERSPECTIVES

L'approche adoptée dans ce travail et les résultats obtenus, apportent des éléments nouveaux pour une meilleure compréhension du mode d'action de la levure probiotique, mais aussi pour la compréhension du fonctionnement du fermenteur rumen. Les résultats demandent confirmation et les nombreuses hypothèses avancées doivent être vérifiées. Pour cela les recherches en cours ou à venir, aussi bien chez les ruminants que chez les herbivores monogastriques sont indispensables. Ces recherches devront toutefois respecter les exigences de la flore en termes de E_h et d'anaérobiose pour conserver intactes les caractéristiques particulières du rumen et de sa biocénose. Celles qui seront conduites *in vitro* ne pourront être concluantes en ce domaine que si les données enregistrées du E_h révèlent leur conformité avec le milieu ruminal.

Au cours de nos diverses expérimentations, nous avons choisi un régime comportant une part importante de glucides rapidement fermentescibles, c'est-à-dire un régime acidogène, pour expliquer le mode d'action de la levure. Devant cette quasi obligation pour des raisons essentiellement techniques de faire un choix, nous avons

fortement limité nos investigations sur l'aspect composition ou nature du régime. Il nous paraît pourtant essentiel de mieux connaître l'évolution des paramètres physico-chimiques du rumen due à l'ingestion de rations riches en fibres et de vérifier sur de telles rations l'efficacité de la levure probiotique.

Les hypothèses que nous avons formulées, relatives aux flores dominantes ou en activité qui seraient à l'origine des valeurs de E_h enregistrées doivent être vérifiées. La technique de mise en culture des espèces composant la microflore du rumen a des limites que de nombreux microbiologistes signalent, il est impossible de cultiver plus de 15% de la population bactérienne du rumen et il est probable que des espèces importantes n'aient pas encore pu être identifiées (Whiteford *et al.*, 2001). Aujourd'hui des techniques moléculaires de pointe, telles que le T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) et le Maccroarray, ont été mises au point et développées pour élaborer des méthodes d'évaluation et de quantification des diverses populations bactériennes qui se trouvent naturellement dans le rumen. Une collaboration avec le Professeur C. J. Newbold du Laboratoire de Microbiologie d'Aberystwyth (Pays de Galles), a pour objectif de mettre en œuvre ces nouvelles techniques pour traiter les échantillons du contenu ruminal prélevés tout au long de nos différents essais. Ces échantillons font l'objet de cette approche axée sur la microbiologie du rumen permettant une quantification et une qualification de la microflore et ses variations en présence de levure.

Alors que notre travail s'est focalisé sur la mesure des paramètres physico-chimiques de la phase liquide ruminale uniquement, il n'en reste pas moins que la phase gazeuse joue un rôle prépondérant dans l'équilibre de ce milieu "extrême". Les différentes phases (gazeuse, solide et liquide) qui composent le rumen, font de celui-ci un environnement très complexe où plusieurs couples d'oxydo-réduction interagissent entre eux. Comme l'ont souligné plusieurs auteurs, la phase gazeuse du milieu ruminal est en équilibre permanent avec sa phase liquide et tout changement serait préjudiciable à la microflore, plus particulièrement aux bactéries anaérobies strictes. Peu de techniques ne sont à ce jour disponibles pour analyser dans sa composition la phase gazeuse du rumen dans les conditions naturelles. Dans ce domaine et afin d'alimenter notre approche thermodynamique par d'autres couples d'oxydo-réduction, nous avons mis en place une technique permettant un échantillonnage automatique, en continu et représentatif de la phase gazeuse ruminale. Les prélèvements sont ensuite analysés par un chromatographe en phase gazeuse portable (MICRO-GC AGILENT 3000, USA) qui comporte deux modules avec différents tamis moléculaires permettant le dosage simultané de l'hydrogène,

l'oxygène, le méthane, le dioxyde de carbone, l'azote, l'ammoniac et le l'hydrogène sulfuré. Seuls quelques résultats préliminaires ont été recueillis qui ne permettent ni de valider la méthode ni d'en tirer de conclusion. Ce travail préliminaire doit être poursuivi. Il sera une aide précieuse pour mieux comprendre le fonctionnement du rumen et le mode d'action de la levure.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

- ADAMS D. C., M. L. GALYEAN, H. E. KIESLING, J. D. WALLACE, M. D. FINKNER (1981).** Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.* 53: 780-789.
- AERTS J., J. LATRE, L. DUSSERT (1994).** Effects of living yeasts on zootechnical performance and carcass composition of finishing bulls. *Ann. Zootech.* 43: 237.
- ALI HAIMOUD-LEKAL D., P. LESCOAT, C. BAYOURTHE, R. MONCOULON (1999).** Effets de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Aspergillus oryzae* sur les performances zootechniques de la vache laitière : étude bibliographique, p 157. *In: 6^{ème} Journée Rencontres Recherches Ruminants, 1-2 Décembre, Paris.*
- ANDERSON R. L. and W. A. WOOD (1969).** Carbohydrate metabolism in microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 23: 539-578.
- ANDRADE P. V. D., S. GIGER-REVERDIN, D. SAUVANT. (2002).** Relation entre deux paramètres (pH et potentiel redox) caractérisant l'état du rumen. Effet de la nature de la ration. Rencontre Recherche Ruminant : p 9.
- ANTONINI D., L. FALCIOLA, R., MUSSINI, T. MUSSINI (2001).** The rH index for quality and environmental controls : standards and application procedures. *Annali di Chimica by Società Chimica Italiana.* 91:117-126.
- ARAMBEL M. J. and B. A. KENT (1990).** Effect of a yeast culture on nutrient digestibility and milk yield response in early to midlactation dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 73: 1560-1563.
- ARCOS-GARCÍA J. L., F. A. CASTREJÓN, G. D. MENDOZA, E. P. PÉREZ-GAVILÁN (2000).** Effect of two commercial yeast cultures with *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livest. Prod. Sci.* 63: 153-157.
- ASGHAR S. S., E. LEVIN, M. H. FRANKLIN (1973).** Accumulation of neutral amino acids by *Streptococcus faecalis*: Energy coupling by a proton motive force. *J. Bio. Chem.* 248: 5225-5233.
- AUBERT C., N. CAPELLE, S. JEANSON, H. ECKERT, C. DIVIES, R. CACHON (2002).** Le potentiel redox et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Sciences des Aliments.* 22: 177-187.
- BAILEY C. B. (1961).** Saliva secretion and its relation to feeding in cattle. 3. The rate of secretion of mixed saliva in the cow during eating, with an estimate of the magnitude of the total daily secretion of mixed saliva. *Br. J. Nutr.* 15: 433.
- BALDWIN R. L. and R. S. EMERY (1960a).** The oxidation-reduction potential of rumen contents. *J. Dairy Sci.* 43: 506-511.
- BALDWIN R. L. and R. S. EMERY (1960b).** Investigation of the oxidation-reduction potential of rumen contents. *J. Dairy Sci.* 43: 577-578.
- BALDWIN R. L., W. A. WOOD, R. S. EMERY (1962).** Conversion of lactate-C¹⁴ to propionate by the rumen microflora. *J. Bacteriol.* 83, 907-913.
- BALDWIN R. L., H. L. LUCAS, R. CABRERA (1970).** Energetic relationships in the formation and utilization of fermentation end-products. *In: Physiology of digestion and metabolism in the ruminant.* Phillipson, A. T. (ed.). Oriel Press, Newcastle, 319-335.
- BARNES R. J., R. S. COMLINE, A. DOBSON (1983).** Changes in the blood flow to the digestive organs of sheep induced by feeding. *Q J Exp Physiol.* 68, 77-88.
- BARONE R. (1984).** Splanchnologie I. Appareil digestif, Appareil respiratoire. Tome 3. *In: Anatomie comparée des mammifères domestiques.* 2^{ème} édition. Eds. Vigot, Paris. p 333-379.

- BARRY T. N., A. THOMPSON, D. G. ARMSTRONG (1977).** Rumen fermentation studies on two contrasting diets. 1. Some characteristics of the *in vivo* fermentation, with special reference to the composition of the gas phase, oxidation/reduction state and volatile fatty acid proportions. *J. Agric. Sci. Camb.* 89: 183–195.
- BAUCHOP T. and D. O. MONFORT (1981).** Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1103-1110.
- BEAUCHEMIN K. A. and J. G. BUCHANAN-SMITH (1989).** Effects of dietary neutral detergent fibre concentration and supplementary long hay on chewing activities and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 2288-2300.
- BEAUCHEMIN K. A., W. Z. YANG, D. P. MORGAVI, G. R. GHORBANI, W. KAUTZ, W. A. Z. LEEDLE (2003).** Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1628–1640.
- BEESON W. M. and T. W. PERRY (1952).** Balancing the nutritional deficiencies of roughage for beef steers. *J. Anim. Sci.* 11: 501-509.
- BERGEN W. G. and D. B. BATES (1984).** Ionophores : their effects on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.* 58: 1465-1483.
- BERNER R. A. (1981).** A new geochemical classification of sedimentary environments. *J. Sediment Petrol.* 51: 359-365.
- BOHN H. L. (1969).** The EMF platinum electrodes in dilute solutions and its relation to soil pH. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.* 33: 639-640.
- BOUDON A., P. LAMBERTON P, J-L. PEYRAUD (2006).** Validation d'un système de mesure de pH ruminal à demeure, en continu sur la journée, sur des vaches laitières. *In: 13^{ème} Journée Rencontres Recherches Ruminants, 6-7 Décembre, Paris.* p 112.
- BROBERG G (1957a).** Oxygen's significance for the ruminal flora as illustrated by measuring the redox potential in rumen contents. *Nord. Vet. Med.* 9: 57-60.
- BROBERG G (1957b).** Measurements of the redox potential in rumen contents. I. *In vitro* measurements on healthy animals. *Nord.Vet. Med.* 9: 918–930.
- BROBERG G (1957c).** Measurements of the redox potential in rumen contents. II. *In vitro* measurements on sick animals. *Nord.Vet. Med.* 9: 931–941.
- BROBERG G (1957d).** Measurements of the redox potential in rumen contents. III. Investigations into the effect of oxygen on the redox potential and quantitative *in vitro* determinations of the capacity of rumen contents to consume oxygen. *Nord. Vet. Med.* 9: 942-950.
- BROBERG G (1958).** Measurements of the redox potential in rumen contents. IV. *In vivo* measurements. *Nord. Vet. Med.* 10: 263-268.
- BROCKMAN H. L., W. A. WOOD (1975).** Electron-transferring flavoprotein of *Peptostreptococcus elsdenii* that functions in the reduction of acrylyl-coenzyme A. *J. Bacteriol.* 124: 1447–1453.
- BRODERICK G. A., R. J. WALLACE, E. R. ORSKOV (1991).** Control and rate of protein degradation. *In: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants.* Tsuda T., Y. Sasaki, R. Kawashima (eds), pp 541-592. Academic Press, London, UK.
- BROSSARD L., F. CHAUCHEYRAS-DURAND, B. MICHALET-DOREAU, C. MARTIN (2006).** Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. *Animal Sci.* 82: 829-836

- BROUDISCOU, L. P., A. AGBAGLA-DOHNANI, Y. PAPON, A. CORNU, E. GRENET, A. BROUDISCOU (2001).** Quantitative effects of alfalfa extract supply on rice straw degradation, fermentation and biomass synthesis by rumen micro-organisms *in vitro*. *Anim. Res.* 50:429–440.
- BRUNING C. L., and M. T. YOKOYAMA (1988).** Characteristics of live and killed brewer's yeast slurries and intoxication by intraruminal administration to cattle. *J. Anim. Sci.* 66:585–591.
- BRYANT M. P. and BURKEY L. A. (1953).** Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *J. Dairy Sci.* 36: 205–217.
- BRYANT M. P. (1959).** Bacterial species of the rumen. *Bacteriol. Rev.* 23: 125–153.
- BRYANT M. P. (1973).** Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.* 32: 1809–1813.
- BRYDL, E., P. RAFAI, Á. BATA, (1994).** The effect of viable *Saccharomyces cerevisiae* on the ruminal fermentation, acid-base balance and milk production of dairy cows. Environmental and management systems for total animal health care in agriculture. Proceedings of the 8th International Congress on Animal Hygiene (September 12-16, St. Paul, Minnesota, USA.)
- BURRIN D.G., R. A. BRITTON (1986).** Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *J. Anim. Sci.* 63: 888-893.
- CABRERA E. J. I., M. G. D. MENDOZA, I. E. ARANDA, C. GARCIA-BOJALIL, G. R. BARCENA, J. J. A. RAMOS (2000).** *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. *Anim. Feed Sci. Tech.* 83: 49-55.
- CALLAWAY E. S. and S. A. MARTIN (1997).** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80: 2035-2044.
- CARRO M.D., P. LEBZIEN, K. ROHR (1992).** Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage-based diet. *Livest. Prod. Sci.* 32: 219–229.
- CARTER H. E. and G. E. PHILLIPS (1944).** The nutritive value of yeast proteins. *Fed. Proc.* 3: 123-128.
- CASSIDA P. E. and M. R. STOKES (1986).** Eating and resting salivation in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 69: 1282-1289.
- CHADEMANA I. and N. W. OFFER (1990).** The effect of dietary inclusion of yeast culture on digestion in the sheep. *Anim. Prod.* 50: 483-489.
- CHANG R. (2000).** Chemical equilibrium. *In: Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences*, pp.301-350. University Science Books, CA, USA.
- CHAUCHEYRAS-DURAND F. and G. FONTY (2002).** Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentations in the rumen of newborn lambs. *Microb. Eco. Health and Disease.* 14: 30-36.
- CHAUCHEYRAS F., G. FONTY., G. BERTIN (1996).** Effect of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (LEVUCCELL® SC), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. *Can. J. Microbiol.*, 42: 927-933.
- CHAUCHEYRAS F., G. FONTY., G. BERTIN., Ph. GOUET (1995).** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* cells on ruminal microbial functions as assessed by *in vitro* measurements. p 19. *In : Abstracts of the 23rd Biennial Conference on Rumen Function*, 14-16 November., Chigaco, USA.
- CHAUCHEYRAS F., L. MILLET, B. MICHALET-DOREAU, G. FONTY., G. BERTIN., Ph. GOUET (1997).** Effect of an addition of LEVUCCELL® SC on the rumen microflora of sheep during adaptation to high starch diets. Proceedings of a Symposium jointly organised by the Rowett Research Institute and INRA,

- Centre de Clermont-Theix 'Evolution of the rumen microbial ecosystem', Aberdeen, March 20-21 (RNDEE5, Suppl. 1-88, p 82).
- CHEN M. and M. J. WOLIN (1979).** Effect of monensin and lasalocid sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 72-77.
- CHENG K. J., J. W. COSTERTON (1980).** Adherent rumen bacteria -their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. *In: Digestive physiology and metabolism in ruminants* Ruckebush, Y.T.P. (Ed.). Falcon house, Lancaster, England, pp. 227-250.
- CHENG K. J., C. W. FORSBERG, H. MINATO, J. W. COSTERTON (1991).** Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. *In: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants.* Tsuda T., Y. Sasaki, R. Kawashima (eds), pp 595-624. Academic Press, London, UK.
- CHIARAMONTI N., B. KHOUMERI, N. BALBI, J. H. BALBI (1997).** Fermentation alcoolique. Détermination des grandeurs thermocinétiques par modélisation. *J. Thermal. Analysis.* 48: 413-425.
- COE M. L., T. G. NAGARAJA, Y. D. SUN, N. WALLACE, E. G. TOWNE, K. E. KEMP, J. P. HUTCHESON. (1999).** Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J. Anim. Sci.* 77: 2259-2268.
- COMBRIS P. (1996).** Viande de bœuf : Les préférences des consommateurs ont changé au début des années 80. INRA Sciences Rurales. Recherches en économie et sociologie rurales. No. 3.
- CORPET D.E. (1999).** Antibiotiques en élevage et résistances bactériennes : vers une interdiction ? *Rev Med Vet.* 150. 165-170.
- COTTA M. A. (1992).** Interaction of ruminal bacteria in the production and utilisation of malto-oligosaccharides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:48-54
- COUNOTTE G. H. M., A. T. VAN'T KLOOSTER, J. VAN DER KUILEN, R. A. PRINS (1979).** An analysis of the buffer system in the rumen of dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 49: 536-1544.
- COUNOTTE G. H. M., H. LANKHORST., R. A. PRINS (1982).** Role of DL-lactic as an intermediate in rumen metabolism of dairy cows. *J. Anim. Sci.* 56: 1222-1235.
- CZERKAWSKI J. W. (1969).** Methane production in ruminants and its significance. *World review of nutrition and Dietetics.* No. 11: 240-282.
- CZERKAWSKI J. W. (1986).** *An Introduction to Rumen Studies.* Pergamon Press, Oxford.
- CZERKAWSKI J. W. and G. BRECKENRIDGE (1969).** Design and development of a long term rumen stimulating technique (RUSITEC). *Br. J. Nutr.* 38: 371-384.
- DANN H. M., J. R. PROCKLEY, G. C. MCCOY, M. F. HUTJENS, J. E. GARRETT (2000).** Effects of yeast cultures (*Saccharomyces cerevisiae*) on prepartum intake and postpartum intake and milk production of Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83:123-127.
- DAVIS, C. L., R. E. BROWN, D. C. BEITZ (1964).** Effect of feeding high-grain restricted-roughage rations with and without bicarbonates on the fat content of milk produced and proportions of volatile fatty acids in the rumen. *J. Dairy Sci.* 47: 1217.
- DAWSON, K. A. and K. E. NEWMAN (1988).** Fermentations in rumen-stimulating continuous cultures receiving probiotic supplements. *J. Anim. Sci.* 67 (Suppl. 1): 500 (Abstr.).
- DAWSON K. A. (1989).** Modification of rumen function and animal production using live microbial cultures as feed supplements. *California Anim. Nutr. Conf.* pp 25.

- DAWSON K. A. (1992).** Current and future role of yeast culture in animal production : A review of research over the last six years. In : Proceedings of Alltech's 8th Annual Symposium (T. P. Lyons ed.), Alltech Technical Publication, Nicholasville, Kentucky, USA. pp 1-23.
- DAWSON K. A. (2000).** Some milestones in our understanding of yeast culture supplementation in ruminants and their implications in animal production systems. *In*: Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of the 16th Annual Symposium. (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds) Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 473-486.
- DAWSON, K. A. and D. M. HOPKINS (1991).** Differential effects of live yeast on the cellulolytic activities of anaerobic ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 69 (Suppl. 1): 531 (Abstr.).
- DAWSON, K. A., K. E. NEWMAN., J. A. BOLING (1990).** Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage fed microbial activities. *J. Anim. Sci.* 68: 3392-3398.
- DAWSON, K. A. and I. D. GIRARD (1997).** Biochemical and physiological basis for the stimulatory effects of yeast preparations on ruminal bacteria. *In*: Proceedings of Alltech's 13th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Nottingham University Press, Loughborough, Leics. UK.
- DEMEYER D. I. (1989).** Effect of defaunation on rumen fibre digestion and digesta kinetics. *In*: J. V. Nolan, R.A. Leng and D.I. Demeyer (Editores), The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion. Penambul Books, Armidale, NSW, pp. 171-179
- DIJKSTRA J., J. FRANCE, D. R. DAVIES (1998).** Different mathematical approaches to estimating microbial protein supply in ruminants. *J. Dairy Sci.* 81: 3370-3384.
- DOBOS R. C., A. J. DICKENS, T. J. NORRIS (1990).** Yea-Sacc¹⁰²⁶ for dairy cattle in low concentrate input systems: Effects on milk yield and composition in an Australian experiment. *In*: Biotechnology in the Feed Industry, Vol. VI. Alltech Technical Publications, Nicholasville, KY.
- DOELLE H. W. (1969).** Chemosynthesis - Anaerobic respiration. *In*: Bacterial Metabolism. Academic Press, New York and London. pp 89-127.
- DOLEŽAL P., J. DOLEZAL, J. TRINACTY (2005).** The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation in dairy cows. *Czech. J. Anim. Sci.* 50: 503-510.
- DOREAU M., E. FERCHAL, Y. BECKERS (1997).** Effects of level of intake and of available volatile fatty acids on the absorptive capacity of sheep rumen. *Small Ruminant Res.* 25 : 99-105
- DOREAU M. and J. P. JOUANY (1998).** Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 3214-3221.
- DUCLUZEAU R. and P. RAIBAUD (1994).** Ecologie microbienne du tube digestif et modes d'actions des probiotiques en nutrition animale. *Cahiers Agricultures.* 3: 353-360.
- DUFFIELD, T., J. C. PLAIZIER, A. FAIRFIELD, R. BAGG, G. VESSIE, P. DICK, J. WILSON, J. ARANINI, B. MC BRIDE. (2004).** Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:59-66.
- DULPHY J.P. and P. FAVERDIN (1987).** L'ingestion alimentaire chez les ruminants: modalités et phénomènes associés. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 27: 129-155.
- DURAND-CHAUCHEYRAS F., G. FONTY, G. BERTIN (1997).** L'utilisation de levures vivantes, additif microbiens chez le ruminant : Effets sur la microflore et les fermentations ruminales, effets zootechniques. *Bulletin des G.T.V. no.5B,* 576: 35-52.
- DURAND-CHAUCHEYRAS F., G. FONTY, G. BERTIN, M. THEVENIOT, P. GOUET (1998).** Fate of Levucell S C I-1077 yeast additive during digestive transit in lambs. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 275-280.

- DURAND-CHAUCHEYRAS F. and G. FONTY (2001).** Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reprod. Nutr. Dev.* 41: 57-68.
- DURAND-CHAUCHEYRAS F. AND G. FONTY (2002).** Influence of a probiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077) on microbial colonization and fermentations in the rumen of newborn lambs. *Microb. Ecol. in health and disease.* 14: 30-36.
- ECKLES C. H. and V. M. WILLIAMS (1925).** Yeast as a supplementary feed for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 8: 89-93.
- EDWARDS I. E., J. H. MUTSVANGWA, J. H. TOPPS, G. F. M. PATERSON (1990).** The effects of supplemental yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation and growth performance of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* 55: 35-40.
- EL GHANI A. A. A. (2004).** Influence of diet supplementation with yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of Zaraibi goats. *Small Rumin. Res.* 52: 223-229.
- EL HASSAN S. M., NEWBOLD C. J., R. J. WALLACE (1993).** The effect of yeast in the rumen and the requirement for viable yeast cells. *Anim. Prod.* 54: 504 (Abstract).
- ELLIS J. E., P. S. Mc INTYRE, M. SALEH, A. G. WILLIAMS, D. LLOYD (1991).** Influence of CO₂ and low concentrations of O₂ on fermentative metabolism of the ruminal ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Appl. Env. Microbiol.* 57: 1400-1407.
- ELSDEN S. R., B. E. VOLCANI, F. M. C. GILCHRIST, D. LEWIS (1956).** Properties of a fatty acid forming organism isolated from the rumen of sheep. *J. Bacteriol.* 72: 681-689.
- ENJALBERT F., J. E. GARRETT, R. MONCOULON, C. BAYOURTHE, P. CHICOTEAU (1999).** Effects of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal digestion in non-lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 76: 195-206
- ERASMUS L. J., P. M. BOTHA, A. KISTNER (1992).** Effect of a yeast culture supplement on production, rumen fermentation and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75: 3056-3065.
- ERASMUS L. J., P. H. ROBINSON, A. AHMADI, R. HINDERS, J. E. GARRETT (2005).** Influence of prepartum and postpartum supplementation of a yeast culture and monensin, or both, on ruminal fermentation and performance of multiparous dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 122: 219-239.
- ERDMAN R. A. (1988).** Dietary buffering requirements of the lactating dairy cows: a review. *J. Dairy Sci.* 71: 3246-3266.
- ERDMAN R. A. and B. K. SHARMA (1989).** Effect of yeast culture and sodium bicarbonate on milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 1929-1932.
- FIEMS L. O., B. G. COTTYN, CH. V. BOUCQUE (1992).** Manipulation of the rumen fermentation through a yeast culture supplementation. *Med. Fac. Landbouww. Uni. Gent.* 57: 1945-1951.
- FIEMS L. O., B. G. COTTYN, L. DUSSERT, J. M. VANACKER (1993).** Effect of a viable yeast culture on digestibility and rumen fermentation in sheep fed different types of diets. *Reprod Nutr Dev.* 33: 43-49.
- FONTY G., Ph. GOUET, J. P. JOUANY, J. SENAUD (1987).** Establishment of the microflora and anaerobic fungi in the rumen of lambs. *J. Gen. Microbiol.* 129: 213-223.
- FONTY G., J. P. JOUANY, E. FORANO, Ph. GOUET (1995).** L'écosystème microbien du réticulo-rumen. *In: Nutrition des Ruminants Domestiques.* Editeurs : Jarrige, R., Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce, M. Journet. INRA, Paris. p 299-347.
- FONTY G. and F. DURAND-CHAUCHEYRAS (2006).** Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia.* 61: 741-750.

- FORSBERG C.W. and K. LAM (1977).** Use of adénosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 528-537.
- FULLER R (1989).** Probiotics in man and animals. A review. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- GARCÍA C. C. G., M. G. D. MENDOZA, M. S. GONZÁLEZ, P. M. COBOS, C. M. E. ORTEGA, L. R. RAMÍREZ (2000).** Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin on ruminal fermentation and digestion in sheep. *Anim. Feed Sci. Tech. (Short Communication)* 83: 165-170.
- GILLILAND S. E., B. B. BRUCE, L. J. BUSH, T. E. STALEY (1980).** Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. *J. Dairy Sci.* 60: 1105.
- GIGER-REVERDIN S. AND C. DUVAUX-PONTER (1998).** Le pouvoir tampon intrinsèque des aliments. *Doc. CAAA-INAPG.* p 15.
- GIGER-REVERDIN S., N. BEZAULT, D. SAUVANT, G. BERTIN (1996).** Effects of a probiotic yeast in lactating ruminants: interaction with dietary nitrogen level. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 63: 149-162.
- GIGER-REVERDIN S., C. DUVAUX-PONTER, D. SAUVANT, C. MAAROUFI, F. MESCHY (1999).** Variabilité des pouvoirs tampon et acidogène de 24 matières premières destinées au ruminants. Liaison avec la composition chimique. *Renc. Rech. Rum.* 6: 95-98.
- GIGER-REVERDIN S., C. DUVAUX-PONTER, D. SAUVANT, O. MARTIN, I. NUNES DO PRADO, R. MULLER (2002).** Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 96, 83-102.
- GIGER-REVERDIN S., C. DUVAUX-PONTER, K. RIGALMA, D. SAUVANT (2006).** Variabilité du potentiel redox du contenu ruminal de chèvres laitières en liaison avec le comportement masticatoire, p 138. *In: 13^{ème} Journée Rencontres Recherches Ruminants, 6-7 Décembre, Paris.*
- GIRARD D., C. R. JONES, K. A. DAWSON (1993).** Lactic acid utilization in rumen-stimulating cultures receiving a yeast culture supplement. *J. Anim. Sci.* 71 (Suppl. 1): 288 (Abstr.).
- GIRARD D. and K. A. DAWSON (1994).** Effects of a yeast culture on the growth characteristics of representative ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 72: 300 (Abstr.).
- GOAD D. W., C. L. GOAD, T. G. NAGARAJA (1998).** Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76: 234-241.
- GÓMEZ-ALARCÓN R. A., C. DUDAS, J. T. HUBER (1990).** Influence of Cultures of *Aspergillus oryzae* on Rumen and Total Tract Digestibility of Dietary Components. *J. Dairy Sci.* 73: 703-710.
- GOUET Ph., J. GRAIN, H.C. DUBOURGUIER, G. ALBAGNAC (1986).** Interactions entre espèces microbiennes dans le rumen. *Reprod. Nutr. Develop.* 26: 147-159.
- GOURNIER-CHATEAU N., J. P. LARPENT, M. I. CASTELLANOS, J. L. LARPENT (1994).** Les probiotiques en alimentation animale et humaine. p 1-2.
- GRAY W. R. and J. P. RYAN (1989).** Two distinct modes of action, namely *ad initio* and *ad finem* of the yeast culture Yeasacc on ruminal fermentation in sheep. *Biochem. Soc. Trans.* 18: 349.
- GRENET E. (1997).** Aspects microscopiques de la dégradation microbienne des tissus végétaux dans le rumen. *INRA Prod. Anim.* 10: 241-249.
- GRÖHN Y. T. and M. L. BRUSS (1990).** Effect of diseases, production, and season on traumatic reticuloperitonitis and ruminal acidosis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73: 2355-2363.
- GUERIN B. (2004).** Bioénergétique. Collection Grenoble Sciences. Eds. EDP Science, France. pp 13-30.
- GUILLOT J. F. (1998).** Les probiotiques en alimentation animale. Dossier : Flore bactérienne. *Cahiers Agricultures.* 7: 49-54.

- HACH C. C., S. V. BRAYTON, A. B. KOPELOVE, (1985).** A powerful Kjeldahl nitrogen method using peroxymonosulfuric acid. *J. Agric. Food Chem.* 6: 1117-1123.
- HACH C. C., B. K. BOWDEN, A. B. KOPELOVE, S. V. BRAYTON (1987).** More powerful peroxide Kjeldahl digestion method. *J. Association of Official Analytical Chemists.* 70: 783-787.
- HANCOCK D. L., A. C. BRAKE, A. L. MONTGOMERY, J. R. DOMINEY, C. A. MATTINGLY, M. J. CECAVA (1994).** Influence of yeast addition and Compudose implantation on feedlot performance and carcass characteristics of growing and finishing steers. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl 1): 300.
- HANKE M. E. and Y. J. KATZ (1943).** An electrolytic method for controlling oxidation-reduction potential and its application in the study of anaerobiosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 2: 183-200.
- HARRIS B. (Jr), D. E. DOMINEY, W. A. SMITH, H. H. VAN HORN, C. J. WILCOX (1992).** Effects of a feather meal at two protein concentrations and yeast culture on production parameters in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 75: 3524-3530.
- HARRIS B. (Jr) and R. LOBO (1988).** Feeding yeast culture to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77 (Suppl. 1): 276 (Abstr.).
- HARRISON D. G., D. E. BEEVER, D. J. THOMSON, D. F. OSBOURN (1975).** Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing the rate of flow of water from the rumen. *J. Agri. Sci. (Camb.)* 85: 93.
- HARRISON G. A., R. W. HEMKEN, K. A. DAWSON, R. J. HAROMON, K. B. BARKER (1988).** Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71: 2967-2975.
- HARRISON J. S. and A. H. ROSE (1970).** Introduction in *Yeast Technology*. In : *The Yeast 3*. Eds A. Rose and J. S. Harrison. Academic Press, London and New York. pp 1-4.
- HAVENAAR R., B. T. BRINK, J. H. J. HUIS IN'T VELD (1992).** Selection of strains for probiotic use. In: *Probiotics : The Scientific Basis*. Ed. Fuller R. Chapman & Hill. pp 209-224.
- HELGESON H. C., C. E. OWENS., A. M. KNOX., L. RICHARD. (1998).** Calculation of the standard molal thermodynamic properties of crystalline, liquid and gas organic molecules at high temperatures and pressures. *Geochem. Cosmochim. Acta.* 62: 985-1081.
- HENDERSON C. S. STEWART, F. V. NEKREP (1981).** The effect of monensin on pure culture and mixed cultures of rumen bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 51: 159-169.
- HENTGES D. J AND B. R. MAIER (1972).** Theoretical basis for anaerobic methodology. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 1299-1305.
- HEROLD E. L., R. M. BECHTLE, E. E. BARTLEY, A. D. DAYTON (1978).** Buffering ability of several compounds *in vitro* and the effect of a selected buffer combination on ruminal acid production *in vivo*. *J. Dairy Sci.* 61: 1114.
- HESPELL R. B. (1981).** Ruminal microorganisms. Their significance and nutritional. In: *Developments in Industrial Microbiology.* 22: 261-275.
- HESPELL R. B. and M. P. BRYANT (1979).** Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors of Y_{ATP} . *J. Anim. Sci.* 49: 1640-1659.
- HESSION A. O. and L. KUNG (1992).** Altering ruminal fermentation by microbial inoculation with lactate utilizing microorganism. *J. Anim. Sci.* 70 (Suppl.): 311 (Abstr).
- HILLMAN K., D. LLOYD, A. G. WILLIAMS (1985).** Use of a portable quadrupole mass spectrometer for the measurement of dissolved gas concentrations in ovine rumen liquor *in situ*. *Curr. Microbiol.* 12: 335-340.

- HINO T. and S. KURODA (1993).** Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. Appl Environ Microbiol. 1993 January; 59: 255–259.
- HINO T., K. SHIMADA, T. MARRUYAMA (1994).** Substrate preferences in a strain of *Megasphaera elsdenii*, a ruminal bacterium, and its implications in propionate production and growth competition. Appl. Environ. Microbiol. 60: 1827–1831.
- HOBSON P. N. (1989).** The Rumen Microbial Eco-system. Elsevier Applied Science, London,.
- HOYOS G (1992).** Effect of Yea-Sacc¹⁰²⁶ on persistency of milk production by lactating cows. In: Alltech Technical Publications. Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 8th Annual Symposium. Nicholasville, Kentucky, U.S.A. Edited by LYONS T. P. pp 6.
- HRISTOV A. N., M. IVAN, L. M. RODE, T. A. MCALLISTER (2001).** Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. J. Anim. Sci. 79: 515-524.
- HUNGATE R. E. (1950).** The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. Bacteriol Rev. 14: 1–49.
- HUNGATE R. E. (1966).** The Rumen and its Microbes. Academic Press, New York and London.
- IANNOTTI E. L., D. KAFKEWITZ, M. J. WOLIN, M. P. BRYANT (1973).** Glucose fermentation products of *Ruminococcus albus* grown in continuous culture with *Vibrio succinogenes*: changes caused by interspecies transfer of H₂. J. Bacteriol. 114: 1231-1240.
- JACOB H. E. (1970).** Redox potential. In: Methods Microbiology. Vol 2: pp 91-123. Norris J. R., Ribbons D. W. (ed.). Academic Press London and New York.
- JOBLIN K. (1999).** Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. Austr. J. Agri. Res. 50: 1307-1313.
- JOHNS A. T. (1952).** The mechanism of propionic acid formation by *Clostridium propionicum*. J. Gen. Microbiol. 6: 123–127.
- JOHNSON K. A. and D. E. JOHNSON (1995).** Methane emissions from cattle. J. Anim. Sci. 73: 2483-2492.
- JOHNSON R. J., M. L. HERLUGSON, L. B. OJIKUTU, G. CORDOVA, I. A. DYER, P. ZIMMCR AND R DELAY (1979).** Effect of avoparcin and monensin on feedlot performance of beef cattle. J. Anim. Sci. 48: 1338-1342.
- JOUANY J. P. (1978).** Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen: leur dynamique, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le ruminant. Université de Clermont ferrand II.2Vol, pp 195.
- JOUANY J. P. (2000).** Twenty years of research into yeast culture, now a standard in ruminant diets around the world. Proceedings from Alltech's 15th Annual European, Middle Eastern and African Lecture Tour. p. 44-68.
- JOUANY J. P. and J. SÉNAUD (1982).** Influence des ciliés du rumen sur la digestion de différents glucides chez le mouton. I.- Utilisation des glucides pariétaux (cellulose et hémicelluloses) et de l'amidon. Reprod. Nutr. Dev. 22: 735-752.
- JOUANY J. P., D. I. DEMEYER, J. GRAIN (1988).** Effect of defaunating the rumen. Anim. Feed Sci. Technol. 21: 229-265.
- JOUANY J. P., G. FONTY, B. LASSALAS, J. DORE, Ph. GOUET, G. BERTIN (1991).** Effect of live yeast cultures on feed degradation in the rumen as assessed by *in vitro* measurements. In: Abstracts of the 21st Biennial Conference on Rumen Function, 12-14 Nov., Chicago, U.S.A.

- JOUANY J. P., B. LASSALAS, G. BERTIN (1994).** *In vitro* study of the dose effect of *Saccharomyces cerevisiae* on rumen digestion of a mixed diet. Proc. Soc. Nutr. Physiol. 3.
- JOUANY J. P., L. BROUDISCOU, R. A. PRINS, S. KOMISARCZUK-BONY (1995).** Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. *In: Nutrition des Ruminants Domestiques*. Editeurs : Jarrige, R., Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce, M. Journet. INRA, Paris. p 350-381.
- JOUANY J. P., F. MATHIEU, J. SENAUD, J. BOHATIER, G. BERTIN, M. MERCIER (1999).** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the population of rumen microbes and their polysaccharidase activities. S. Afr. J. Anim. Sci. 29: 63-64.
- JOURNET M. and B. REMOND B. (1976).** Physiological factors affecting the voluntary intake of feed by cows: a review. Livest. Prod. Sci.3: 129-146.
- KAMALAMMA, U. KRISHNAMOORTHY, P. KRISHNAPPA (1996).** Effect of feeding yeast culture (Yea-Sacc 1026) on rumen fermentation *in vitro* and production performance in crossbred dairy cows. Anim. Feed Sci. Tech. 57: 247-256.
- KAUFMAN W., H. HAGEMEISTER, G. DIRKSEN (1980).** Adaptation to changes in dietary composition, level and feeding frequency. *In: Digestive physiology and metabolism in ruminants. Proceedings of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology. Clermont-Ferrand, September, 1979.* Eds. Ruckebusch Y, Thivend P. Lancaster, England. MTP Press Limited. pp 587-602.
- KILMER L. H., L. D. MULLER, T. J. SNYDER (1981).** Addition of sodium bicarbonate to rations of postpartum dairy cows: physiological and metabolic effects. J. Dairy Sci. 64: 2357-2369.
- KJAERGAARD, L. (1977).** *In: Advances in Biochemical Engineering 7.* T. K. Ghose, A. Fechter, and N. Blakebrough, ed. Springer Verlag, Berlin, Germany. pp 131-150
- KOHN R. A. and R. C. BOSTON (2000).** The role of thermodynamics in controlling rumen metabolism. *In: Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*, pp.11-24. J.P. Mc. Namara, J. France and D. E. Beever, editors. CAB International, NY, USA.
- KOHN R. A. and T. F. DUNLAP. (1998).** Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in rumen fluid and *in vitro*. J. Anim. Sci. 76: 1702-1709.
- KOLB E. (1975).** Physiologie de la digestion et de l'absorption. Chapitre IV. *In : Physiologie des animaux domestiques.* Editeurs Vigot Frères, Paris, France. pp 251-284.
- KOUL V., U. KUMAR, V. K. SAREEN, S. SINGH (1998).** Mode of action of yeast culture (YEA-SACC 1026) for stimulation of rumen fermentation in buffalo calves. J. Sci. Food Agric. 77: 413-417.
- KREGER-VAN RIJ N. J. W. (1969).** Taxonomy and systematics of yeasts. *In: The Yeast 1-Biology of yeast.* Eds A. Rose and J. S. Harrison. Academic Press, London and New York. pp 5-73.
- KUMAR U., V. K. SAREEN, S. SINGH (1992).** A note on the effect of supplementation of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of buffaloes on milk yield and composition. Anim. Prod. 55: 440-442.
- KUMAR U., V. K. SAREEN, S. SINGH (1994).** Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture supplement on ruminal metabolism in buffalo calves given a high concentrate diet. Anim. Prod. 59: 209-215.
- KUNG L. and A. O. HESSION (1995).** Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation of *Megasphaera elsdenii*. J. Anim. Sci. 73: 250-256.
- KUNG L. JR., E. M. KRECK, R. S. TUNG (1997).** Effects of a live yeast culture and enzymes on *in vitro* ruminal fermentation and milk production of dairy cows. J. Dairy Sci. 80: 2045-2051.

- KURTZ D. M. (2003).** Oxygen and anaerobes. *In: Biochemistry and Physiology of anaerobic bacteria*. pp 128-143. Ljungdahl L. G., Adams M. W., Barton L. L., Ferry J., Johnson M. K. Editors. Springer-Verlag, New York Inc.
- KUTASI J., V. JURKOVICH, E. BRYDL, L. KONYVES, A. E. TIRIAN, A. BATA (2004).** Influence of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the oxygen concentration in the rumen fluid. *J. Anim. Feed Sci.* 13 (Suppl. 1): 131-134.
- LENG R. A. (1989).** Dynamics of protozoa in the rumen. *In : J.V. Nolan, R.A. Leng e D.I. Demeyer (Editores), The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale. pp. 51-58.
- LE RUYET P. and W. B. TUCKER (1992).** Ruminal buffers: temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 75: 1069.
- LEWIS D. and S. R. ELSDEN (1955).** The fermentation of l-threonine, l-serine, l-cysteine and acrylic acid by a Gram-negative coccus. *Biochem J.* 60: 683-692.
- LILA Z. A., N. MOHAMMED, T. TAKAHASHI, M. TABATA, T. YASUI, M. KURIHARA, S. KANDA, H. ITABASHI (2006).** Increase of ruminal fiber digestion by cellobiose and a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells *in vitro*. *Anim. Sci. J.* 77: 407-413.
- LINBERG R. D. and D. D. RUNNELS (1984).** Ground water redox reactions: An analysis of equilibrium state applied to Eh measurements and geochemical modeling. *Science*, 225: 925-927.
- LINEHAN B., C. C. SCHEIFINGER, M. J. WOLIN (1978).** Nutritional requirements of *Selenomonas ruminantium* for growth on lactate, glycerol, or glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 317-322.
- LIPMANN F. (1941).** Metabolic generation and utilization of phosphate bound energy. *Adv. Enzymol.* 1: 99-162.
- LLOYD D., J. WILLIAMS, N. YARLETT, A. G. WILLIAMS (1982).** Oxygen affinities of the hydrogenosome-containing protozoa *Tritrichomonas foetus* and *Dasytricha ruminantium*, and two anaerobic protozoa, determined by bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.* 128: 1019-1022.
- LOESCHE W. J. (1969).** Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol.* 18: 723-727.
- LYNCH H. A. and S. A. MARTIN (2002).** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 85: 2603-2608.
- LYONS T. P., K. A. JACQUES, K. A. DAWSON (1993).** Miscellaneous products from yeast. pp 293-324. *In: The Yeasts (Eds. A. H. Rose and J. S. Harrison). Vol. 5. Academic Press, New York.*
- MACKIE R. I., F. M. C. GILCHRIST, A. M. ROBERTS, P. E. HANNAH, H. M. SCWARTZ (1978).** Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agri. Sci.* 90: 241-254.
- MARDEN J. P., C. BAYOURTHE, F. ENJALBERT, R. MONCOULON (2005).** A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cow. *J. Dairy Sci.* 88: 277-281.
- MAROUNEK M., S. BARTOS, G. I. KALACHNYUK (1982).** Dynamics of the redox potential and rH of the rumen fluid of goats. *Physiologia Bohemoslovaca.* 31: 369-374.
- MAROUNEK M. and R. J. WALLACE (1984).** Influence of culture on the growth and metabolism of the rumen bacteria *Selenomonas ruminantium*, *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides succinogenes* and *Streptococcus bovis* in batch culture. *J. Gen. Microbiol.* 130: 223-229.
- MAROUNEK M., P. ROUBAL, S. BARTOS (1987).** The redox potential, rH and pH values in the gastrointestinal tract of small ruminants. *Physiol. Bohemoslov.* 36: 71-74.

- MAROUNEK M., K. FLIEGROVA, S. BARTOS (1989).** Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1570.
- MARTIN S. A. and D. J. NISBET (1992).** Effect of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation. J. Dairy. Sci. 75: 1736-1744.
- MARTIN S. A., D. J. NISBET, R.G. DEAN (1989).** Influence of a commercial yeast supplement on the *in vitro* ruminal fermentation. Nutr. Reports Int. 40: 395-403.
- MARTIN C., L. BROSSARD, M. DOREAU (2006).** Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. INRA Prod. Anim. 19: 93-108.
- MASSENGO J. (1976).** Recherches sur la carence en thiamine chez le mouton recevant un régime d'ensilage de maïs. Thèse INPT-ENSAT.
- MATHIEU F., J. P. JOUANY, J. SENAUD, J. BOHATIER, G. BERTIN, M. MERCIER (1996).** The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep: protozoal and probiotics interactions. Reprod. Nutr. Dev. 36: 271-287.
- Mc ARTHUR J. M. and J. E. MULTIMORE (1962).** Rumen gas analysis by solid gas chromatography. Can. J. Anim. Sci. 41: 187-192.
- MERCURY L. and Y. TARDY. (1997).** Caractéristiques physico-chimiques de l'eau capillaire et des gouttes de brouillard. C. R. Acad. Sci. Paris, 325, série II a: 947-954.
- MERTENS D.R. (1997).** Creating a system of meeting the fiber requirements of dairy cows. J. Dairy Sci. 80: 1463-1481.
- MESCHY F., D. BRAVO, D. SAUVANT (2004).** Méta-analyse des réponses de la vache laitière à la supplémentation en substances tampons. INRA Prod. Anim. 17: 11-18.
- MICHALET-DOREAU B. and D. MORAND (1995).** Effects of yeast culture, *Saccharomyces cerevisiae*, on ruminal fermentation during adaptation to high-concentrate feeding. In: 'Rumen Microbiology', abstracts from the Symposium Satellite of IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores, Sept. 16-17, Clermont-Ferrand, France.
- MICHALET-DOREAU B., D. MORAND, C. MARTIN (1997).** Effect of the microbial additive LEVUCCELL[®] SC on microbial activity in the rumen microflora during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diet. Proceedings of a Symposium jointly organised by the Rowett Research Institute and INRA, Centre de Clermont-Theix 'Evolution of the rumen microbial ecosystem', Aberdeen, March 20-21 (RNDEE5, Suppl. 1-88, p 81).
- MICHALET-DOREAU B., I. FERNANDEZ, C. PEYRON, L. MILLET, G. FONTY (2001).** Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. Reprod. Nutr. Dev. 4: 187-194.
- MILLER-WEBSTER T., W. H. HOOVER, M. HOLT, J. E. NOCEK (2002).** Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continuous culture. J. Dairy Sci. 85: 2009-2014.
- MIR Z. and P. S. MIR (1994).** Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high forage or high grain and on feed digestibility and *in situ* degradability. J. Anim. Sci. 72: 537-545.
- MIRANDA R. L. A., M. G. D. MENDOZA, J. R. BÁRCENA-GAMA, M. S. GONZÁLEZ R. FERRARA, C. M. E. ORTEGA, P. M. A. COBOS (1996).** Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. Anim. Feed Sci. Tech. 63: 289-296.
- MOLONEY A. P. and M. J. DRENNAN (1994).** The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. Anim. Feed Sci. Tech. 50: 55-73.

- MONCOULON R. and E. AUCLAIR (2001).** Utilisation du BIOSAF® Sc 47 pour la production de viande de taurillon. Rapport de Recherche. pp 17.
- MORRIS, J. G. (1976).** Oxygen and the obligate anaerobes. *J. Appl. Bacteriol.* 40: 229-244.
- MOULD F.L. and E. R. ORSKOV (1983).** Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis *in sacco*, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 10: 114.
- MUTSVANGWA T., I. E. EDWARDS, J. H. TOPPS, G. F. M. PATERSON (1992).** The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* 55: 35-40.
- NAGARAJA T. G., T. B. AVERY, E. E. BARTLEY, S. J. GALITZER, A. D. DAYTON (1981).** Prevention of lactic acidosis in cattle by lasalocid or monensin. *J. Anim. Sci.* 53: 206-216.
- NAGARAJA T. G., T. B. AVERY, E. E. BARTLEY, S. K. ROOF, A. D. DAYTON (1982).** Effect of lasalocid, monensin or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 54: 649-658.
- NAGARAJA T. G., T. B. AVERY, S. J. GALITZER, D. L. HARMON (1985).** Effect of ionophores antibiotic on experimentally induced lactic acidosis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 46: 2444-2452.
- NEWBOLD C. J. and R. J. WALLACE (1988).** Effects of ionophores monensin and tetronasin on stimulated development of ruminal acidosis *in vitro*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2981-2985.
- NEWBOLD C. J., P. E. V. WILLIAMS, N. MC KAIN, A. WALKER, R. J. WALLACE (1989).** The effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of sheep. Vol 49 p 47A
- NEWBOLD C. J., R. J. WALLACE, F. M. MCINTOSH (1993).** The stimulation of rumen bacteria by *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the respiratory activity of the yeast. *J. Anim. Sci.* 71 (Suppl. 1): 280 (Abstr.).
- NEWBOLD C. J., R. J. WALLACE, X. B. CHEN, F. M. MCINTOSH (1995).** Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1811-1818.
- NEWBOLD C. J., R. J. WALLACE, F. M. MCINTOSH (1996).** Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *Brit. J. Nutr.* 76: 249-261.
- NEWBOLD C. J., F. M. MCINTOSH, R. J. WALLACE (1998).** Changes in the microbial population of a rumen-stimulating fermenter in response to yeast culture. *Can. J. Anim. Sci.* 78: 241-244.
- NISBET D. J. and S. A. MARTIN (1990).** Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3515-3518.
- NISBET D. J. and S. A. MARTIN (1991).** Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69: 4628-4633.
- NISBET D. J. and S. A. MARTIN (1993).** Effects of fumarate, L-malate, and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on D-lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Curr. Microbiol.* 26: 133-136.
- NISBET D. J. and S. A. MARTIN (1994).** Factors affecting L-lactate utilization by the *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 72: 1355-1361.
- NOCEK J. E. (1997).** Bovine acidosis: implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80: 1005-1028.
- NORDSTORM, D. K. (1977).** Thermochemical redox equilibria of ZoBell's solution : *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 41: 1835-1841.

- NORDSTROM, D. K. and F. D. WILDE (1998)**. Reduction-oxidation potential (electrode method). Pages 3–15 in National Field Manual for the Collection of Water Quality Data. U. S. Geological Survey techniques of Water Resources Investigations, Book 9, Chapter A6, Section 6.5. US Geological Survey, Reston, VA.
- OETZEL G. R. (2000)**. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. Proceedings of the Thirty-Third Annual Conference, American Association of Bovine Practitioners, Rapid City, South Dakota, USA. p 46-53.
- OFFER N. W. (1990)**. Maximising fibre digestion in the rumen: The role of yeast culture. In: Alltech Technical Publications. Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 6th Annual Symposium. Nicholasville, Kentucky, U.S.A. Edited by LYONS T. P. p 79-93.
- OFFER N. W. (1990)**. Maximising fiber digestion in the rumen: the role of yeast culture. In *Biotechnology in the Feed Industry* ed T.P. Lyons. Alltech Technical Publications, Nicholasville, Kentucky. pp. 79.
- OFFNER A. and D. SAUVANT (2004)**. Prediction of *in vivo* starch digestion in cattle from *in situ* data. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111: 41-56.
- OFFNER A. and D. SAUVANT (2006)**. Thermodynamic modelling of ruminal fermentations. *Anim. Res.* 55: 343-365.
- ONDERDONK A. B., J. JOHNSTON, J. W. MAYHEW, S. L. GORBACH (1976)**. Effect of dissolved oxygen and Eh on *Bacteroides fragilis* during continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:168–172.
- ORPIN C. G. (1975)**. Studies in the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 91: 249-262.
- OWENS F. N. and A. L. GOETSCH (1988)**. Ruminal fermentation. In: *The ruminant animal : Digestive Physiology and Nutrition*. Eds. Church D. C. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- OWENS F. N., D. S. SECRIST, W. J. HILL, D. R. GILL (1998)**. Acidosis in cattle: a review. *J Anim Sci* 76, 275-286.
- PARKER R. B (1974)**. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* 29: 4-8.
- PATRA R. C., S. B. LAL, D. SWARUP (1996)**. Biochemical profile of rumen liquor, blood, urine in experimental acidosis in sheep. *Small Ruminant Res.* 19: 177-180.
- PELMONT (1993)**. Bactéries et environnement. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP SCIENCES. pp 15-68.
- PERRY K. D. and C. A. E. BRIGGS (1955)**. A common type antigen in streptococci of groups D and E. *J. Patho. Bacteriol.* 70: 546.
- PETRUZZI H., A. DANFAER, P. NOGAARD (2002)**. A dynamique simulation model of nutrient digestion in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Feed Sci.* 11: 367-397.
- PEYRAUD J. L., E. APPER-BOSSARD (2006)**. L'acidose latente chez la vache laitière. *INRA Prod. Anim.* 19: 79-92.
- PICEK T., M. ŠIMEK, ŠANTRŮČKOVÁ (2000)**. Microbial responses to fluctuation of soil aeration status and redox conditions. *Biol. Fertil. Soils* 31: 315-322.
- PIVA G., S. BELLADONNA, G. FUSCONI, F. SICBALDI (1993)**. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. *J. Dairy Sci.* 76: 2717-2722.
- PLAIZIER J. C., A. MARTIN, T.F. DUFFIELD, R. BAGG, P. DICK, B. W. MCBRIDE (1999)**. Monitoring acidosis in the transition dairy cow. *J. Dairy Sci.* 82 (Suppl. 1): 110.

- PLATA P. F., G. D. MENDOZA, R. G. BARCENA, S. M. GONZALEZ (1994).** Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fibre digestion in steers fed oat straw diets. *Anim. Feed Sci. Tech.* 49: 203-210.
- PLAYNE M. J. (1985).** Determination of ethanol, volatile fatty acids, lactic acid and succinic acid in fermentation liquids by gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 36: 638-644.
- PLAYNE M. J. and P. MC DONALD (1966).** The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food Agric.* 17: 264.
- POWER G. and H. STEGALL (1970).** Solubility of gases in human red blood cell ghosts *J Appl Physiol.* 29: 145-149
- PRESCOTT L. M., J. P. HARLEY, A. K. KLEIN (2003).** Microbiologie. Ed. De Boeck, Bruxelles, Belgique.
- PRINS R. A., A. LAUCHORST, P. VAN DER MEER, C. J. VAN NEVEL (1975).** Some characteristics of *Anaerovibrio lipolytica*, a rumen lipolytic organism. *Ant. Van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.* 41: 1-11.
- QUIDLEY J. D., L. B. WALLIS, H. H. DOWLEN, R. N. HEITMAN (1992).** Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth, and intake in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 75: 3531-3538.
- RAYNAUD P. (1959).** Recherches sur le métabolisme de l'azote dans les réservoirs gastriques des ruminants. Thèse de Doctorat D'état. INPT.
- REMOND B., H. BRUGERE, C. PONCET, R. BAUMONT (1995).** Le contenu du réticulo-rumen. *In: Nutrition des Ruminants Domestiques.* Editeurs : Jarrige, R., Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce, M. Journet. INRA, Paris. p 253-298.
- RENZ F. (1954).** Milk production with the active yeast concentrate "Astrol". *Zuchtungskunde.* 28: 298-304.
- ROA M. L., R. J. BARCENA, S. M. GONZALEZ, M. G. MENDOZA, C. M. E. ORTEGA, B. C. GARCIA (1997).** Effect of fiber source and a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* 1026) on digestion and the environment in the rumen of cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64: 327-336.
- ROBINSON P. H. and J. E. GARRETT (1999).** Effect of Yeast Culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on Adaptation of Cows to Postpartum Diets and on Lactational Performance. *J. Anim. Sci.* 77: 988-999.
- ROCHETTE Y., M. FABRE, J. P. JOUANY, C. MARTIN (2005).** Procédure de vérification du système de collecte de méthane émis par les ruminants. *Cah. Tech. INRA.* 54: 3-10.
- ROGER V., G. FONTY, S. KOMISARCZUK-BONY, P. GOUET (1990).** Effects of physiochemical factors on the adhesion to cellulose Avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes subsp. succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3081-3087.
- ROGERS J. A., L. D. MULLER, C. L. DAVIS, W. CHALUPA, D. S. KRONFTLD, L. P. KARCHER, K. R. CUMMINGS (1985).** Response of dairy cows to sodium bicarbonate and limestone in early lactation. *J. Dairy Sci.* 68: 646.
- ROSE A. H. (1987).** Yeast culture, a microorganism for all species: A theoretical look at its mode of action. *In: Biotechnology in the Feed Industry.* Edited by LYONS T. P. Alltech Technical Publications: Nicholasville, Kentucky, U.S.A. p 113-118.
- ROSSI F., P. S. COCCONCELLI, F. MASOERO (1995).** Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. *Ann. Zootech.* 44: 403-409.
- ROWELL D. L. (1981).** Oxidation and reduction. *In: The Chemistry of Soil Processes*, pp. 401-462 [DJ Greenland and MHB Hayes, editors]. Wiley, Toronto, Canada.

- RUSSELL J. B. (1991).** Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 559-565.
- RUSSELL J. B. (1993).** Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 559-565.
- RUSSELL J. B. and J. M. CHOW (1993).** Another theory for the action of ruminal buffer salts: Decreased starch fermentation and propionate production. *J. Dairy Sci.* 76:826-830.
- RUSSELL J. B. and G. M. COOK (1995).** Energetics of bacterial growth: Balance of anabolic and catabolic reactions. *Microbiol. Rev.* 59: 48-62.
- RUSSELL J. B. and D. B. DOMBROWSKI (1980).** Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 604-610.
- RUSSELL J. B. and T. HINO (1985).** Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: a spiralling effect that contributes to rumen acidosis. *J. Dairy Sci.* 68: 1712-1721.
- RUSSELL J. B. and H. J. STROBEL (1989).** Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1-6.
- RUSSELL J. B. and R. J. WALLACE (1989).** Energy yielding and consuming reactions. *In: The Rumen Microbial Ecosystem.* Hobson P. N. & R. J. Wallace (Eds). Elsevier Applied Science, London. pp 185-216.
- RUSSELL J. B., and D. B. WILSON (1996).** Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79: 1503-1509.
- SAUER F. D. and R. M. TEATHER. (1987).** Changes in oxidation reduction potentials and volatile fatty acid production by rumen bacteria when methane synthesis is inhibited. *J. Dairy Sci.* 70:1835-1840.
- SAUVANT D. (1993).** La production de méthane dans la biosphère : le rôle des animaux d'élevage. *Courrier de la cellule Environnement INRA.* 18: 67-70.
- SAUVANT D., C. MARTIN, J. L. PEYRAUD (2006).** Introduction générale. *In : Dossier, L'acidose chez les ruminants.* INRA Productions Animales. 19: 69-78.
- SAUVANT D., F. MESCHY, D. MERTENS (1999).** Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Prod. Anim.* 12: 49-60.
- SAUVANT D., S. GIGER-REVERDIN, P. SCHMIDELY (2004).** Rumen acidosis: modeling ruminant response to yeast culture. *Proceeding of Alltech's 20th International Symposium "re-imagining the feed and food industries".* Nottingham University Press, Nottingham (GBR). pp 221-229. Lyons, T.P. (Editeur); Jacques, K.A. (Editeur).
- SAUVANT D., J. M. PEREZ, G. TRAN (2004).** Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. Porcs, volailles, bovins, ovins, caprins, lapins, chevaux, poissons. INRA Editions, Paris, France.
- SCHÄFER G., M. ENGELHARD, V. MÜLLER (1999).** Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 570-620.
- SCHELLING G. T. (1984).** Monensin mode of action in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58: 1518-1539.
- SCHWARTZKOPF-GENSWEIN K. S., K. A. BEAUCHEMIN, D. J. GIBB, D. H. CREWS JR, D. D. HICKMAN, M. STREETER, T. A. MCALLISTER (2003).** Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: a review. *J. Anim. Sci.*, 81 (Suppl. 2). E149-E158.
- SCOTT R. I., N. YARLETT, K. HILLMAN, T. N. WILLIAMS, A. G. WILLIAMS, D. LLOYD (1983).** The presence of oxygen in rumen liquor and its effects on methanogenesis. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 143-149.

- SEGEL I. H. (1976).** Biochemical Calculations. 2nd ed., New York: John Wiley and Sons.
- SILLEY P. (2000).** Anaerobic microbiology – past, present and future. Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, UK.
- SMITH P. H. and HUNGATE R. E. (1958).** Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium n. sp.* J. Bacteriol. 75: 713–718
- SODER K. J. and L. A. HOLDEN (1999).** Dry matter intake and milk yield and composition of cows fed yeast prepartum and postpartum. J. Dairy Sci. 82: 605–610.
- SOKATCH J. R. (1969).** Fermentation of sugars. In: Bacterial physiology and metabolism. p. 72-108, [Academic Press Inc]. London, UK.
- STELLA A. V., R. PARATTE, L. VALNEGRI, G. CIGALINO, G. SONCINI, E. CHEVAUX, V. DELL'ORTO, G. SAVOINI (2007).** Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. Small Rum. Res. 67: 7-13.
- STEWART C. S. D. DINSDALE, K. J. CHENG, C. PANIAGUA (1979).** The digestion of straw in the rumen. In: E. Grossbard (Ed.): Straw decay and its effects on disposal and utilization. John Wiley and Sons Lts., Chichester, U.K. pp 123-130.
- STREETER M. N., WAGNER D. G., HIBBERD C. A., OWENS F. N. (1990).** Comparison of corn with four sorghum grain hybrids: site and extent of digestion in steers. J. Anim. Sci. 68: 3429-3440.
- STOKES, M. R. and L. S. BULL (1986).** Effects of sodium bicarbonate with three ratios of hay crop silage to concentrate for dairy cows. J. Dairy Sci. 69: 2671-2680.
- STUMM W. and J. J. MORGAN (1981).** Aquatic chemistry. J. Wiley and Sons, New York.
- SULLIVAN H. M. and S. A. MARTIN (1999).** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on *in vitro* mixed ruminal micro organism fermentation. J. Dairy Sci. 82: 2011–2016.
- SWARTZ D. L., L. D. MULLER, G. W. ROGERS, G. A. VARGA (1994).** Effect of yeast cultures on performance of lactating dairy cows: a field study. J. Dairy Sci. 77: 3073-3080.
- TARDY Y., L. MERCURY., C. ROQUIN., P. VIEILLARD. (1999).** Le concept d'eau ice-like : hydratation-déshydratation des sels, hydroxydes, zéolites, argiles et matières organiques vivantes ou inertes. C. R. Acad. Paris, Sci de la terre et des planètes. 329: 377-388.
- TERRY R. A., J. M. A TILLEY, G. E. OUTEN (1969).** Effect of pH on cellulose digestion under *in vitro* conditions. J. Sci. Food and Agri. 20: 317–320.
- THAUER R. K., K. JUNGERMANN, K. DECKER (1977).** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bact. Rev. 41: 100-180.
- THEODOROU M. K., and J. FRANCE (1993).** Rumen microorganisms and their interactions. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. pp 145-163. Forbes J. M., J. France (eds). CAB international.
- THOMAS J. W., R. S. EMERY, J. K. BREAUX, J. S. LIESMAN (1984).** Response of milking cows fed a high concentrated, low roughage diet plus sodium bicarbonate, magnesium oxide or magnesium hydroxide. J. Dairy Sci. 67: 2532-2545.
- THOMSON D. J., D. W. BEEVER, M. J. LATHAN, M. E. SHARPE, R. A. TERRY (1978).** The effect of inclusion of mineral salts in the diet on dilution rate, the pattern of rumen fermentation and the composition of the rumen microflora. J. Agric. Sci. (Camb.) 91: 1.

- TURNER, A. W. and V. E. HODGETTS (1955).** Buffer systems in the rumen of the sheep. I. pH and bicarbonate concentration in relationship to $p\text{CO}_2$. Aust. J. Agric. Res. 6: 116-124.
- VAN HORN H. H., B. HARRIS, M. J. TAYLOR, K. C. BACHMAN, C. J. WILCOX (1984).** By-product feeds for lactating dairy cows: effects of cottonseed hulls, sunflower hulls, corrugated paper, peanut hulls, sugarcane bagasse and whole cottonseed with additives of fat, sodium bicarbonate and *Aspergillus oryzae* product on milk production. J. Dairy Sci. 67: 2922-2938.
- VAN KESSEL J. S. and J. B. RUSSELL (1996).** The effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. J. Dairy Sci. 79: 1237-1243.
- VAN SOEST J. P., J. B. ROBERTSON, B. A. LEWIS (1991).** Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. of Dairy Sci. 74: 3583-3597.
- VENNESLAND B. and M. E. HANKE (1940).** The oxidation-reduction potential requirements of a non-spore forming obligate anaerobe. J. Bacteriol. 39: 139-169.
- VÉRITÉ R., B. MICHALET-DOREAU., P. CHAPOUTOT., J. L. PEYRAUD., C. PONCET (1987).** Révision du système des protéines digestibles dans l'intestin (PDI). Bull. Tech. CRZV Theix, INRA. 70: 19-34.
- WALDEN W. C. and D. J. HENTGES (1975).** Differential effects of oxygen and oxidation-reduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. Appl. Microbiol. 30: 781-785.
- WALDRIP H. M. and S. A. MARTIN (1993).** Effect of an *Aspergillus oryzae* fermentation extract and other factors on lactate utilization by the ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii*. J. Anim. Sci. 72: 2770-2776.
- WALLACE R. J. (1996).** The mode of action of yeast culture in modifying rumen fermentation. In: Alltech Technical Publications. Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 12th Annual Symposium. Nicholasville, Kentucky, U.S.A. Edited by LYONS T. P. and JACQUES K. A. p 217-232.
- WALLACE R. J. and C. J. NEWBOLD (1992).** Probiotics for ruminants. In: Probiotics: The Scientific Basis, pp. 317-353, [R Fuller, editor]. Chapman and Hall, London, UK.
- WALLACE R. J. and C. J. NEWOLD (1993).** Rumen fermentation and its application: the development of yeast cultures as feed additives. In: Alltech Technical Publications. Biotechnology in the Feed Industry. Nicholasville, Kentucky, U.S.A. Edited by LYONS T. P. p 173-192.
- WALLENTINE M. V., N. P. JOHNSTON, D. ANDRUS, R. JONES, J. T. HUBER, G. HIGGINBOTHAM (1986).** The effect of feeding an *Aspergillus oryzae* culture-vitamin mix on the performance of lactating dairy cows during periods of heat stress. J. Anim. Sci. 69 (Suppl. 1): 294 (Abstr.)
- WALLNOFER P., AND R. L. BALDWIN (1967).** Pathway of propionate formation in *Bacteroides rumenicola*. J. Bacteriol. 93:504-505.
- WANG Z., M. L. EASTRIDGE, X. QIU (2001).** Effects of forage neutral detergent fiber and yeast culture on performance of cows during early lactation. J. Dairy Sci. 84: 204-212.
- WARDLE M. D. and G. M. RENNINGER (1975).** Bactericidal effect of H_2O_2 on spacecraft isolates. Appl. Microbiol. 30: 710-711.
- WARNER A. C. (1956).** Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen techniques. J. Gen. Microbiol. 14: 733.
- WEIDMEIER R. D. M. J. ARAMBEL, J. L. WALTERS (1987).** Effect the yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. J. Dairy Sci. 70: 2063-2068.
- WEIMER P. J. (1998).** Manipulating Ruminant Fermentation: A Microbial Ecological Perspective. J. Anim. Sci. 76: 3114-3122.

- WILLIAMS P. E. V. (1989).** Biotechnologies et probiotiques en Grande-Bretagne. Bull. Des G. T. V. 89: 13-30.
- WILLIAMS P. E. V. and C. J. NEWBOLD (1990).** Rumen Probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. *In: Recent Advances in Animal Nutrition*, p. 211-227, [DJA Cole and W Haresign]. Butterworths, London, UK.
- WILLIAMS P. E. V., C. A. G. TAIT, G. M. INNES, C. J. NEWBOLD (1991).** Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69: 3016-3026.
- WHITFORD, M. F., R. M. TEATHER, R. J. FORSTER (2001).** Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiol.* 1:5.
- WOHLT J. E., A. D. FINKELSTEIN, C. H. CHUNG (1991).** Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility and performance by dairy cattle during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74: 1395-1407.
- WOHLT J. E., T. T. CORCIONE, P. K. ZAJAC (1998).** Effects of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. *J. Dairy Sci.* 81: 1345-1352.
- YOON I. K. and M. D. STERN. (1996).** Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79: 411-417.
- ZEHNDER A. J. B. and W. STUMM (1988).** "Geochemistry and Biogeochemistry of Anaerobic Habitats." *In: A. J. B. Zehnder (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms*, John Wiley and Sons, New York. pp 1-38.
- ZELENAK I., D. JALC, V. KMET, P. SIROKA (1994).** Influence of diet and yeast supplement on *in vitro* ruminal characteristics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49: 211-221.

ANNEXES

Annexe 1 : Liste européenne des principaux microorganismes autorisés.

Souches composant le produit	Nom commercial du probiotique	Espèces autorisées									
		Veaux	Bovins viande	Vaches laitières	Poulets	Poules pondeuses	Dindes	Porcelets	Porcelets d'engrais -sements	Truies	Lapins
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC Sc 47	BIOSAF® Sc 47		X	X				X		X	X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNCM I-1079	LEVUCCELL® SB20							X			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CNCM I-1077	LEVUCCELL® SC20		X	X							
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 493.94	YEA SACC® 1026	X	X	X							
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MUCL 39885	BIOSPRINT®		X					X			
<i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lastiskii</i> BCCM/MUCL 39434	KLUYTEN®										
<i>Kluyveromyces marxianus fragilis</i> B0399	TURVAL B0399										
<i>Bacillus licheniformis</i> (DSM 5749) <i>Bacillus subtilis</i> (DSM 5750)	BIOPLUS® 2B	X					X	X	X	X	
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> NCIMB 40112/CNCM I-1012	TOYOCERIN®		X		X			X	X	X	X
<i>Lactobacillus farciminius</i> (CNCM MA 67/4R)	BIACTON®				08/01/2010	08/01/2010	08/01/2010	X			
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 7133	PROVITA E®	X						X			
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 7134	BONVITAL®				05/04/2009			15/04/2007	15/04/2007	14/12/2007	
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 10663/NCIMB 10415	ORALIN®	X			X			X			
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415	CYLACTIN® LBC	X			X			X	X	X	
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 11181	LACTIFERM®	X			25/11/2009			X			

X : sans limitation temps ; jj/mm/aaaa : autorisé jusqu'au

Source : Lesaffre Feed Additives Internal Document.

Annexe 2 : Dosage de l'ammoniac

Principe

Il s'agit d'une méthode spectro- photométrique : le réactif de Nessler réagit avec les ions NH_4^+ en présence de NaOH ; il se forme un composé brun - orangé. La concentration en ions est calculée à partir de la mesure de l'absorbance à 420 nm effectuée avec un spectrophotomètre.

Réactifs

- Chlorure d'ammonium (NH_4Cl),
- Réactif 1 pour l'azote ammoniacal pour analyse des sols (Ammonia Nitrogen 1 Reagent , HACH, Düsseldorf, Germany; Cat. 14555-23)
- Réactif de Nessler à base d'hydroxyde de sodium et d'iodure mercurique (Nessler Reagent , HACH, Düsseldorf, Germany; Cat. 21194-49).

Préparation de la gamme étalon

- Préparer une solution mère de NH_4Cl (297.2 mg L^{-1}) correspondant à 100 mg L^{-1} de NH_4^+ (à conserver à 4°C)
- Etablir une gamme de 0 à 20 mg/L de NH_4^+ :

mg L^{-1}	0	5	10	15	20
Solution mère à 100 mg L^{-1} (ml)	0	0,5	1	1,5	2
Eau distillée (ml)	10	9,5	9	8,5	8

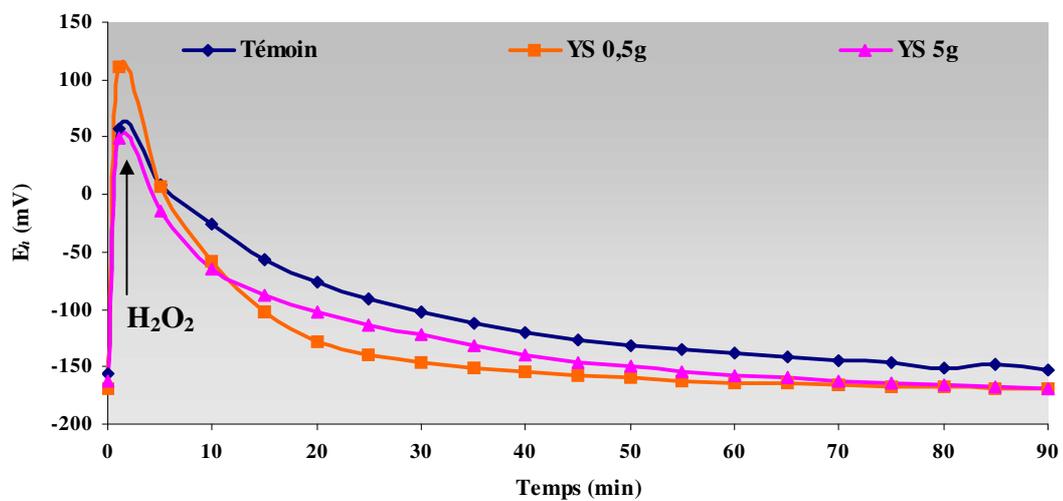
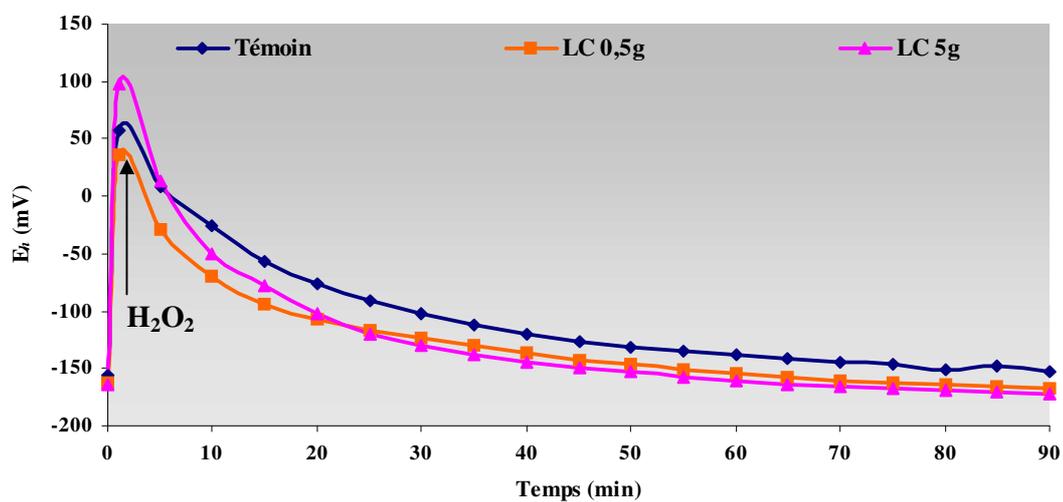
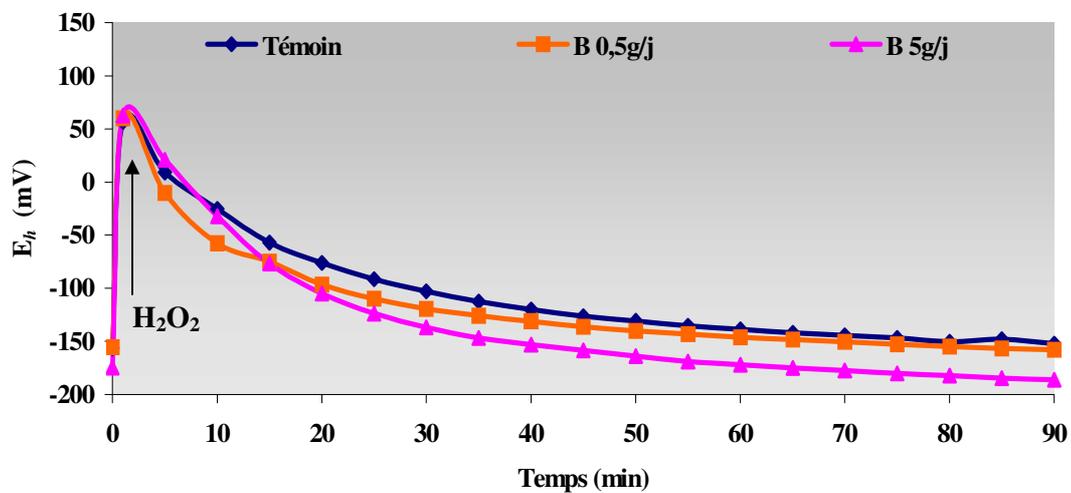
Préparation des échantillons

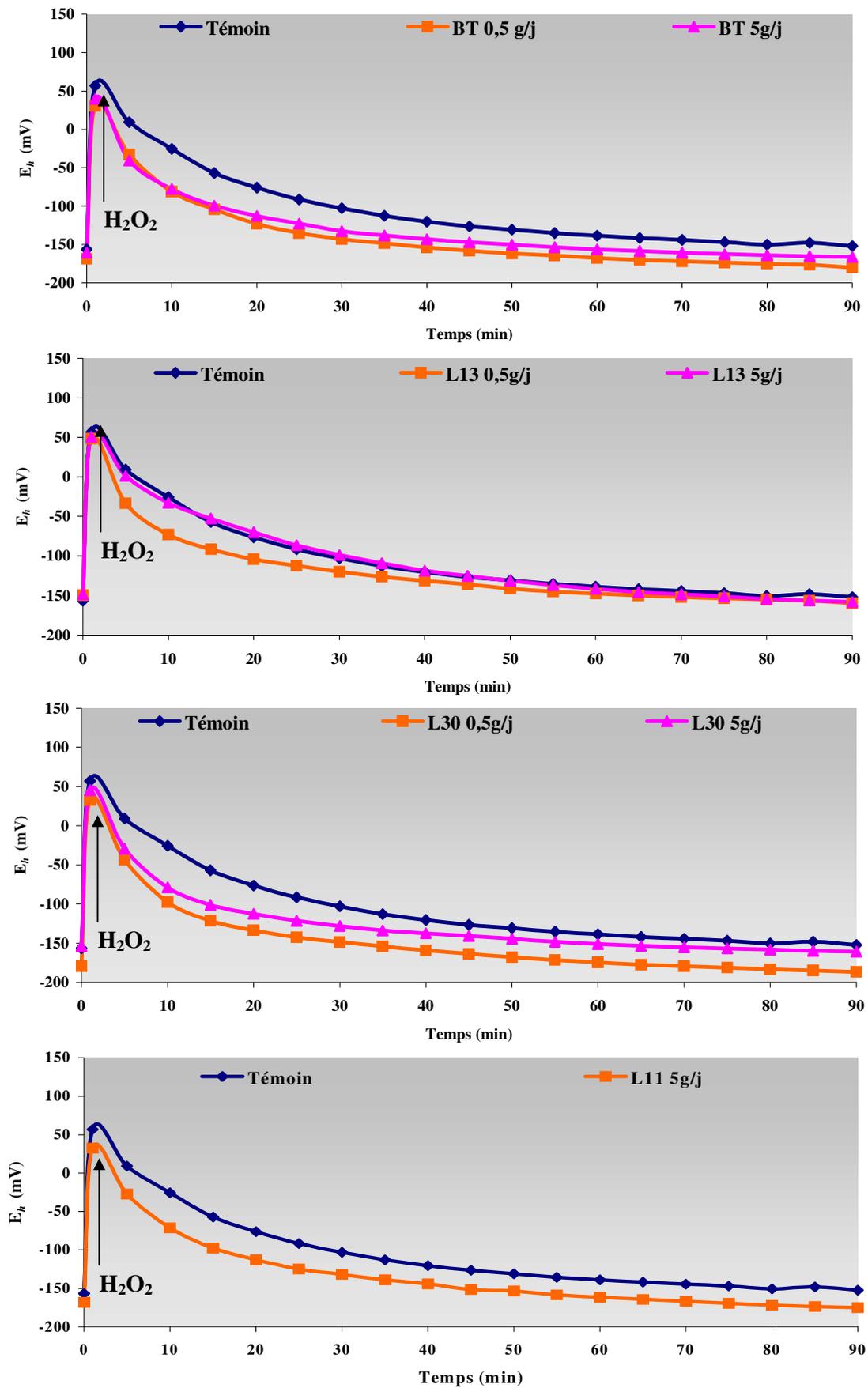
Diluer 0.5 ml de surnageant de jus de rumen obtenu après centrifugation ($4000g$, 20 mn) dans 10 ml d'eau distillée (dilution au $21^{\text{ème}}$).

Analyse

- Ajouter 3 gouttes de réactif 1,
- ajouter 400 μl de réactif de Nessler,
- Vortexer et laisser reposer 10 min.

La lecture de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à 420 nm réglé au préalable à 0 par rapport à l'eau.

Annexe 3 : Courbes d'évolutions du E_h suite à un apport d' H_2O_2 (effet dose et souche)



Annexe 4. Dosage des constituants pariétaux

(Appareil Fibertec, Velp Scientifica).

1) Neutral Detergent Fiber (NDF) selon Van Soest *et al.*(1991).

Principe

La méthode est basée sur la solubilisation, par une solution neutre d'agents tensioactifs

- de la plupart des hydrates de carbone solubles, pectines incluses (polymères de l'acide galacturonique),
- de la plupart des protéines,
- des lipides,
- des substances minérales solubles, une partie de la silice étant incluse.

La part soluble est définie comme « Neutral Detergent Soluble » (NDS).

Le résidu, appelé « Neutral Detergent Fiber » (NDF) est composé des parties fibreuses des parois des cellules des plantes : hémicellulose (polymère de sucres, *e.g.* le xylane, polymère de xylose), cellulose (polymère de D-glucose), lignine (polymère du phénylpropane), cutine et substances minérales insolubles et quelques protéines des parois cellulaires.

Réactifs

- Solution détergente neutre composée de :
 - borate de sodium décahydraté ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) : 6,81 g,
 - éthylène-diamine-tetra-acétate, sel disodique (EDTA, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$) : 18,61 g,
 - sulfate de lauryle sodium neutre ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) : 30 g,
 - 2-éthoxyethanol (éthylène glycol monoéthyl éther, Cellosolve, $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$): 10 ml,
 - disodium phosphate anhydre (Na_2HPO_4) : 4,56 g ou $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 5,71 g,
 - qsp 1000 ml avec de l'eau distillée ;

Et préparée comme suit :

- dissoudre le borate de sodium et l'EDTA dans un Erlen avec une partie de l'eau distillée en chauffant sous agitation, puis ajouter le sulfate de lauryle.
 - dissoudre séparément le disodium phosphate dans une autre part de l'eau distillée,
 - mélanger les deux solutions dans une fiole jaugée de 1000 ml,
 - ajouter le 2-éthoxyéthanol,
 - compléter à 1000 ml (eau distillée),
(contrôler le pH qui doit être compris entre 6,9 et 7,1) ;
- n-octanol ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$) ;
 - sulfite de sodium anhydre (Na_2SO_3);
 - acétone;
 - alpha amylase thermorésistante (ref. A3306, Sigma).

Mode opératoire

- Peser le creuset vide.
- Peser 0.5 g à 1g d'échantillon dans un creuset.
- Ajouter 100 ml de solution détergente neutre pour 1 g et 50 ml pour 0.5 g.
- Ajouter 0.5 g de sulfite de sodium anhydre (0.25 g pour un échantillon de 0.5 g)
- Ajouter 50 µL d'alpha amylase (25 µL pour un échantillon de 0.5 g).
- Ajouter quelques gouttes de n-octanol.
- Porter à ébullition et laisser sous reflux pendant 60 minutes à partir du début de l'ébullition.
- Filtrer et laver à l'eau distillée portée à ébullition jusqu'à disparition complète de la mousse.
- Rincer 2 fois à l'acétone.
- Sécher 8 heures à 105 °C (étuve).
- Laisser refroidir dans un dessiccateur.
- Peser (creuset + NDF+cendres insolubles).

2) Acid Detergent fiber (ADF) selon Van Soest *et al.* (1991).

Principe

La méthode est basée sur la solubilisation, par une solution acide d'agents tensioactifs :

- des hydrates de carbone solubles,
- des protéines,
- des lipides,
- de l'hémicellulose,
- des substances minérales solubles.

Le résidu fibreux est composé de cellulose, lignine, cutine et des minéraux insolubles en milieu acide (silice), et est défini comme ADF.

La différence entre les résidus NDF et ADF est essentiellement l'hémicellulose.

Réactifs

- Solution détergente acide composée de :
 - cétyltriméthylammonium bromide (qualité technique, C₁₉H₄₂BrN) : 20 g,
 - acide sulfurique 1N (H₂SO₄, 49.04 g L⁻¹)

Et préparée comme suit :

Dissoudre le tensioactif dans la solution d'acide sulfurique (1000 ml).

- n-octanol,
- acétone.

Mode opératoire

- Après avoir pesé le résidu NDF, ajouter 100 ml (50 ml pour un échantillon de 0.5 g) de solution détergente acide.
- Ajouter quelques gouttes de n-octanol.
- Porter à ébullition et laisser sous reflux pendant 60 minutes à partir du début de l'ébullition.
- Filtrer et laver à l'eau distillée portée à ébullition jusqu'à disparition complète de la mousse.
- Rincer 2 fois à l'acétone
- Sécher 8 heures à 105 °C (étuve).
- Laisser refroidir dans un dessiccateur.
- Peser (creuset + NDF+cendres insolubles).
- Calciner au four (550°C, 12 h).
- Laisser refroidir dans un dessiccateur.
- Peser (creuset + cendres insolubles dans le détergent neutre puis acide).

Calculs

$$\text{NDF \%} = \frac{(\text{poids du creuset} + \text{poids du résidu NDF}) - \text{poids du creuset-cendres} \times 100}{(\text{poids de l'échantillon} \times \text{MS de l'échantillon})}$$

$$\text{ADF \%} = \frac{(\text{poids du creuset} + \text{poids du résidu ADF}) - \text{poids du creuset-cendres} \times 100}{(\text{poids de l'échantillon} \times \text{MS de l'échantillon})}$$

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADF	Acid Detergent Fibre
ADP	Adénosine Di-Phosphate
AFC	Antibiotiques Facteurs de Croissance
Ag/AgCl	Argent : Chlorure d'Argent
AGV	Acides Gras Volatils
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BACA	Bilan Alimentaire Cations Anions
C₂	Acétate
C₃	Propionate
C₄	Butyrate
CMCase	CarboxyMéthylCellulose
E_h	Potentiel Redox
e⁻	Electrons
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
EMPE	Ensilage de maïs plante entière
F	1 Faraday = 96 487 Coulombs.
FAD	Flavin Adénine Dinucleotide
GMQ	Gain Moyen Quotidien
GRF	Glucides Rapidement Fermentescibles
h	heure
I.C	Indice de Consommation
log (P_{O₂})	Pression Partielle d'oxygène exprimée en logarithme
MAT	Matières Azotés Totales
min	minutes
mM	millimolaire
MO	Matière Organique
mOsm/L	Milliosmoles par Litre
MS	Matière Sèche
mV	Millivolts
NAD	Nicotinamide-Adénine Di-Nucléotide
NDF	Neutral Detergent Fibre
PLS	Phosphorylation Liée au Substrat
PTE	Phosphorylation par Transfert d'Electrons
R	Constante des gaz parfaits = 8,314 J.K ⁻¹ .mol ⁻¹
RUSITEC	Rumen Simulating Technique
S	Entropie
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
UFC/g	Unité Formant Colonie par gramme
T	Température en Kelvin (K) ou en degré Celsius (°C)
v/v	Volume par volume
p/v	Poids par volume
ΔE	Différence de potentiel électrique ou force électromotrice
ΔG	la variation d'énergie libre
ΔH	la variation d'enthalpie
ΔS	la variation de l'entropie

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Fig. 1 : Conformation extérieure de l'estomac du bœuf	4
Fig. 2 : Bactéries ruminales	8
Fig. 3 : Un Protozoaire cilié du rumen	10
Fig. 4 : Les Champignons du rumen	11
Fig. 5 : Régénération du NAD (fermentation)	12
Fig. 6 : Voies du métabolisme glucidique dans le rumen (<i>verso</i>)	12
Fig. 7 : Evolution des proportions d'acides gras volatils et de la concentration dans le rumen en fonction du pH ruminal	13
Fig. 8 : Evènements des séquences associées à l'installation de l'acidose ruminale	15
Fig. 9 : Evolution au cours du nycthémère du pH ruminal chez une vache laitière montrant après deux repas d'épreuve des périodes d'acidose latente	16
Fig. 10 : Image de <i>S. cerevisiae</i> en microscopie électronique (a) et sur milieu gélosé (b)	20
Fig. 11 : Cinétiques du nombre de levure dans le rumen et dans les fèces	22
Fig. 12 : Effet de la levure probiotique sur la MSI, la production et la qualité du lait	24
Fig. 13 : Effet de la levure probiotique sur la MSI, le GMQ et l'IC chez les bovins viande	26
Fig. 14 : Effets de différentes souches de levures sur la population bactérienne ruminale en culture mixte	31
Fig. 15 : Effet de la levure sur la proportion d'ARN ribosomal des bactéries ruminales	31
Fig. 16 : Effet de la levure probiotique sur la teneur en lactate et sur le pH ruminal	33
Fig. 17 : Mouvement des électrons et potentiels de réduction	45
Fig. 18 : La mesure d'un potentiel réducteur (a) et oxydant (b) par rapport à l'électrode à hydrogène	47
Fig. 19 : Une nouvelle méthode pour la mesure des paramètres physico-chimiques ruminiaux	59
Fig. 20 : Evolution du pH ruminal chez la vache tarie (effet méthode)	65
Fig. 21 : Evolution du E_h ruminal chez la vache tarie (effet méthode)	66

Fig. 22 : Evolution du log (PO_2) ruminal chez la vache tarie (effet méthode)	67
Fig. 23 : Evolution du pH et du E_h chez la vache tarie (effet nature de la ration)	68
Fig. 24 : Relation entre le pH et E_h ruminal (effet nature de la ration)	70
Fig. 25 : Evolution du pH ruminal chez la vache tarie (effet levure 4 g)	74
Fig. 26 : Evolution du E_h ruminal chez la vache tarie (effet levure 4 g)	75
Fig. 27 : Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur la concentration en AGV_t (mM)	76
Fig. 28 : Evolution du log (PO_2) chez la vache tarie (effet levure 4 g) <i>verso</i>	82
Fig. 29 : Représentation schématique du dispositif “ <i>ex vivo</i> ” mis en place	88
Fig. 30 : Déroulement chronologique d'une période de mesures	89
Fig. 31 : Evolutions du potentiel redox à différentes concentrations en H_2O_2	91
Fig. 32 : Evolutions du E_h en présence ou non de la levure Sc 47 suite à un apport d' O_2	93
Fig. 33 : Evolution du pH ruminal chez la vache en lactation (effet dose)	103
Fig. 34 : Evolution du E_h ruminal chez la vache en lactation (effet dose)	105
Fig. 35 : Evolution du log (PO_2) du rumen chez la vache en lactation (effet dose)	106
Fig. 36 : Evolution du pH ruminal chez la vache en lactation (effet souche)	120
Fig. 37 : Evolution du E_h ruminal chez la vache en lactation (effet souche)	121
Fig. 38 : Evolution du log PO_2 ruminal chez la vache en lactation (effet souche)	122
Fig. 39 : Evolution du pH ruminal chez la vache en lactation (effet levure vs. bicarbonate)	135
Fig. 40 : Evolution du E_h ruminal chez la vache en lactation (effet levure vs. bicarbonate)	136
Fig. 41 : Evolution du log (PO_2) ruminal chez la vache en lactation (effet levure vs. bicarbonate)	137
Fig. 42 : Concept organisé autour du pH relatant les évènements associés à l'installation de l'acidose ruminale (<i>verso</i>)	147
Fig. 43 : Organisation des évènements faisant intervenir le pH et le E_h lors de l'installation de l'acidose ruminale (<i>verso</i>)	147
Fig. 44 : Le mode d'action de la levure probiotique <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	148

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différents substrats dégradés et fermentés par les principales espèces bactériennes du rumen. Dégradation des substrats (+) ou non (-) <i>verso</i>	8
Tableau 2 : Effet de la levure probiotique sur la dégradabilité ruminale de la MS (%)	28
Tableau 3 : Influence d'un apport d'orge et de levures sur les fermentations ruminales	35
Tableau 4 : Potentiels des électrodes de référence (Volts) en fonction de la température et de la concentration de Chlorure de Potassium	48
Tableau 5 : Composition centésimale et valeur alimentaire des rations pour vache tarie	56
Tableau 6 : Composition centésimale et valeur alimentaire des rations pour vache en lactation	57
Tableau 7 : Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur le pH ruminal	74
Tableau 8 : Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur le E_h du milieu ruminal	75
Tableau 9 : Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur la teneur totale et la concentration en AGV	77
Tableau 10 : Effet d'un apport de 4g de levure probiotique sur la teneur ruminale en lactate	77
Tableau 11 : Relation entre la concentration d'une solution de peroxyde d'hydrogène (%) et son titre ou volume d'oxygène libérée (L)	89
Tableau 12 : Effet de la souche et de la dose de levure sur le potentiel redox initial, sur l'ensemble de la période post prandiale	94
Tableau 13 : Effet de la souche et de la dose de levure sur le potentiel redox initial, sur les quatre premières heures post prandiales	94
Tableau 14 : Effet de la souche et de la dose de levure sur le potentiel redox initial, sur les quatre dernières heures post prandiales	94
Tableau 15 : Effet de la souche et de la dose de levure sur la vitesse de rétablissement du E_h après injection d'eau oxygénée, sur l'ensemble de la période post prandiale (<i>verso</i>)	95
Tableau 16 : Effet de la souche et de la dose de levure sur la vitesse de rétablissement du E_h après injection d'eau oxygénée, sur les quatre premières heures post prandiales (<i>verso</i>)	95
Tableau 17 : Effet de la souche et de la dose de levure sur la vitesse de rétablissement du E_h après injection d'eau oxygénée, sur les quatre dernières heures post prandiales (<i>verso</i>)	95
Tableau 18 : Effet de la souche et de la dose de levure sur la moyenne de E_h (\bar{x}), sur l'ensemble de la période post prandiale (<i>verso</i>)	96
Tableau 19 : Effet de la souche et de la dose de levure sur la moyenne de E_h (\bar{x}), sur les quatre premières heures post prandiales (<i>verso</i>)	96

Tableau 20 : Effet de la souche et de la dose de levure sur la moyenne de E_h (\bar{x}), sur les quatre dernières heures post prandiales (<i>verso</i>)	96
Tableau 21 : Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur le pH ruminal	104
Tableau 22 : Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur le E_h ruminal	105
Tableau 23 : Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur le log (PO_2)	106
Tableau 24 : Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur la teneur totale et le profil en AGV du milieu ruminal	107
Tableau 25 : Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur la teneur en lactate	107
Tableau 26 : Effet d'apport de deux doses de levure probiotique sur la teneur ruminale en ammoniac	108
Tableau 27 : Effet d'apport de différentes souches de levure sur le pH ruminal	121
Tableau 28 : Effet d'apport de différentes souches de levure sur le E_h ruminal	122
Tableau 29 : Effet d'apport de différentes souches de levure sur le log (PO_2) du rumen	123
Tableau 30 : Effet d'apport de différentes souches de levure sur la teneur totale et le profil en AGV du milieu ruminal	123
Tableau 31 : Effet d'apport de différentes souches de levure sur la teneur en lactate	124
Tableau 32 : Effet d'apport de différentes souches de levure sur la teneur ruminale en ammoniac	125
Tableau 33 : Composition chimique des constituants de la ration	132
Tableau 34 : Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur le pH ruminal	135
Tableau 35 : Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur le E_h ruminal	136
Tableau 36 : Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur le log (PO_2) ruminal	137
Tableau 37 : Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur les paramètres fermentaires	138
Tableau 38 : Effet d'un apport de levure et de substance tampon sur la concentration en ammoniac	139
Tableau 39 : Effet d'un apport de levure probiotique et de substance tampon sur la digestibilité apparente de la ration	139

RÉSUMÉ & ABSTRACT

RÉSUMÉ

Contribution à l'étude du mode d'action de la levure *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 chez le ruminant: Approche thermodynamique chez la vache laitière.

L'objectif de ce travail est d'apporter des éléments nouveaux de compréhension du mode d'action de la levure probiotique *Saccharomyces cerevisiae*, utilisée comme additif alimentaire chez la vache laitière. Pour cela et en nous appuyant sur des travaux antérieurs, nous avons attribué *a priori* à la levure, une aptitude particulière à consommer l'oxygène "anormalement" présent dans le rumen et en conséquence celle d'en renforcer le caractère anaérobie. Afin de conserver intactes les caractéristiques physico-chimiques qui confèrent au fermenteur rumen ses propriétés digestives particulières, nous avons choisi d'aborder cette étude par l'application de la relation de Nernst pour exprimer la pression partielle de l'O₂ (log PO_2) en fonction des valeurs de pH et de potentiel redox (E_h). Par le biais d'une méthode *ex vivo* adaptée de prélèvements et de mesures, nous avons mesuré le pH et le E_h parallèlement à la prise d'échantillons du contenu ruminal destinés aux analyses des AGV, du lactate et de l'ammoniac. Deux modèles sont choisis permettant d'abord de mettre en évidence l'effet levure sur vaches tarées et ensuite de confirmer sur vaches en lactation. En présence de levure et pour un régime acidogène, le milieu ruminal devient plus réducteur créant ainsi un environnement favorable aux bactéries anaérobies strictes telles que les cellulolytiques et les utilisatrices de lactate. En abaissant le E_h , la levure favorise la transformation du lactate en propionate permettant au pH ruminal de se maintenir au dessus de 6 et évite ainsi le risque d'acidose. D'après nos résultats, la mesure du potentiel redox apparaît donc comme un paramètre important qui vient compléter celle du pH pour aider à la compréhension du mode d'action de la levure et plus globalement de l'activité fermentaire ruminale. Elle permet partiellement d'envisager les mécanismes de captation d'énergie par les microorganismes du rumen et suggère qu'à des valeurs très basses de E_h , les bactéries cellulolytiques et utilisatrices de lactate sont les seules à pouvoir utiliser des accepteurs d'électrons faibles pour satisfaire leur besoin énergétique et augmenter les produits de fermentation utiles pour l'hôte.

Mots clés : potentiel redox ; thermodynamique ; acidose ; *Saccharomyces cerevisiae* ; mode d'action ; rumen.

ABSTRACT

The mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Sc 47 in ruminants: A thermodynamic approach in dairy cows.

The objective of this study was to bring forward new arguments to gain a better insight of the mode of action of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* used as a feed additive in dairy cows. Based on previous experiments, we have attributed the ability of the yeast to scavenge traces of oxygen in the rumen resulting in the strengthening of the anaerobic character of the milieu. In order to maintain the particular physico-chemical properties of the rumen, we approached this study by the use of the Nernst equation to calculate the partial pressure of oxygen ($\log PO_2$) from pH and redox potential (E_h) values. By means of an adapted *ex vivo* method of sampling and measurement, pH and E_h values were recorded with simultaneous sampling of ruminal fluid for the determination of VFA, lactate and ammonia concentrations. Two models were chosen to firstly gather preliminary results on dry cows and were then further confirmed on lactating animals. The supplementation of yeast in an acidotic diet increased the reducing power of the rumen thereby creating a more favourable environment to the strictly anaerobic bacteria such as the cellulolytic and lactate-utilising bacteria. By decreasing the ruminal E_h , the yeast favoured the conversion of lactate to propionate which maintained the ruminal pH above 6 thus avoiding any risk of ruminal acidosis. According to our results, the redox potential appears therefore to be an important parameter complementing pH measurements. It allows a better understanding of the fermentative activity of the rumen and helps to clarify the mode of action of the probiotic yeast. Furthermore, the E_h gives an indication of how the ruminal microflora capture their energy and suggest that at low E_h , only cellulolytic bacteria and lactate users are able to use electron acceptors issued from the fermentation process in order to satisfy their energy needs.

Key words : redox potential ; thermodynamics ; acidosis ; *Saccharomyces cerevisiae* ; mode of action ; rumen.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Liste des articles, communications et posters

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1^{ère} PARTIE : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1 : Particularités Digestives Chez le Ruminant : <i>Un Rappel</i>	4
Un petit historique.....	5
I. L'activité fermentaire ruminale.....	6
I. 1. L'écosystème ruminale.....	6
I. 2. Les microorganismes du rumen.....	8
I. 2. 1. Les bactéries.....	8
I. 2. 2. Les protozoaires.....	10
I. 2. 3. Les champignons unicellulaires.....	11
II. Le métabolisme énergétique des microorganismes du rumen.....	11
II. 1. La digestion des glucides dans le rumen	12
II. 2. L'acidose ruminale	13
II. 3. Installation de l'acidose ruminale	15
Chapitre 2 : La levure probiotique <i>Saccharomyces cerevisiae</i> chez le ruminant	18
I. Qu'est-ce qu'un probiotique.....	19
I. 1. Les critères de sélection d'un probiotique.....	19
I. 2. Les espèces microbiennes les plus utilisées.....	19
II. La levure probiotique <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	20
II. 1. Les additifs alimentaires à base de levures.....	21
II. 2. Le devenir de la levure probiotique dans le tube digestif du ruminant.....	22
III. Les réponses zootechniques à un apport de levure chez le ruminant.....	22
III. 1. Effets de la levure sur la production laitière.....	23
III. 2. Effets de la levure sur les bovins de boucherie.....	25
IV. La levure probiotique améliore l'utilisation digestive de la ration.....	27
IV. 1. Effets sur la digestibilité totale de la ration.....	27
IV. 2. Effets sur la dégradabilité ruminale.....	28
IV. 3. Effets sur l'utilisation digestive des matières azotées alimentaires.....	29
IV. 4. Effets sur la production ruminale de gaz.....	29

V. Effet levure sur la microflore ruminale.....	30
V. 1. Effet de la levure probiotique sur le nombre total des bactéries du rumen...	30
V. 2. Effet de la levure sur les bactéries cellulolytiques du rumen.....	31
V. 3. Effet de la levure sur les bactéries utilisatrices de lactate du rumen.....	32
VI. Effet de la levure sur le pH et le faciès fermentaire.....	32
VI. 1. Effet de la levure sur le pH et la teneur ruminale en lactate.....	33
VI. 2. Effet de la levure sur les concentrations ruminales en AGV.....	34
VII. Le mode d'action de la levure probiotique.....	35
Chapitre 3 : L'approche thermodynamique	39
I. La Thermodynamique.....	39
I. 1. Le Premier principe de la thermodynamique.....	39
I. 2. Le Deuxième principe de la thermodynamique.....	40
II. L'énergie libre.....	41
III. La constante d'équilibre.....	41
IV. L'ATP : La monnaie énergétique.....	42
V. Les réactions d'oxydo-réduction.....	43
V. 1. La Force électromotrice.....	44
V. 2. Le Potentiel de réduction standard.....	45
V. 3. Les modes de libération d'énergie.....	46
V. 4. Le Potentiel redox.....	46
V. 4. 1. La mesure expérimentale.....	47
V. 4. 2. Les limites du potentiel redox.....	48
V. 5. Le pH.....	49
V. 5. 1. La mesure expérimentale.....	49
V. 6. La relation Potentiel redox – pH.....	49
VI. Les réactions d'équilibre.....	50
VI. 1. La Pression partielle de l'oxygène.....	50
VI. 2. L'influence de la température.....	51
VII. Le transfert d'énergie dans le rumen.....	52
VII. 1. La fermentation lactique.....	53
VII. 2. Les fermentations propioniques.....	53
VII. 3. La méthanogénèse.....	54

2^{ème} PARTIE : METHODOLOGIE

Chapitre 1 : Matériel et méthodes	55
I. Les animaux utilisés.....	55
I. 1. Le modèle “vache tarie”.....	55
I. 2. Le modèle “vache en lactation”.....	55
II. Alimentation.....	56
II. 1. Rations.....	56
II. 1. 1. La ration “vache tarie”.....	56
II. 1. 2. La ration “vache en lactation”.....	57
II. 2. Supplémentation en levure.....	58
III. Mesures et prélèvements en continu.....	58
III. 1. Dispositif.....	58
III. 2. Prélèvement initial et renouvellement de la cellule.....	59
III. 3. Cinétiques.....	60
IV. Les techniques analytiques.....	60
IV. 1. Collecte et traitement des échantillons.....	60
IV. 2. Les acides gras volatils.....	60
IV. 3. Le lactate.....	61
IV. 4. L’azote ammoniacal.....	61
 Chapitre 2 : Validation d’une méthode de prélèvements et de mesures “<i>ex vivo</i>”	62
I. Matériel et méthodes.....	63
I. 1. Méthodes de prélèvements du contenu ruminal et de mesures.....	63
I. 2. Schéma expérimental.....	63
I. 3. Calculs.....	63
I. 4. Analyses statistiques.....	64
II. Effets des méthodes de prélèvement et de mesure.....	64
II. 1. Effet sur le pH ruminal.....	64
II. 2. Effet sur le E_h ruminal.....	66
II. 2. Effet sur la pression partielle de l’oxygène.....	67
III. Effet de la nature de la ration.....	68
III. 1. Effet sur le pH ruminal.....	68
III. 2. Effet sur le E_h ruminal.....	69
III. 3. Relation pH-potentiel redox.....	69

3^{ème} PARTIE : MODÈLE “VACHE TARIÉ”

Chapitre 1 : Effet d'un apport de levure probiotique sur le pH ruminal chez la vache tarie	71
I. Déroulement de l'essai	72
I. 1. Animaux et régimes	72
I. 2. Plan expérimental	73
II. Résultats	73
II. 1. Effet sur le pH ruminal	73
II. 2. Effet sur le E_h ruminal	75
II. 3. Effet sur les paramètres fermentaires	76
II. 3. 1. La concentration et le profil en AGV	76
II. 3. 2. Les teneurs en lactate	77
III. Discussion	78
III. 1. Effet de la ration sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires	78
III. 2. Effet de la levure probiotique sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires	81
III. 3. La levure probiotique renforce le pouvoir réducteur du milieu ruminal	82
IV. Conclusions	84
Chapitre 2 : L'effet d'un apport d'oxygène sur la microflore ruminale en présence ou non de levures	86
I. Déroulement de l'essai	87
I. 1. Animaux et régimes et plan expérimental	87
I. 2. Dispositif de prélèvements et de mesures	88
I. 3. Déroulement d'une période de mesure	89
I. 3. 1. Choix d'une forme d'apport d'oxygène	89
I. 3. 2. L'apport d'H_2O_2 dans la cellule essai	89
I. 4. Essai préliminaire en cellules de mesures	91
I. 5. La mesure du potentiel redox	92
I. 6. Traitements des données	92
I. 7. Analyses statistiques	92
II. Résultats	93
II. 1. Effet de l'oxygène sur l'évolution du E_h du jus de rumen	93
II. 2. Effet de la levure Sc 47 (souche B) sur E_h du jus de rumen soumis à un apport d'oxygène	94
II. 3. Effet de différentes souches et de deux doses de levures sur le potentiel redox initial	94
II. 4. Effet de la souche et de la dose sur la vitesse de rétablissement du E_h	95
II. 5. Effet de la souche et de la dose sur le potentiel redox final	96

III. Discussion.....	97
III. 1. Effet d'un apport d'oxygène sur la flore ruminale.....	97
III. 2. Effet de la levure probiotique sur le E_h ruminal lors d'un apport d' O_2	98
IV. Conclusions.....	99

4^{ème} PARTIE : MODÈLE “VACHE EN LACTATION”

Chapitre 1 : Effet de deux niveaux d'apport de la levure <i>S. cerevisiae</i> Sc 47 chez la vache en production	100
I. Déroulement de l'essai.....	102
I. 1. Animaux	102
I. 2. Régimes.....	102
I. 3. Plan expérimental et analyse statistique.....	102
II. Résultats.....	103
II. 1. Effet sur le pH ruminal.....	103
II. 2. Effet sur le E_h ruminal.....	104
II. 3. Effet sur la pression partielle en oxygène du rumen.....	105
II. 4. Effet sur les concentrations ruminales en AGV.....	106
II. 5. Les teneurs ruminales en lactate.....	107
II. 6. La concentration ruminale en ammoniac	108
III. Discussion.....	108
III. 1. L'évolution des paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen.	109
III. 2. Effet de la levure probiotique sur les paramètres ruminiaux.....	111
III. 3. La transformation du lactate en propionate : une hypothèse qui intègre la thermodynamique.....	114
III. 4. Effet de deux niveaux d'apport de la levure probiotique sur les paramètres physico-chimiques ruminiaux.....	116
IV. Conclusions.....	116
Chapitre 2 : Comparaison entre 3 souches de levures probiotiques chez la vache en lactation	118
I. Déroulement de l'essai.....	119
I. 1. Animaux et régimes.....	119
I. 2. Plan expérimental et analyse statistique.....	119
II. Résultats.....	120
II. 1. Effet sur le pH ruminal.....	120
II. 2. Effet sur le E_h ruminal.....	121
II. 3. Effet sur la pression partielle en oxygène du rumen.....	122
II. 4. Effet sur les concentrations ruminales en AGV.....	123

II. 5. Les teneurs ruminales en lactate.....	124
II. 6. La concentration ruminale en ammoniac	124
III. Discussion.....	125
IV. Conclusions.....	128
Chapitre 3 : Effets d'un apport de levure et de substance tampon chez la vache en production	129
I. Déroulement de l'essai.....	131
I. 1. Animaux.....	131
I. 2. Régimes.....	131
I. 3. Plan expérimental.....	133
I. 3. 1. Les mesures des paramètres physico-chimiques et fermentaires.....	133
I. 3. 2. La digestibilité apparente de la ration.....	133
I. 4. Les techniques analytiques.....	134
I. 4. 1. Matière sèche (MS).....	134
I. 4. 2. Matière organique (MO) et minérale.....	134
I. 4. 3. Constituants pariétaux.....	134
I. 5. Analyse statistiques.....	134
II. Résultats.....	135
II. 1. Effet sur le pH ruminal.....	135
II. 2. Effet sur le E_h ruminal.....	136
II. 3. Effet sur la pression partielle en oxygène du rumen.....	137
II. 4. Effet sur les concentrations ruminales en AGV et lactate.....	138
II. 5. La concentration ruminale en ammoniac	139
II. 6. La digestibilité apparente de la ration.....	139
III. Discussion.....	140
III. 1. L'effet du bicarbonate de sodium (BS) sur les paramètres physico-chimiques et fermentaires du rumen et son mode d'action.....	140
III. 2. Comparaison entre la levure probiotique et le bicarbonate de sodium.....	141
IV. Conclusions.....	143
DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	145
REFERENCES.....	157
ANNEXES.....	176
<i>Abréviations.....</i>	<i>183</i>
<i>Liste des Figures & Tableaux.....</i>	<i>184</i>
<i>Résumé & Abstract.....</i>	<i>188</i>