



HAL
open science

Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen : effet du régime alimentaire

Sophie Sadet

► To cite this version:

Sophie Sadet. Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen : effet du régime alimentaire. Ingénierie des aliments. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT: . tel-00728351v2

HAL Id: tel-00728351

<https://theses.hal.science/tel-00728351v2>

Submitted on 5 Sep 2012

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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

N° D.U. : 1825

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

N° d'ordre : 477

THESE

Présentée à l'université Blaise Pascal pour obtenir l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Nutrition et Sciences des Aliments)

soutenue le

15 février 2008

Par

Sophie SADET

**Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen:
effet du régime alimentaire**

Mme.	Corine BAYOURTHE	Rapporteur
M.	Patrick DABERT	Rapporteur
M.	Gérard FONTY	Examineur
Mme.	Evelyne FORANO	Examineur
Mme.	Véronique JULLIAND	Examineur
M.	Diego MORGAVI	Directeur de thèse
Mme.	Cécile MARTIN	Directrice de thèse

**Unité de Recherche sur les Herbivores
Centre de Recherche INRA de Clermont-Ferrand-Theix**

*« Dans une thèse, en toutes circonstances, il faut garder la calme... »
Un grand philosophe mexicain qui m'a appris bien plus qu'il ne croit...*

*A la famille,
Aux grands-parents,
Aux nains,
A papa, maman,
Et surtout, à Franck...*

Remerciements

Aux membres du jury

A Madame Corine BAYOURTHE, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Toulouse.

Vous avez gentiment accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

A Monsieur Patrick DABERT, Chargé de recherche à l'Institut de recherche pour l'ingénierie de l'agriculture et de l'environnement de Rennes.

Vous avez accepté, sans hésitation, d'être rapporteur de cette thèse. Merci de votre disponibilité.

A Monsieur Gérard FONTY, Professeur à l'université Blaise Pascal.

Merci d'avoir accepté, sans hésitation également, de faire partie de ce jury de thèse. Je vous en suis reconnaissante.

A Madame Evelyne FORANO, Directeur de recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique de Clermont-ferrand, Theix.

Vous avez suivi cette thèse pendant trois ans. Merci pour les encouragements et les discussions scientifiques qui ont permis de valoriser ce travail. Merci également d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

A Madame Véronique JULLIAND, Maître de conférences à l'Ecole Nationale d'Enseignement Supérieur Agronomique de Dijon.

Je vous remercie pour tous les conseils que vous avez pu me donner au cours de ces trois années de thèse. Nos discussions ont permis l'aboutissement de ce travail. Merci également pour la participation à ce jury.

A Monsieur Diego MORGAVI, Directeur de recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique de Clermont-ferrand, Theix ; et à **Madame Cécile MARTIN**, Chargée de recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique de Clermont-ferrand, Theix.

Merci pour tout... L'encadrement, la gentillesse, l'humour, l'humanité... Vous êtes géniaux, ne changez rien !!

Remerciements

Je crois que je me souviendrai toujours de la première fois où je suis venue à Clermont... Je ne compte évidemment pas le jour où je suis venue pour l'entretien. C'était en novembre, il faisait froid et la place de JAUDE était complètement explosée par les travaux du tram... J'avoue, j'ai pleuré... Ma réaction me paraît complètement débile aujourd'hui... Mes trois années à Clermont ont été mémorables, et je vais, dans ces lignes, essayer de remercier tous ceux qui y ont contribué, en tentant, bien sûr de n'oublier personne, et si c'est le cas je le ferai de vive voix auprès des intéressés.

J'aimerais tout d'abord remercier Cécile et Diego. Sachez que j'ai adoré travailler avec vous. Vous avez été des encadrants géniaux ! Vous avez su me laisser le droit à l'erreur (et j'en ai fait des boulettes...), m'enseigner vos connaissances, bref m'apprendre le travail de chercheur avec une gentillesse et une humanité sans borne. Mon seul regret sera de ne pas avoir mis Diego sur des skis, mais qui sait, un jour... Merci à vous deux, ne changez rien ! Un gros merci à Michel qui m'a fait découvrir les joies des vendanges et ouvert les portes de sa maison. Pour en avoir parlé plusieurs fois avec toi, tu sais ce que je pense de toi (que du bien), les autres n'ont pas besoin de savoir... A Michel j'associe également Isabelle, mais bien évidemment ma Cilou et mon Vincent. Merci pour les moments de détente, les fous rires et tout ce qui va avec une amitié sincère. Vous allez me manquer...

A DIMA, on peut dire que l'ambiance est bonne ! Et chaque personne de l'équipe y contribue un peu à sa manière. Merci donc à Pierre et Didier pour leurs blagues pourries (-12000, -30000...). Merci aussi à Lucette qui m'a aidée à compter les points. Merci à Yvanne pour son humour et son rire communicatif ! C'est tellement agréable de travailler avec une personne qui a toujours la patate. Merci aussi à Béatrice, Sylvain, Sophie et Fabien pour les pique-niques et barbecues, et plein d'autres choses qui n'ont rien à voir avec la thèse... Merci à Fred, pour m'avoir appris avec des petits dessins, que je garde précieusement, les bases des stats et de SAS. Merci aussi pour ta gentillesse et tous les conseils que tu as pu me donner au cours de cette thèse. Merci à Bruno et ces proverbes ! Merci de m'avoir appris à travailler sans a priori... Merci aussi pour ton humour et ton amitié. Merci à Pierre pour les vanes, les « chut tais-toi ! », bref l'humour qui le caractérise si bien. Merci aussi à Peggy que j'aurai aimé plus connaître, mais qui sait... Merci à Benoît. J'ai passé de supers moments en ta compagnie. Je garde de super souvenirs de nos fous rires... Rien que de penser aux « zespers », je rigole toute seule... Merci à Muriel, pour les conseils scientifiques mais aussi l'humour dont tu fais preuve. T'es toujours en train de te marrer ! J'aurai aimé plus bosser

avec toi ! Merci à Mathieu, dernier né de DIMA, pour le temps que tu as consacré à ma thèse, tes conseils sur Grenoble et surtout ta grande gentillesse... Merci à Isabelle, notamment pour m'avoir aidé à faire mes prélèvements. J'espère que tu en garderas un aussi bon souvenir que moi. Merci à Eveline, pour nos discussions du midi. Merci à Dominique, Bernadette, Hamid, David et Jean-Pierre Jouany pour les conseils techniques, les discussions scientifiques et non scientifiques. Merci, enfin, aux autres personnes de l'équipe que je ne cite pas forcément mais qui m'ont tout autant aidé au cours de cette thèse. Merci aussi à Nicole, Odile, Maryse et Marie Jo pour leur aide administrative. Merci à la Microbio (Pascale, Evelyne, Christelle...), et aux équipes C2M et TALL qui n'ont pas été avares de conseils et qui m'ont bien aidé pendant ces trois années. Merci à Donato pour les cours d'espagnol ! Merci aussi à Daniel, Michel, Philippe, et toutes les autres personnes qui ont pris soin de mes moutons ! C'était vraiment sympa de faire les prélèvements avec vous, dans une cote XXL, avec des bottes taille 44 et des gants violets. Pauvres moutons ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble.

J'aimerais également remercier l'Amérique latine (Francisco, Brenda, les filles, et bien sûr Bruno). Merci pour les soirées latino, la bonne humeur dans le labo et votre amitié tout simplement... Merci aussi à ma petite Christelle, pour nos discussions du soir et nos restos du samedi midi ! T'en fait pas ça va aller, et si t'as le bourdon, tu sais que la maison te sera toujours ouverte ! Merci aussi à Vincent et Aurélie pour les réponses aux questions de thésards et les mots justes que seules deux personnes dans la même galère peuvent se dire... Merci également aux autres thésards (non DIMA), Lucile, Thibault, Laurence, Romain, Sophie, Rémi... acteurs, entre autres, de ma vie en dehors du labo. Merci également à Clémence, Gaby, Andry et David, pour tous les moments où on n'a pas parlé de thèse et où on a juste raconté nos vies, pris du bon temps, bu l'apéro, regardé des films... Merci pour votre amitié. Merci aussi à Claire pour les « mais si tu vas y arriver ! », les « Non c'est pas vrai !!! » et les « si j'te jure ! »... Bref, merci pour nos discussions de filles qui m'ont tellement fait de bien. Merci d'être là quoi qu'il arrive, merci pour tout ! A ces remerciements j'associe Manu, bien sûr, et Aude et Julie, évidemment ! Pour finir avec les amis, je voudrais remercier ma jumelle maléfique, mon côté obscure et sombre, ma Virginou ! Merci pour tous les délires qu'on a pu avoir, merci d'être là dans les bons comme dans les mauvais moments... Je n'en écrirai pas plus sur toi, tu sais ce que tu représentes pour moi... On est issu du même œuf, c'est pas rien quand même !

Mes avants derniers remerciements iront à la famille, pour ce qu'elle est et ce qu'elle représente. Merci aux grands-parents pour l'histoire des petits cochons (je me comprends...)

et à mes nains de jardin pour les rires et la détente. Un gros merci aussi à mes parents pour leur amour, leurs encouragements et leur philosophie de vie... Vous m'avez appris à tirer le meilleur de tout, même du pire... et qu'une journée sans rire est une journée perdue... Merci pour tout !!

Enfin, mes derniers remerciements iront à mon gaucher. Merci de m'aider, de façon si gauchisante, à rayer ma liste des choses à faire dans ma vie... J'espère en retour t'aider à rayer la tienne... Merci d'être là, tout simplement.

Publications et communications

Articles dans périodiques à comité de lecture

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier, D.P. Morgavi, 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. **Animal**, **1**, 939-944.

S. Sadet, C. Martin, D.P. Morgavi, 2007. Abundance of *Proteobacteria* and of opportunistic pathogens in the bacterial community associated to the rumen epithelium. **FEMS microbiology letters** (Soumis).

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier, D.P. Morgavi, 2007. Temporal stability and effect of diet changes on bacterial communities and rumen physico-chemical parameters in the rumen of sheep. **British Journal of Nutrition** (En préparation).

S. Sadet, D.P. Morgavi, C. Duc, D. M. Doreau, D. Micol, and C. Martin. Diversity and structure of rumen bacterial communities in bulls fed high-concentrate diets. **British Journal of Nutrition** (En préparation).

Communications courtes dans congrès et symposiums (voir Annexes)

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier, D.P. Morgavi. Influence du régime et du lieu de prélèvement sur la diversité des bactéries attachées à l'épithélium ruminal de l'agneau. **3^{ème} rencontre des microbiologistes du pôle clermontois**, Mars 2006, Clermont-Ferrand (Communication orale).

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier, D.P. Morgavi. Influence of diet and sampling site on the diversity of the bacterial community attached to the rumen epithelium in lambs. **5th joint INRA-RRI gastrointestinal Tract Microbiology Symposium**, Jun 2006, Aberdeen. **Reproduction Nutrition Development**, 46: S29, Suppl. 1 (Poster).

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier, D.P. Morgavi. Temporal stability and effect of preceding diet on the rumen bacterial population structure in sheep. **Conference on GastroIntestinal Function**, Avril 2007, Chicago (Poster).

S. Sadet, C. Martin, D.P. Morgavi. Réponse des bactéries du rumen à un changement de régime. **Journées PHASE**, Octobre 2007, Tours (Communication orale).

Abréviations

ADF	Acid Detergent Fiber
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	Acide DésoxyriboNucléique ribosomal
AGV	Acides Gras Volatils
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis
ARISA	Automated Ribosomal Intergenic spacer Analysis
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BW	Body Weight
C₂	Acétate
C₃	Propionate
C₄	Butyrate
C₅	Valérate
C₆	Caproate
CH₄	Méthane
CO₂	Dioxyde de carbone
CP	Crude Protein
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DM	Dry Matter
EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétate
FISH	Fluorescent In Situ Hybridisation
h	Heure
H₂	Dihydrogène
HCO₃⁻	Bicarbonates
HGCGPB	High G+C Gram Positive Bacteria
IsoAGV	Iso Acides Gras Volatils
IsoC₄	Isobutyrate
IsoC₅	Isovalérate
ITS	Internal spacer
J	Jour
NDF	Neutral Detergent Fiber
NH₃	Ammoniac

OM	Organic Matter
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Retro Transcription PCR
SARST	Serial Analysis of Ribosomal Sequencing Tags
SE ou SEM	Standard Error of the Mean
SIP	Stable-Isotope Probing
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TGGE	Temperature Gradient Gel Electrophoresis
T-RFLP	Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages
UTO	Unité Taxonomique Opérationnelle
VFA	Volatile Fatty Acid

Définitions

Communauté : Ensemble d'organismes appartenant à des populations d'espèces différentes constituant un réseau de relations.

Espèce : Rang taxonomique. Par l'hybridation ADN – ADN, il est possible de comparer la totalité du génome bactérien et d'estimer le degré d'homologie entre deux bactéries. Cette caractéristique est importante dans la définition d'une espèce bactérienne. Lorsque l'homologie, entre deux génomes, est >70%, on dit alors que deux bactéries étudiées appartiennent à la même espèce. Le gène codant l'ADNr 16S peut également être utilisé pour la définition d'une espèce bactérienne. Dans ce cas, pour que deux bactéries appartiennent à la même espèce, il faut que le pourcentage de similarité entre les séquences soit >97%.

Genre : Rang taxonomique.

Unité Taxonomique Opérationnelle (UTO) : En bactériologie, ce terme réfère à une souche donnée.

Phylotype : Ensemble de séquences suffisamment similaires entre elles pour être considérées comme appartenant à un même taxon.

Phylum : Rang taxonomique.

Population : Ensemble d'individus d'une même espèce vivante se perpétuant dans un territoire donné.

Taxinomie : Science qui a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons (familles, genres, espèces, etc...) afin de pouvoir les nommer et les classer.

Taxon : Entité conceptuelle qui est censée regrouper tous les organismes vivants possédant en commun certains caractères taxinomiques ou diagnostiques bien définis. L'espèce constitue le taxon de base de la classification systématique. Plus le rang du taxon est élevé et plus le degré de ressemblance (le nombre de caractères qu'ils ont en commun) entre les individus concernés (plantes, animaux, champignons, bactéries) diminue, et inversement.

Listes des figures et tableaux

Synthèse bibliographique

Figure 1	Vues latérales gauche et droite du rumen	26 p
Figure 2	Répartition, au sein du rumen, des différentes phases constituant le contenu ruminal	26 p
Figure 3	Classification des différents domaines, phyla, famille, genres et espèces des principaux microorganismes du rumen	28 p
Figure 4	Métabolisme des glucides et des protéines dans le rumen	29 p
Figure 5	Représentation schématique des différents prélèvements effectués par McCowan <i>et al.</i> , (1980) au niveau de la paroi du rumen	44 p
Figure 6	Schéma de l'ADN ribosomal (ADNr) chez les procaryotes	49 p
Figure 7	Principe de la Terminal-Restriction Length Polymorphism (T-RFLP)	51 p
Figure 8	Principe de la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	52 p
Figure 9	Principe de la Serial Analysis of Ribosomal Sequencing Tags (SARST)	53 p
Figure 10	Principe du pyroséquençage	54 p
Figure 11	Principe de la Stable-Isotope Probing (SIP)	54 p
Figure 12	Principe de la Fluorescent in situ hybridisation (FISH)	55 p
Figure 13	Principe des puces à ADN de détection	56 p
Tableau 1	Récapitulatif des différents phyla composant les communautés bactériennes des phases liquide (PL) et solide (PS) du contenu ruminal, et de la communauté épimurale	31 p

Conclusions bibliographiques et objectifs

Tableau 1	Récapitulatif des différentes expérimentations réalisées	60 p
------------------	--	------

Etudes expérimentales

Chapitre 1, publication 1 :

PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium

Figure 1	UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles. Samples are from the rumen epithelium ventral and dorsal sacs (VS and DS1) and the rumen liquid and solid phases, taken from eight lambs that received a forage (F) or a high concentrate (HC) diet	70 p
Figure 2	Typical DGGE profiles of the bacterial community attached to the rumen epithelium (ventral and dorsal sacs, VS and DS, respectively) and associated to the rumen liquid (LP) and solid phases (SP). Samples taken as example are from animals F and D fed a forage (F) and a high concentrate (HC) based diet, respectively	71 p
Tableau 1	Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid- and solid-associated bacterial communities	69p
Tableau 2	Results of permutation test comparing bacterial DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid-, and solid-associated bacterial communities	72 p

Chapitre 1, publication 2 :

Diversity and structure of rumen bacterial communities in bulls fed high-concentrate diets

Figure 1	UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles	78 p
Figure 2	UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles	79 p
Tableau 1	Chemical composition of experimental feeds and diets (% DM)	75 p
Tableau 2	Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid and solid phase communities	77 p

Tableau 3	Results of permutation test comparing bacterial DGGE fingerprints of rumen epimural, liquid phase and solid phase from bulls fed three different concentrate diets	80 p
Tableau 4	Ruminal protozoal numbers in bulls fed three different concentrate diets	80 p
Tableau 5	Ruminal pH and fermentative parameters from bulls fed three different concentrate diets	81 p

Chapitre 2, publication 3 :

Temporal stability and effect of diet changes on bacterial communities and rumen physico-chemical parameters in the rumen of sheep

Figure 1	UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles.	89 p
Figure 2	Factor maps (F1XF2) of the coinertia analysis on environmental variables (A, B) and bacteria species (C, D) for rumen liquid phase localisation of the variable diet group	92 p
Figure 3	Factor maps (F1XF2) of the coinertia analysis on environmental variables (A, B) and bacteria species (C, D) for rumen solid phase localisation of the variable diet group	93 p
Tableau 1	Chemical composition of experimental diets (%DM)	84 p
Tableau 2	Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid- and solid-associated bacterial communities from constant diet group (n=4)	88 p
Tableau 3	Count of protozoa in constant diet group (n=4)	88 p
Tableau 4	Ruminal VFA composition, lactate and ammonia concentration in constant diet group (n=4)	88 p
Tableau 5	Ruminal pH parameters in constant diet group (n=4)	89 p
Tableau 6	<i>In sacco</i> DM degradation of alfalfa hay in constant diet group (n=4)	89 p

Tableau 7	Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid- and solid-associated bacterial communities from variable diet group (n=4)	90 p
Tableau 8	Count of protozoa in variable diet group (n=4)	90 p
Tableau 9	Ruminal VFA composition, lactate and ammonia concentration in variable diet group (n=4)	90 p
Tableau 10	Ruminal pH parameters in variable diet group (n=4)	91 p
Tableau 11	<i>In sacco</i> DM degradation of alfalfa hay in variable diet group (n=4)	91 p

Chapitre 3 :

Effet des protozoaires sur la communauté bactérienne attachée à la paroi du rumen et celles du contenu ruminal chez le mouton

Figure 1	Schéma expérimental de l'expérimentation 4	95 p
Figure 2	Traitement des échantillons de contenu ruminal en vue des analyses microbiologiques et biochimiques (expérimentation 4)	96 p
Figure 3	Dendrogramme réalisé par la méthode des UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages)	100 p
Figure 4	Dendrogramme réalisé par la méthode des UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages)	101 p
Tableau 1	Indices de biodiversité obtenus pour la communauté bactérienne attachées à la paroi du rumen, et celles des phases liquide et solide du contenu ruminal	99 p
Tableau 2	Effet des protozoaires sur la concentration des acides gras volatils dans le rumen	100 p

Chapitre 4, publication 4 :

Abundance of *Proteobacteria* and of opportunistic pathogens in the bacterial community associated to the rumen epithelium

Figure 1 Relative proportion of phyla found in the bacterial community attached to the rumen epithelium of a wether fed forage (H1 and H2) and a concentrate (C; 65:35, wheat:forage) diet 107 p

Tableau 1 Characterization of 16S rDNA gene clones from bacteria attached to the rumen epithelium of a wether fed forage (H1 and H2) and a concentrate (C; 65:35, wheat:forage) diet 106 p

Chapitre 5 :

Mise en évidence de bactéries oxydant l'ammoniac et/ou le méthane au sein de la communauté épimurale

Figure 1 Recyclage de l'urée et possible oxydation de l'ammoniac au niveau de l'épithélium ruminal 111 p

Figure 2 Dendrogramme réalisé selon la méthode des UPGMA (Unweigthed pair-group method using arithmetic averages), à partir des profils bactériens obtenus en Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) grâce à des amorces PCR ciblant les bactéries oxydant l'ammoniac ou le méthane 113 p

Discussion

Figure 1 Représentation schématique du rumen et des principaux sacs le composant 117 p

Figure 2 Valeur moyenne des trois indices de biodiversité, tous régimes confondus, pour les trois communautés bactériennes ruminales 118 p

Figure 3 Différence de structure entre la communauté épimurale et celle du contenu ruminal en fonction de la composition de la ration et de son 120 p

temps de distribution

Figure 4	Comparaison des différents phyla présents au sein de la communauté épimurale entre deux études : l'une réalisée sur bovin nourri avec un régime composé de 75% de fourrage et de 25% de céréale (Cho <i>et al.</i> , 2006) et l'autre réalisée sur ovin nourri avec un régime composé de 35% de fourrage et de 65% de céréale (Sadet <i>et al.</i> , soumis)	121 p
Figure 5	Dendrogrammes réalisés par la méthode des UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages) à partir des profils générés en DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	122 p
Figure 6	Comparaison, via l'utilisation de banques de clones, de la composition de la communauté épimurale aux différentes périodes de prélèvements pour l'expérimentation 3	123 p
Figure 7	Différence de structure entre les communautés bactériennes des phases liquide et solide du contenu ruminal en fonction de la composition de la ration	124 p
Tableau 1	Récapitulatif des différentes expérimentations réalisées	119 p
Tableau 2	Effet du régime alimentaire sur la structure des trois communautés bactériennes du rumen	122 p

Table des matières

Introduction générale	21
Synthèse bibliographique	25
1. Généralités sur le rumen	26
1.1 Physiologie	26
1.2 Les microorganismes	26
1.2.1 Les champignons	27
1.2.2 Les protozoaires	27
1.2.3 Les bactériophages	29
1.2.4 Les bactéries	29
1.3 Le métabolisme des microorganismes du rumen	29
2. La diversité des bactéries du rumen	31
2.1 La diversité des bactéries du contenu ruminal	31
2.1.1 Les bactéries de la phase solide	31
2.1.2 Les bactéries de la phase liquide	33
2.2 La diversité des bactéries attachées à la paroi du rumen	35
3. Les facteurs de variation de la diversité bactérienne ruminale	37
3.1 L'espèce hôte	37
3.1.1 Les bactéries du contenu ruminal	37
3.1.2 Les bactéries attachées à la paroi du rumen	38
3.2 L'individu	39
3.3 L'âge	40
3.3.1 Colonisation du contenu ruminal par les bactéries	40
3.3.2 Colonisation de la paroi ruminale par les bactéries	41
3.4 L'alimentation	42
3.4.1 Le niveau d'ingestion	42
3.4.2 Le régime alimentaire	42
3.4.2.1 Les bactéries du contenu ruminal	42
3.4.2.2 Les bactéries attachées à la paroi du rumen	44
3.5 Les protozoaires	45
3.6 Autre facteur influençant la diversité bactérienne du rumen : la température	46
4. Les techniques d'étude de la diversité d'une communauté microbienne	48
	18

4.1 Le choix du gène	48
4.2 Les biais dus à l'extraction et à la PCR	49
4.3 Les techniques de fingerprint	50
4.4 Les banques de clones	52
4.5 Les pyroséquenceurs	53
4.6 Les isotopes stables	54
4.7 L'hybridation	55
Conclusions bibliographiques et objectifs	57
Etudes expérimentales	61
PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium	63
Diversity and structure of rumen bacterial communities in bulls fed high-concentrate diets	73
Temporal stability and effect of diet changes on bacterial communities and rumen physico-chemical parameters in the rumen of sheep	82
Effet des protozoaires sur la communauté bactérienne attachée à la paroi du rumen et celles du contenu ruminal chez le mouton	93
Abundance of <i>Proteobacteria</i> and of opportunistic pathogens in the bacterial community associated to the rumen epithelium	102
Mise en évidence de bactéries oxydant l'ammoniac et/ou le méthane au sein de la communauté épimurale	109
Discussion générale	114
1. La diversité de la communauté épimurale	115
1.1 La diversité de la communauté épimurale est-elle la même quel que soit le site de prélèvement épithélial ?	115
1.2 La diversité de la communauté épimurale est-elle différente de celle du contenu ruminal ?	117
1.3 La communauté épimurale aurait-elle d'autres rôles que ceux qui lui sont classiquement attribués ?	119
1.4 Effet du régime alimentaire sur la communauté épimurale	120
2. La diversité des communautés bactériennes du contenu ruminal	122

2.1 La diversité de la communauté bactérienne de la phase liquide est-elle différente de celle de la phase solide?	122
2.2 Effet du régime alimentaire sur les communautés bactériennes des phases liquide et solide	123
Conclusions et perspectives	125
Annexes	128
Références bibliographiques	136

Introduction générale

Importance de la biodiversité dans un écosystème

La diversité biologique, ou biodiversité, est la diversité de toutes les formes du vivant. Elle est habituellement subdivisée en trois niveaux :

- la diversité génétique qui correspond à la diversité des gènes au sein d'une espèce.
- la diversité spécifique qui correspond à la diversité des espèces.
- la diversité écosystémique qui correspond à la diversité des écosystèmes présents sur terre, des interactions entre populations naturelles et de leurs environnements physiques.

Dans ce manuscrit le terme de **biodiversité** sera essentiellement utilisé pour parler de **diversité spécifique**.

Selon un postulat plus ou moins intuitif, les écosystèmes seraient d'autant plus « stables » qu'ils seraient diversifiés. Le présupposé de cette hypothèse, basé sur l'existence d'espèces redondantes, est simple : si le nombre de liaisons augmente dans un écosystème, la suppression d'une liaison sera rapidement compensée par la mise en place d'une autre. Quelques résultats récents viennent étayer cette hypothèse. En effet, il a été mis en évidence qu'une plus grande richesse spécifique pouvait avoir comme conséquence une augmentation de la rétention de nutriments dans l'écosystème (Lévêque & Mounolou, 2001). En outre, les modélisateurs ont également pu montrer que la complexité tend à stabiliser les écosystèmes en amortissant les fluctuations temporelles des populations. C'est une sorte d'effet tampon. Enfin, il a été observé, sur le long terme, qu'une certaine permanence des écosystèmes conduisait à une diversification biologique. Un bon exemple est celui des grands lacs d'Afrique de l'Est (Lacs Malawi, Tanganyika et Victoria). Des communautés de poissons et d'invertébrés très spécialisés sur le plan écologique ont pu se mettre en place au cours des quelques millions d'années d'existence de ces lacs qui renferment une grande diversité d'espèces endémiques. Inversement dans les milieux lacustres d'origine récente, comme ceux d'Europe du Nord ou d'Amérique du Nord, qui sont apparus seulement après le retrait des calottes glacières il y a environ 15000 ans, les communautés sont peu diversifiées et constituées pour l'essentiel d'espèces à vaste répartition géographique (Lévêque & Mounolou, 2001).

La complexité d'un écosystème, ou encore sa diversité, est donc importante à maintenir pour garantir l'intégrité et la stabilité des systèmes naturels, comme dans notre cas, celui du tractus digestif.

Quelles peuvent être les conséquences d'une modification de la biodiversité bactérienne au niveau de l'épithélium ruminal ?

Le rumen est un écosystème microbien très diversifié. Il est composé de bactéries (10^{10} - 10^{11} cellules/ml ou 50% de la biomasse microbienne, comprenant environ 350 espèces (Yu *et al.*, 2006), d'Archeae ($10^7 - 10^9$ cellules / ml), de protozoaires (10^5 - 10^6 /ml ou 40% de la biomasse microbienne, repartis en 25 genres), de champignons, beaucoup moins nombreux (10^4 /ml ou 8% de la biomasse microbienne, divisés en 6 genres) et de bactériophages (10^7 - 10^9 particules/ml) (Mackie *et al.*, 2000). Parmi ces micro-organismes, la communauté bactérienne est la plus complexe, la plus dense et la plus active. Elle occupe trois niches écologiques distinctes : l'épithélium ruminal et le contenu ruminal comprenant le milieu liquide (phase liquide), dans lequel les bactéries sont libres ; et les particules alimentaires (phase solide) auxquelles les bactéries adhèrent (Cheng & Costerton, 1986). Les bactéries du contenu ruminal jouent un rôle primordial dans la dégradation des aliments et la fourniture de nutriments à l'animal. Il est connu qu'une diminution de la diversité de ces communautés occasionnée par une alimentation riche en céréales peut entraîner des troubles digestifs chez les ruminants tels que l'acidose ruminale (Martin *et al.*, 2007). Les bactéries attachées à la paroi du rumen, également appelées communauté épimurale, favoriseraient, elles, le recyclage de l'urée (Cheng *et al.*, 1979; Cheng & Wallace, 1979; Wallace *et al.*, 1979), le maintien de l'intégrité de l'épithélium ruminal et de sa capacité d'absorption (Wallace *et al.*, 1979; Dinsdale *et al.*, 1980), et les conditions d'anaérobiose au sein du rumen (Cheng *et al.*, 1979; Cheng & Wallace, 1979; Wallace *et al.*, 1979). Comme nous l'avons vu précédemment, la diversité est importante pour maintenir l'ensemble des fonctions assumées par un écosystème. Comme pour le contenu ruminal, un changement de diversité de la communauté épimurale, pourrait conduire à une altération du fonctionnement optimal du rumen. Cependant, aujourd'hui aucune étude n'a encore été réalisée pour étayer cette hypothèse. L'importance de la diversité de la communauté épimurale et les conséquences d'une modification de cette dernière sont donc encore méconnues. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui a comme principal objectif l'étude de la communauté épimurale : sa diversité et ses facteurs de variation.

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à la synthèse des données bibliographiques sur la diversité des communautés bactériennes du rumen (paroi + contenu) et ses principaux facteurs de variations liés à l'animal, l'alimentation, et aux autres microorganismes du rumen. Nous nous intéresserons également aux principales techniques de biologie moléculaire qui, par rapport aux techniques culturales, permettent une étude plus large de la diversité d'une communauté en incluant les bactéries non cultivables.

La seconde partie portera sur la démarche adoptée dans le cadre de ce travail et les résultats obtenus avec une technique de biologie moléculaire (PCR-DGGE) dans les différentes études expérimentales réalisées. Enfin, une discussion des résultats les plus originaux, suivie des principales conclusions et perspectives de ce travail, sera réalisée.

Synthèse bibliographique

1. Généralités sur le rumen

1.1 Physiologie

Chez les carnivores et les omnivores, la digestion des aliments se fait via des enzymes sécrétées par la paroi du tube digestif de l'animal lui-même. Chez les herbivores, la digestion des parois végétales, composées de cellulose, d'hémicellulose et de pectine, ne peut se faire de cette façon, puisque généralement, les parois végétales sont résistantes aux enzymes de digestion animales. C'est donc au sein du rumen, dans un environnement anaérobie strict que la plupart des composants des aliments ligno-cellulosiques sont dégradés et fermentés par une microflore et une microfaune abondante et diversifiée.

Chez les ruminants, le rumen est la cavité la plus importante du tube digestif, en terme de taille (environ 100 et 10 litres chez un bovin ou un ovin adulte respectivement) (McDonald et al., 1995). Cet organe est situé à l'avant du tube digestif et est constitué de plusieurs sacs séparés les uns des autres par des plis que l'on appelle piliers (Figure 1). Les principaux sacs sont les sacs ventral, dorsal, caudo-dorsal et caudo-ventral. La muqueuse du rumen est rêche et plissée sur les piliers ; ailleurs elle est en partie couverte de papilles aplaties dont la distribution est le reflet de la stratification du digesta (Brownlee, 1956). Les papilles les plus hautes (1 cm) et les plus nombreuses sont au contact de la phase liquide, c'est à dire au niveau des sacs ventral, caudo-dorsal et caudo-ventral. Au niveau du sac dorsal, les papilles sont peu nombreuses.

Le rumen est un milieu anaérobie où la température est comprise entre 39-40°C et le pH oscille entre 6-7 dans des conditions de fermentations optimales. Le contenu ruminal est hétérogène. Il comprend trois phases : liquide, solide et gazeuse (Czerkawski, 1986b) (Figure 2). La phase gazeuse est majoritairement présente dans la partie haute du sac dorsal. Ce gaz est également présent sous forme de petites poches dans la phase solide du contenu ruminal et de façon dissoute dans la phase liquide. La phase liquide est présente dans la partie ventrale du rumen. La phase solide, elle, est comprise entre les deux phases citées précédemment.

1.2 Les microorganismes

Le rumen contient quatre types de microorganismes : les champignons, les protozoaires, les bactériophages et enfin les bactéries.

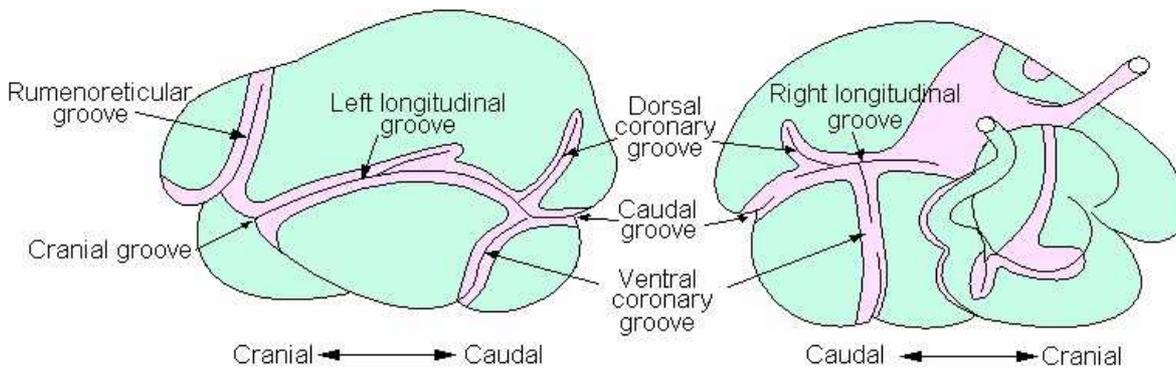
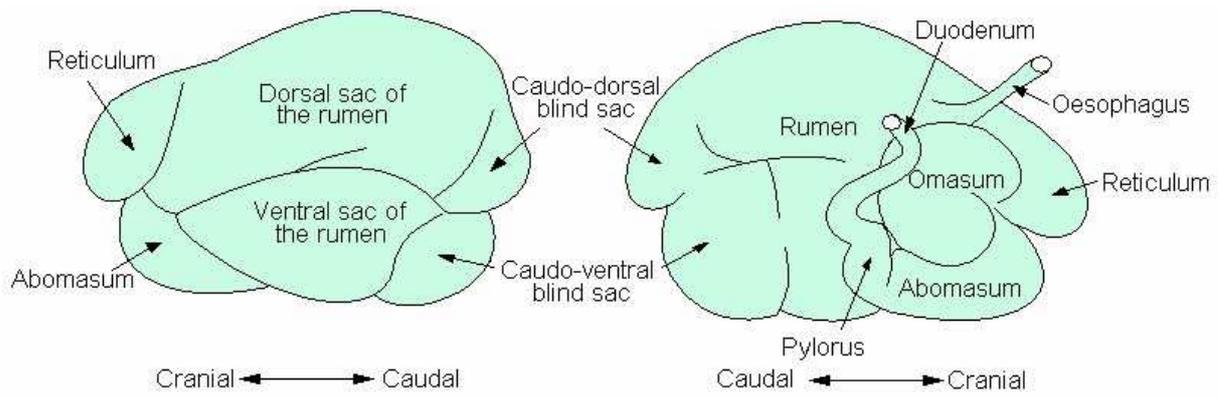


Figure 1. Vues latérales gauche et droite du rumen.

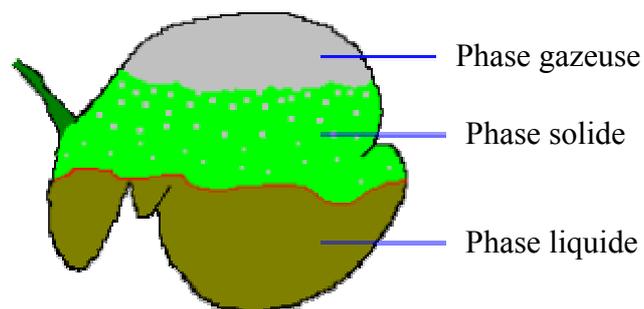


Figure 2. Répartition, au sein du rumen, des différentes phases constituant le contenu ruminal.

1.2.1 Les champignons

On compte 10^3 à 10^4 champignons par millilitre de contenu ruminal (McAllister & Cheng, 1996). Cependant, l'évaluation de la population fongique *in vivo* n'est pas évidente. En effet, le nombre de zoospores présentes dans le rumen ne peut être relié ni à un nombre de sporocystes, ni à une quantité de rhizoïdes. Ce nombre peut varier de 100 fois suivant le régime alimentaire ou le temps écoulé depuis le repas (Orpin, 1977; Grenet et al., 1989a; Grenet et al., 1989b). Le dosage de la chitine, constituant spécifique des parois fongiques est fiable pour des cultures pures, mais pas *in vivo*. L'extrapolation des données *in vitro* laisse penser que la biomasse fongique représenterait 8% de la biomasse microbienne totale du rumen (Orpin, 1981). Ces champignons sont microscopiques et anaérobies stricts. Ils produisent une large gamme de polysidases qui leur permettent de dépolymériser la cellulose et les hémicelluloses, et d'hydrolyser les oligosaccharides libérés; ils ne dégradent pas la pectine. Chez les champignons anaérobies du rumen, les produits terminaux générés par la fermentation des glucides sont identiques quelle que soit l'espèce. Il s'agit du formate, de l'acétate, du lactate, de l'éthanol, du CO₂ et de l'H₂ (Bauchop & Mountfort, 1981). *In vivo* la contribution des champignons à la dégradation des parois végétales ainsi qu'aux processus fermentaires est loin d'être connue, notamment du fait de la difficulté actuelle à évaluer de façon fiable la biomasse fongique. L'élimination de ces microorganismes du rumen diminue la digestibilité *in situ* de la matière sèche de la paille et contribue à augmenter la proportion d'acide propionique (Ford *et al.*, 1987). Chez des agneaux gnotobiotiques, ne contenant, au sein du rumen, que des champignons comme microorganismes cellulolytiques, il a été montré que la dégradation *in situ* de la cellulose de la paille de blé et du foin de ray-grass était respectivement de 25 et 36% (Fonty & Gouet, 1989). Certaines souches de champignons anaérobies sont capables de dégrader l'amidon, et possèdent une activité protéolytique (Wallace & Joblin, 1985; Wallace & Munro, 1986). *In vivo* la contribution de ces microorganismes à la dégradation des protéines alimentaires est vraisemblablement limitée (Bonnemoy *et al.*, 1993).

1.2.2 Les protozoaires

Les protozoaires du rumen sont des organismes eucaryotes unicellulaires microscopiques. Leur nombre est évalué à 10^5 - 10^6 cellules par millilitre de contenu ruminal (McAllister & Cheng, 1996). On différencie les protozoaires ciliés et flagellés. Au sein du rumen, les protozoaires ciliés représentent la quasi-totalité de la biomasse de la faune. Ils sont divisés en

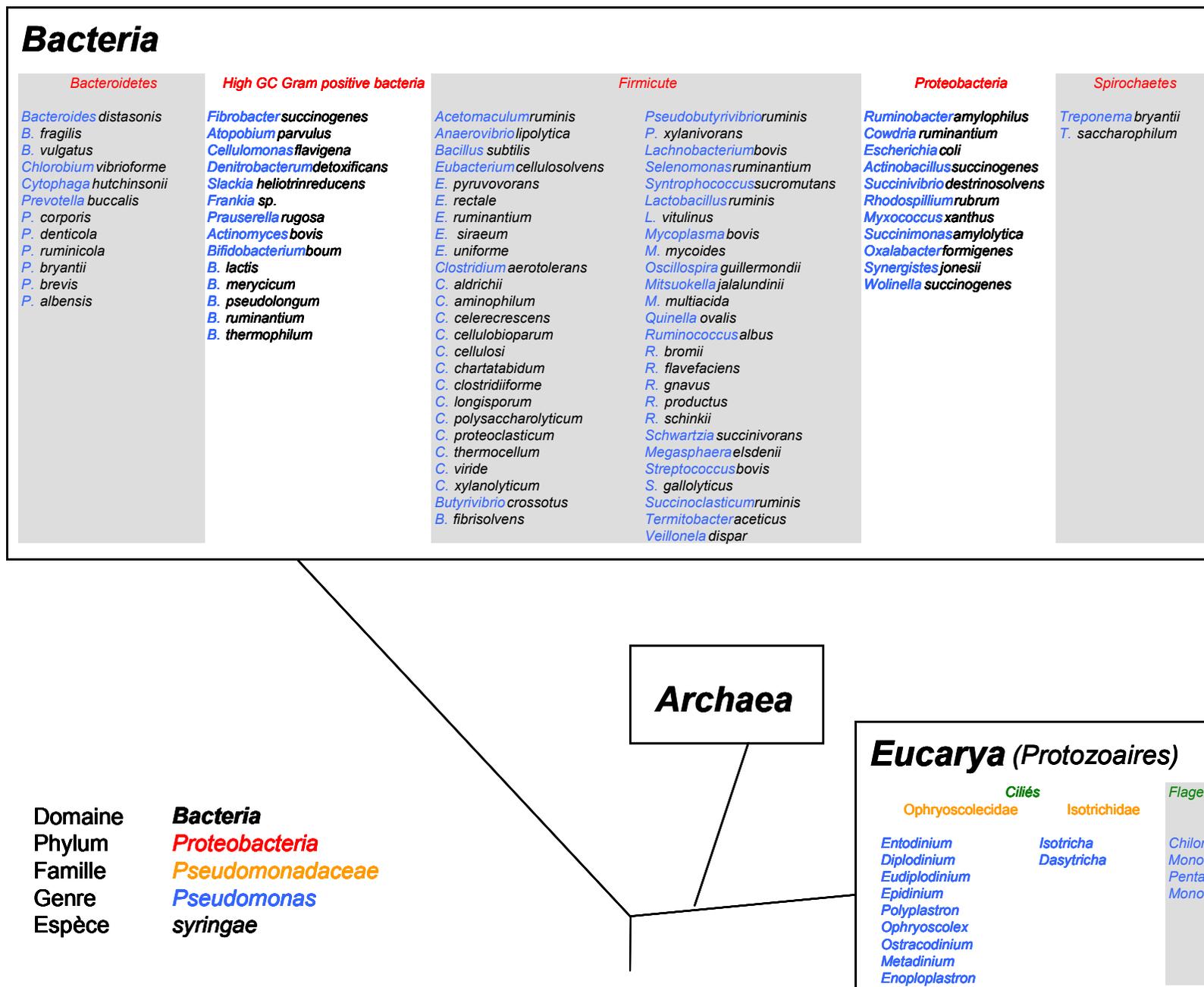


Figure 3. Classification des différents domaines, phyla, familles, genres et espèces des principaux microorganismes du rumen.

deux groupes selon leur morphologie, les Entodiniomorphes et les Holotriches. Parmi les Entodiniomorphes on compte, au sein du rumen, neuf genres appartenant à la famille des *Ophryoscolecidae*. Il s'agit des *Entodinium*, des *Diplodinium*, des *Eudiplodinium*, des *Ostracodinium*, des *Metadinium*, des *Enoploplastron*, des *Polyplastron*, des *Epidinium* et des *Ophryoscolex* (Figure 3). Les Holotriches, toujours au niveau du rumen, comptent deux genres appartenant à la famille des *Isotrichidae* : les *Isotricha* et les *Dasytricha* (Williams & Coleman, 1997; Karnati *et al.*, 2003) (Figure 3). Le genre *Entodinium* est prédominant (Karnati *et al.*, 2003). La communauté des protozoaires serait différente entre les phases liquide et solide du contenu ruminal (Shin *et al.*, 2004). En effet, le genre *Epidinium* serait absent de la phase solide. Ces résultats, basés sur la réalisation d'une banque de clones composée de 14 clones seulement, ne sont pas représentatifs de la diversité réelle des protozoaires existant au sein du rumen, et restent donc à confirmer. A ce jour, au niveau de l'épithélium ruminal, aucun protozoaire n'a encore été détecté (Shin *et al.*, 2004).

La plupart des glucides solubles sont utilisés par les *Isotrichidae* comme source de carbone et d'énergie (Williams 1989). Ils fermentent rapidement une partie des glucides et en stockent une autre partie. La plupart des protozoaires ingèrent et stockent les grains d'amidon qu'ils dégradent et fermentent lentement au cours de la journée. En ingérant et métabolisant lentement les glucides solubles et l'amidon qu'ils soustraient aux bactéries, ces microorganismes limitent donc le développement des bactéries impliquées dans le métabolisme de ces glucides. Les protozoaires sont également capables de métaboliser l'acide lactique (Newbold, 1985). De ce fait, ils réduisent les risques d'acidose et permettent au pH de se maintenir dans des valeurs physiologiques avec des rations riches en glucides fermentescibles. L'ensemble de ces propriétés fait que les ciliés favorisent la stimulation des bactéries cellulolytiques.

Notons que les protozoaires entodiniomorphes possèdent l'essentiel des enzymes impliquées dans la cellulolyse (Williams et Coleman 1997) Ils ingèrent les fibres qui sont ensuite placées au contact étroit des enzymes dans le sac digestif puis digérées dans les vacuoles digestives. Les protozoaires sont donc également capables de digérer les glucides pariétaux.

Les ciliés sont protéolytiques. Ils ingèrent les protéines alimentaires et les bactéries qui constituent leurs principales sources d'acides aminés. Les protéines sont hydrolysées à l'intérieur des cellules. Ces protozoaires sont capables d'utiliser les peptides, et à un degré moindre les acides aminés en les intégrant dans leurs propres protéines.

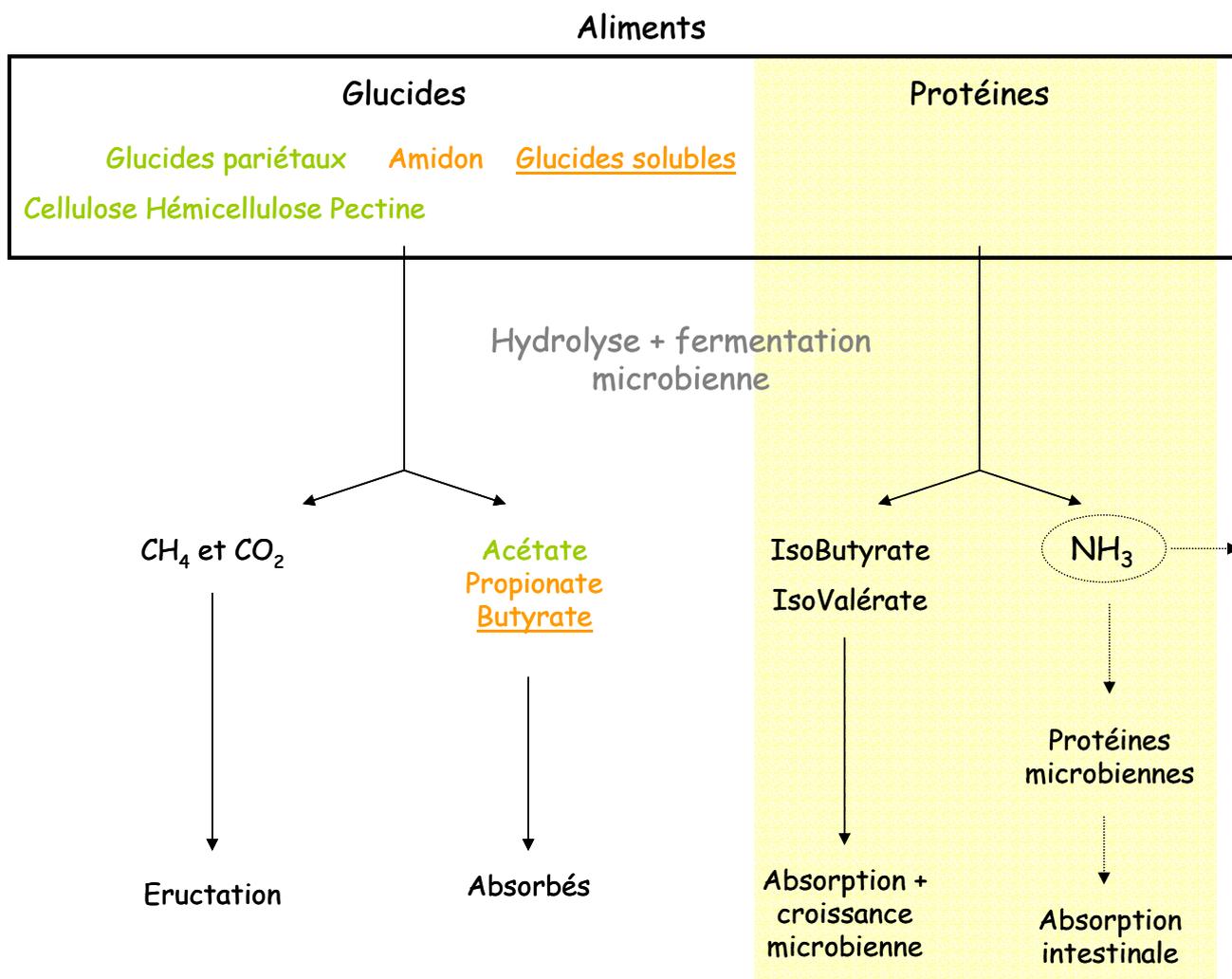


Figure 4. Métabolisme des glucides et des protéines dans le rumen.

1.2.3 Les bactériophages

La mise en évidence des bactériophages au sein du rumen a été réalisée depuis longtemps (Brailsford & Hartman, 1968; Tarakanov, 1971; Orpin & Munn, 1974). Cependant, jusqu'à présent, peu d'études ont été effectuées sur ces microorganismes. Vingt six types morphologiques différents ont été observés (Klieve & Bauchop, 1988). Leur concentration est estimée à 10^9 - 10^{10} phages par millilitre de contenu ruminal (Klieve & Swain, 1993).

Les bactériophages sont capables de lyser les bactéries, et notamment les bactéries cellulolytiques du rumen (Klieve *et al.*, 2004). De ce fait, cette lyse, peut altérer la dégradation des fibres, et donc, conduire à une diminution de l'efficacité de la dégradation des aliments.

1.2.4 Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus importants, en terme de nombre, au sein du rumen avec 10^{11} cellules par millilitre chez un animal adulte (McAllister & Cheng, 1996).

Comparé aux protozoaires, aux champignons et aux bactériophages, les bactéries ont un rôle primordial au sein du rumen. Leur présence est essentielle pour la dégradation des aliments ingérés par les ruminants et le maintien des conditions physico-chimiques optimales au fonctionnement du rumen.

Pour ces raisons, la bibliographie présentée ci après sera essentiellement basée sur les bactéries. Champignons et bactériophages ne seront pas évoqués. On parlera des protozoaires seulement dans le cadre de leur impact sur la diversité bactérienne.

1.3 Le métabolisme des microorganismes du rumen

Au sein du rumen, les aliments ingérés par l'animal sont colonisés, dégradés, puis fermentés par les microorganismes. La fermentation des glucides conduit à la production de gaz (méthane (CH_4), dioxyde de carbone (CO_2) et dihydrogène (H_2)), éliminés par éructation, et d'acides gras volatils (AGV : les principaux étant l'acétate (C2), le propionate (C3) et le butyrate (C4)) qui sont la principale source d'énergie du ruminant. La proportion d'AGV produits dans le rumen dépend de la composition de la ration ingérée et digérée dans le rumen. Plus précisément, la fermentation des glucides pariétaux (cellulose, hémicellulose et pectine) génère de l'acétate, tandis que les glucides rapidement fermentescibles, comme l'amidon, tendent plus à produire du propionate et du butyrate (Figure 4). Les glucides solubles (fructose, glucose...) présents dans la ration tendent également à orienter la

production d'AGV vers le butyrate (Figure 4). Les protéines, elles, sont principalement dégradées et fermentées en acides gras volatils ramifiés (IsoAGV ; isovalérate, isobutyrate et isocaproate), et en ammoniac (NH_3) (Figure 4). Les IsoAGV et l'ammoniac sont essentiels à la croissance de certaines espèces bactériennes (Cotta & Hespell, 1986) et à la synthèse de leurs protéines. Ces protéines sont ensuite absorbées au niveau intestinal. Elles représentent une source azotée pour le ruminant.

Tableau 1. Récapitulatif des différents phyla composant les communautés bactériennes des phases liquide (PL) et solide (PS) du contenu ruminal, et de la communauté épimurale.

Hôte	Nombre d'animaux	Primer	Régime	Phase ¹	n ²	%					Références
						F ³	B	S	P	A	
vache	5	274f-1492r	65% foin / 35% concentré	PL	53	11	79	0	8	2	(Whitford <i>et al.</i> , 1998)
boeuf	4	341f-534r	foin de luzerne	PL	68	25	68	4	3	0	(Kocherginskaya <i>et al.</i> , 2001)
			20% foin / 80% concentré	PL	67	15	58	0	27	0	
vache	5	27f-1544r	J0 75% luzerne / 25% concentré	PL	51	90	4	2	4	0	(Tajima <i>et al.</i> , 2000)
			J3 Passage de 25 à 92% concentré	PL	58	72	22	0	5	0	
			J28 92% concentré	PL	41	95	2	0	0	2	
vache	2	27f-1544r	80% luzerne-fléole / 20% de concentré	PL	41	49	39	2	5	5	(Tajima <i>et al.</i> , 1999)
				PS	42	69	29	2	0	0	
mouton	1	530f-1392r	foin d'herbe	PS	48	42	54	0	2	2	(Koike <i>et al.</i> , 2003)
			80% luzerne / 20% concentré	PS	43	47	30	19	2	2	
mouton	2	S926f-L189r	foin d'herbe	PL	98	57	40	0	3	0	(Larue <i>et al.</i> , 2005)
				PS	157	70	25	0	0	4	
				PL	120	54	41	0	1	4	
				PS	134	73	25	0	1	1	
vache	1	877f-878r	75% enveloppe de riz / 25% concentré	PL	40	30	68	0	3	0	(Cho <i>et al.</i> , 2006)
				PS	37	76	11	3	5	5	
				Epithélium	36	6	94	0	0	0	
mouton	1	Bsgl-Bact64f-Bsgl-bact109r1	foin d'herbe	PS		57	36	0	3	4	(Yu <i>et al.</i> , 2006)

¹PL= phase liquide, PS= phase solide. ²n= nombre totale de séquences mises en évidence.

³F= *Firmicutes* (ou anciennement Low G+C Gram+), B= *Bacteroidetes* (ou Cytophaga Flexibacter Bacteroides), S= *Spirochaetes*, P= *Proteobacteria* et A= Autres (High GC Gram positive bacteria, *Deinococcus-Thermus*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* et *Fibrobacteres*).

2. La diversité des bactéries du rumen

2.1 La diversité des bactéries du contenu ruminal

Les techniques culturales, ainsi que la microscopie électronique, ont permis de prendre conscience de la diversité bactérienne existant au sein du contenu ruminal. Différents morphotypes et genres bactériens ont été ainsi identifiés (Bryant & Burkey, 1953; Bryant, 1959). Cependant, ces techniques, dites traditionnelles, ne permettent pas l'identification de bactéries non cultivables, donnant ainsi une fausse image de la diversité réelle. En effet, dans la littérature il est décrit que la proportion de bactéries cultivables, au sein du rumen, oscille entre 10 et 50% (Hespell *et al.*, 1997). Les techniques de biologie moléculaire permettent de pallier ce problème en mettant en évidence une diversité plus importante et donc plus proche de la réalité (Stahl *et al.*, 1988; Pace, 1997). Plusieurs études basées sur ce type de techniques ont été réalisées sur les bactéries du contenu ruminal. Nous valoriserons donc, ici, préférentiellement les travaux liés aux techniques de biologie moléculaire en mettant toute fois en parallèle les données obtenues dans les anciens travaux.

Sans précision de notre part, dans les chapitres suivants, les différentes informations données feront référence aux ruminants domestiques.

2.1.1 Les bactéries de la phase solide

Les bactéries de la phase solide représentent 75% de la biomasse bactérienne totale du rumen (Forsberg & Lam, 1977). Selon plusieurs travaux basés sur le clonage et le séquençage, il a été mis en évidence que cette communauté bactérienne était composée de huit phyla (Tableau 1). Dans la plupart des études, le phylum majoritaire est celui des *Firmicutes*. Selon les travaux, la proportion de ce phylum peut varier entre 42 et 76% (Tableau 1). Les conditions environnementales, différentes entre les études, peuvent en partie expliquer les écarts dans les résultats obtenus. Cependant, les différents jeux d'amorces utilisés dans l'ensemble de ces travaux, ainsi que les biais liés à la technique utilisée, ici les banques de clones, peuvent également expliquer ces variations de résultats. En effet, il est connu que pour un même échantillon, d'une banque à une autre, l'abondance relative de différents groupes phylogénétiques composant une communauté, notamment bactérienne, change (Leser *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2004). Le phylum des *Firmicutes* comprend, entre autre, des espèces bactériennes cellulolytiques et hémicellulolytiques (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus*

albus et *Ruminococcus flavefaciens*) et non cellulolytiques, comme *Selenomonas ruminantium*, bactérie possédant des activités amylolytique et protéolytique. Selon Koike *et al.*, (2003), quel que soit le phylum considéré, il y aurait une interaction entre les bactéries cellulolytiques et non-cellulolytiques, permettant une optimisation de la dégradation des parois végétales dans le rumen. Le deuxième phylum le plus important, en terme de proportion, est celui des *Bacteroidetes* (entre 11 et 54% selon les études) (Tableau 1). Le genre *Prevotella*, majoritaire au sein du rumen (Stewart *et al.*, 1997; Stevenson & Weimer, 2007) appartient à ce phylum, et possède des activités hemicellulolytique et amylolytique. Le troisième phylum, celui des *Spirochaetes*, est minoritaire au sein de la phase solide du rumen (<19%) (Tableau 1). L'espèce *Treponema bryantii* appartient à ce phylum. Elle est non cellulolytique mais est capable, en co-culture avec une espèce bactérienne cellulolytique telle que *Fibrobacter succinogenes*, d'augmenter la dégradation de la cellulose (Stanton & Canale-Parola, 1980). Le phylum des *Proteobacteria* est également minoritaire au sein des bactéries de la phase solide (<5%) (Tableau 1). L'espèce *Succinivibrio dextrinosolvans* est caractéristique de ce phylum. Elle n'est pas cellulolytique, mais elle est capable d'hydrolyser des substrats comme l'amidon présent dans les céréales. En 2006, Yu *et al.*, ont mis en évidence, via une nouvelle technique de biologie moléculaire : la Serial Analysis of Ribosomal Sequencing Tags (SARST), la présence de quatre autres phyla minoritaires au niveau de la phase solide : les *Deinococcus-Thermus* (0,1%), les *Actinobacteria* (1,4%), les *Verrucomicrobia* (1,7%) et les *Fibrobacteres* (0,1%). *Fibrobacter succinogenes* appartient au phylum des *Fibrobacteres*. Dans les études basées sur la culture de bactéries et la microscopie électronique, ce genre bactérien a été décrit comme l'une des bactéries cellulolytiques les plus répandues dans le rumen (Van Gylswyk & Van der Toorn, 1986; Varel & Dehority, 1989). Avec les banques de clones, utilisant l'ADNr 16S, cette bactérie a été rarement retrouvée (Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 1999; Larue *et al.*, 2005). Ceci est peut être dû aux amorces universelles, utilisées dans ces travaux, qui ne permettent pas à une amplification optimale de cette portion du génome chez cette bactérie (Larue *et al.*, 2005).

La communauté bactérienne de la phase solide comprend donc huit phyla dont les deux principaux sont les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes*. D'après les bactéries qui la composent, cette communauté joue un rôle important dans la dégradation des fibres alimentaires. Ceci confirme les résultats de précédentes études réalisées à partir de techniques culturales dans lesquelles il a été montré que les bactéries de la phase solide étaient principalement composées de fibrolytiques (Akin, 1976; Akin, 1979; Williams & Strachan, 1984).

2.1.2 Les bactéries de la phase liquide

Les bactéries de la phase liquide du contenu ruminal ne représentent que 25% de la biomasse bactérienne totale du rumen (Forsberg & Lam, 1977). La communauté bactérienne de la phase liquide serait composée de quatre phyla principaux (Tableau 1). Il s'agirait, comme pour la phase solide, des *Firmicutes*, des *Bacteroidetes*, des *Proteobacteria* et des *Spirochaetes*. En (2004) Edwards *et al.*, ont montré qu'au sein de la phase liquide, environ 11% des UTO (Unité Taxonomique Opérationnelle) observées étaient cultivables, et parmi elles toutes n'étaient pas d'origine ruminale. Dans la même étude, ces auteurs ont mis en évidence trois phyla supplémentaires au niveau de la phase liquide du contenu ruminal: les *Fibrobacter*, les *Chlamydiales-verrucimicrobia*, et les High G+C Gram Positive Bacteria (HGCGPB). Deux autres phyla, non nommés, ont également été observés. Tous ces phyla étaient en proportion minoritaire par rapport au *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. De plus, la mise en évidence par Yu *et al.*, (2006), via la SARST, de quatre nouveaux phyla, au niveau de la communauté bactérienne de la phase solide, laisse supposer que le nombre de phyla bactériens caractéristiques de cette communauté est sous estimé.

Comme pour la phase solide, le phylum majoritaire de la communauté bactérienne de la phase liquide est celui des *Firmicutes*. Ce phylum peut représenter jusqu'à 95% de la communauté (Tajima *et al.*, 2000). Cependant, certains auteurs ont montré que les *Firmicutes*, au sein de la phase liquide, pouvaient être en proportion moindre, c'est à dire 11% de la communauté (Whitford *et al.*, 1998). Comme nous l'avons déjà vu pour la phase solide, les différences entre études, au niveau des conditions environnementales, des jeux d'amorces utilisés ainsi que les biais liés aux banques de clones, peuvent expliquer des écarts importants de résultats entre plusieurs travaux réalisés sur un même type d'échantillon. Le phylum des *Firmicutes* contient principalement des genres bactériens cellulolytiques et hémicellulolytiques tels que : *Butyrivibrio* et *Ruminococcus*. Les bactéries de la phase liquide seraient principalement issues du détachement de bactéries présentes au niveau de la phase solide (McAllister *et al.*, 1994). Il n'est donc pas aberrant d'observer une similitude entre les espèces bactériennes composant ces deux communautés. Néanmoins il a été montré, via l'utilisation de sondes spécifiques marquées, que la proportion de cellulolytiques était plus faible au niveau de la phase liquide comparé à la phase solide (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). Le phylum des *Firmicutes*, au sein de la phase liquide du contenu ruminal, est également composé, entre autre, d'espèces bactériennes telle que *Selenomonas ruminantium* possédant des activités amylolytique et protéolytique, mais également capables de fermenter des sucres issus de la dégradation des parois végétales. Le deuxième phylum majoritaire est celui des *Bacteroidetes* (entre 2 et 79%

selon les études) (Tableau 1). Les genres prédominants au sein de ce phylum sont les *Prevotella* et les *Bacteroides*. *Prevotella ruminicola* est une espèce particulièrement ubiquiste, capable d'hydrolyser les parois végétales et l'amidon, mais aussi d'utiliser les produits de dégradation des parois végétales. L'ensemble de ces activités explique la présence de ce genre bactérien au sein des deux communautés bactériennes du contenu ruminal. Au niveau de la phase liquide, les *Prevotella* sont subdivisées en deux groupes. Le premier comprend les espèces *Prevotella bryantii* et *Prevotella albensis*, ces espèces ne sont pas d'origine ruminale, mais probablement buccale (Ramsak *et al.*, 2000). Dans le second groupe sont présentes les espèces *Prevotella ruminicola* et *Prevotella brevis*, dont l'origine est ruminale (Ramsak *et al.*, 2000). Il est très probable que cette subdivision des *Prevotella* existe également au niveau de la phase solide, mais à ce jour aucune étude n'a encore été réalisée pour affirmer ou non cette hypothèse. Le phylum des *Spirochaetes* ne représente qu'un faible pourcentage (<2%) des bactéries présentes au niveau de la phase liquide (Tableau 1). De façon générale, le phylum des *Proteobacteria* est un peu plus important que dans la phase solide (entre 1 et 27% selon les études) (Tableau 1). Comme pour la phase solide, *Succinivibrio dextrinosolvens* est une espèce bactérienne caractéristique de ce phylum. Ce microorganisme est capable d'utiliser les produits de dégradation des parois végétales.

De façon globale, les phyla et les principaux genres et espèces bactériens composant ces deux communautés sont peu différents. Ceci s'explique par l'ubiquitisme de ces microorganismes, capables à la fois de dégrader les parois végétales (préférentiellement dans la phase solide) et d'utiliser les produits de cette dégradation (préférentiellement dans la phase liquide). Cependant, dans des études basées sur la réalisation de banques de clones (Tajima *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2006) ou la PCR-DGGE (Larue *et al.*, 2005), il a été montré que ces deux communautés bactériennes étaient distinctes l'une de l'autre en terme de composition bactérienne, de structure et de diversité. Ainsi, la communauté bactérienne de la phase solide serait plus diverse que celle de la phase liquide (Larue *et al.*, 2005). Elle contiendrait des genres et des espèces bactériennes spécifiques tels que : *Clostridium algidicarnis*, *Carnobacterium*, *Ruminococcus rarhayi* et *Agrobacterium larrymoorei*, qui seraient absents au niveau de la phase liquide (Cho *et al.*, 2006).

Au niveau du contenu ruminal total (phase liquide et solide), les *Firmicutes* représentent donc le phylum majoritaire suivi des *Bacteroidetes*. Des résultats comparables, en terme de proportion, ont été trouvés pour les fecès humains (Wilson & Blitchington, 1996; Suau *et al.*, 1999), de porc (Cotta *et al.*, 2003) et le contenu du colon chez le cheval (Daly *et al.*, 2001).

Seuls les clusters de *Clostridiaceae*, composant le phylum des *Firmicutes*, variaient entre ces trois types d'échantillons.

De façon générale, quelle que soit l'espèce animale observée, le phylum des *Firmicutes* semble donc être important au sein de l'écosystème bactérien intestinal et ruminal probablement parce qu'il comprend une majorité d'organismes fibrolytiques (Daly *et al.*, 2001).

2.2 La diversité des bactéries attachées à la paroi du rumen

La présence de bactéries au niveau de l'épithélium ruminal a été mise en évidence pour la première fois et accidentellement par Tamate *et al.*, (1971). Le terme de "communauté épimurale" est employé pour la première fois par Mead et Jones (1981) pour désigner l'ensemble des bactéries adhérant à l'épithélium du rumen. Cette communauté bactérienne ne représente que 1% de la biomasse bactérienne totale du rumen (Czerkawski, 1986a), et par conséquent peu d'études ont, à ce jour, été réalisées pour caractériser sa diversité. Par microscopie électronique, coloration de Gram, techniques culturales et analyse des produits de fermentation, les genres *Butyrivibrio*, *Bacteroides*, *Micrococcus*, *Lachnospira*, *Treponema*, *Ruminococcus*, *Selenomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* et *Propionobacterium* ont été mis en évidence au niveau de l'épithélium ruminal (Cheng & Wallace, 1979; Dehority & Grubb, 1981; Mead & Jones, 1981). La majorité de ces genres sont communs avec ceux du contenu ruminal (Hungate, 1966). Les genres *Butyrivibrio* et *Bacteroides*, appartenant respectivement aux phyla des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes*, sont prédominants au niveau de la paroi du rumen (Dehority & Grubb, 1981; Mead & Jones, 1981). Une étude récente, basée sur la réalisation de banque de clones, a également mis en évidence l'importance des *Bacteroidetes* (94%) au sein de la communauté épimurale (Cho *et al.*, 2006) (Tableau 1) alors que les *Firmicutes* ne représentaient que 6% de cette communauté. Rappelons qu'au niveau du contenu ruminal, les *Firmicutes* étaient majoritairement représentés. Cette différence dans la composition des communautés bactériennes du rumen (paroi vs contenu) avait déjà été observée via la microscopie électronique (Bauchop *et al.*, 1975; Cheng *et al.*, 1979; McCowan *et al.*, 1980) et a été confirmée récemment par des techniques de biologie moléculaire (Cho *et al.*, 2006).

La plupart des bactéries identifiées au sein de ces phyla ont une activité protéolytique (Wallace *et al.*, 1979; Dinsdale *et al.*, 1980). Cette activité serait essentielle pour la dégradation des cellules desquamées de la paroi. Ce renouvellement cellulaire permettrait de

surcroît une amélioration de l'absorption des nutriments (McCowan *et al.*, 1978; Dinsdale *et al.*, 1980). Deux autres phyla ont également été mis en évidence au niveau de l'épithélium ruminal. Il s'agit des *Spirochaetes* (Mead & Jones, 1981) et des *Proteobacteria* (Mitsumori *et al.*, 2002). Aucune information quant à la proportion relative de ces deux phyla n'est actuellement disponible. Le genre *Nitrosomonas*, appartenant au phylum des *Proteobacteria*, a été observé au niveau de la paroi ruminale (Mitsumori *et al.*, 2002). *Nitrosomonas* oxyde l'ammoniac en nitrite grâce à l'ammonia monooxygénase et à l'hydroxylamine oxydoréductase (Hollocher *et al.*, 1981; Wood, 1986). L'ammonia monooxygénase est très proche de la méthane monooxygénase, en terme de séquence en acides aminés (Holmes *et al.*, 1995). De ce fait, *Nitrosomonas* pourrait également oxyder le méthane (Hyman & Wood, 1983; Jiang & Bakken, 1999). La communauté épimurale serait donc capable d'oxyder l'ammoniac et le méthane. La fonction d'oxydation de l'ammoniac est à mettre en parallèle avec l'activité uréolytique de certains genres bactériens présents au niveau de la paroi, probablement *Staphylococcus* ou *Micrococcus* (Wallace, 1979). Selon Cheng et Costerton (1980), 10% des bactéries présentes à la surface de la paroi épimurale seraient responsables de la majorité de la production d'uréases dans le rumen. Cette activité est contrôlée par la concentration en ammoniac du contenu ruminal, qui lorsqu'elle est trop importante, inhibe l'activité uréolytique des bactéries de la paroi (Wallace, 1979). Un autre modèle, proche de celui que nous venons de voir a été proposé par Cheng et Wallace (1979). Dans ce modèle, ce serait la population bactérienne attachée à la paroi qui varierait selon la concentration en ammoniac, et donc avec elle, l'activité uréolytique. Une autre fonction est attribuée à la communauté épimurale, il s'agit de la dégradation de l'oxygène (Wallace *et al.*, 1979). Cette fonction n'a encore jamais été clairement démontrée, mais elle permettrait le maintien des conditions anaérobies nécessaires au bon fonctionnement du rumen.

Les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Proteobacteria* et les *Spirochaetes* sont les quatre phyla communs aux trois communautés bactériennes du rumen. Les *Firmicutes* sembleraient majoritairement présents au niveau des phases liquide et solide du contenu ruminal, tandis qu'au niveau de l'épithélium ruminal, ce serait les *Bacteroidetes* qui prédomineraient. Ces trois communautés seraient également différentes les unes des autres en terme de composition bactérienne. Cependant, la réalisation d'une seule étude sur ce sujet nous incite à rester prudent quant à la validité de ce dernier résultat.

3. Les facteurs de variation de la diversité bactérienne ruminale

Dans ce chapitre nous décrirons les différents facteurs pouvant modifier la diversité des communautés bactériennes du rumen. Nous étudierons dans un premier temps les facteurs liés à l'animal, à savoir l'espèce hôte, l'individu et l'âge. Dans les parties suivantes, d'autres facteurs comme ceux liés à l'alimentation (niveau d'ingestion, composition du régime), la composition de l'écosystème microbien ruminal (+/- de protozoaires) ou encore les conditions environnementales (température ambiante), seront étudiés.

3.1 L'espèce hôte

3.1.1 Les bactéries du contenu ruminal

Des analyses, par microscopie électronique et coloration de Gram ont permis de mettre en évidence une similitude entre la communauté bactérienne ruminale de différentes espèces de ruminants domestiques et des ruminants sauvages (Pearson, 1967; Pearson, 1969; Hobson *et al.*, 1976). En effet, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* et *Butyrivibrio spp.*, principales espèces bactériennes présentes au sein du rumen des ruminants domestiques, ont également été retrouvées chez les ruminants sauvages (Dehority, 1975; Orpin *et al.*, 1985; Dehority, 1986). Des résultats comparables ont été observés, via des techniques de biologie moléculaire, lors de la comparaison de la composition bactérienne du contenu ruminal de l'élan (*Taurotragus oryx*), de la gazelle de Thompson (*Gazella rufifrons*) et de la gazelle de Grant (*Gazella granti*), trois ruminants sauvages, avec celle d'un ruminant domestique : le zébu (*Bos indicus*) (Nelson *et al.*, 2003). Chez ces espèces animales, quatre phyla principaux ont été mis en évidence. Il s'agissait des *Proteobacteria*, des *Bacteroidetes*, des *Firmicutes* et des *Verrucomicrobia*. Pour l'ensemble de ces animaux, les Firmicutes étaient le phylum majoritaire avec comme genres dominants, les *Ruminococcus* et les *Clostridium*. L'ensemble de ces résultats montre, qu'en terme de phylum, les communautés bactériennes du contenu ruminal sont comparables entre ruminants domestiques et ruminants sauvages. Entre ruminants sauvages, ces communautés sont également similaires.

Chez les ruminants domestiques, il a été montré, par des techniques culturales, que les espèces bactériennes amylolytiques et hemicellulolytiques étaient relativement similaires entre ovins et bovins (Dehority & Grubb, 1976; Leedle & Hespell, 1980). Des études basées sur la réalisation de banques de clones ont confirmé cette ressemblance. Chez les ovins, la communauté bactérienne du contenu ruminal est composée principalement de quatre phyla :

les *Firmicutes* (entre 42 et 73% selon les études), les *Bacteroidetes* (entre 25 et 54%), les *Spirochaetes* (<19%) et les *Proteobacteria* (<3%) (Tableau 1). Chez les bovins (ex : *Bos taurus*), on retrouve les mêmes phyla, en proportions similaires, à l'exception des *Proteobacteria* (<27%) qui sont plus représentées que les *Spirochaetes* (<4%) (Tableau 1). Le yak (*Bos grunniens*), autre bovin domestique, fait cependant exception puisque dans le contenu ruminal de ces animaux, le phylum des *Proteobacteria* est absent (An *et al.*, 2005). Cette spécificité, du yak, peut être liée à l'espèce animale, mais on ne peut exclure que des différences de régimes alimentaires entre ruminants domestiques soient à l'origine de ces divergences de résultats. De plus, l'utilisation d'amorces PCR différentes entre les travaux pourrait expliquer ces variations de résultats. Chez les caprins, la concentration bactérienne au niveau du contenu ruminal serait plus importante que chez les ovins (Sultan *et al.*, 2006). Néanmoins, les principaux genres bactériens mis en évidence au niveau du rumen de chèvre sont proches de ceux trouvés chez la vache ou le mouton. Il s'agit de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Prevotella brevis*, *Bacteroides* (Dehority & Grubb, 1977). Chez la chèvre, le genre *Butyrivibrio* représente 70% des souches isolées au niveau du rumen. Cette proportion est plus élevée que ce qui a déjà pu être observé chez les bovins ou les ovins (Dehority & Grubb, 1977). Des études supplémentaires sont encore nécessaires pour savoir si la diversité bactérienne du rumen de chèvre est différente de celles du mouton ou de la vache.

3.1.2 Les bactéries attachées à la paroi du rumen

Par des méthodes de microscopie électronique, Bauchop *et al.*, (1975) et McCowan *et al.*, (1980) ont étudié, respectivement, la communauté épimurale d'ovins et de bovins nourris avec des régimes similaires (100% fourrage). En comparant ces deux études, on peut observer une différence de **densité** bactérienne entre ces deux espèces animales. En effet, la population bactérienne épithéliale du sac caudo-dorsal du rumen était plus dense chez les ovins que chez les bovins (Bauchop *et al.*, 1975; McCowan *et al.*, 1980). Cependant, une différence de densité bactérienne ne signifie pas forcément un changement de composition bactérienne. En effet, par des techniques de biologie moléculaire, Collado et Sanz (2007) ont récemment montré que la composition de la communauté épimurale entre ovins et bovins, était proche. A ce jour, nous disposons de trop peu d'informations pour statuer sur l'effet de l'espèce hôte sur la communauté épimurale. Des études complémentaires sont nécessaires pour pouvoir répondre à cette question.

De façon générale, l'espèce hôte ne semble pas avoir d'incidence sur la composition bactérienne du contenu ruminal, en terme de phylum. En effet, les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* sont les deux phyla majoritaires quelle que soit l'espèce de ruminants étudiée, qu'elle soit sauvage ou domestique. En revanche, pour la communauté épimurale, le manque de données ne permet pas pour l'instant de statuer sur l'effet de l'espèce hôte sur sa diversité.

3.2 L'individu

Par des techniques de biologie moléculaire (notamment la DGGE) il a été montré que la structure de la communauté bactérienne du contenu ruminal variait d'un individu à l'autre (Edwards *et al.*, 2005; Larue *et al.*, 2005). Les différences observées, entre individus ayant reçu un même traitement expérimental, au niveau de la structure des communautés bactériennes, étaient de l'ordre de 40% (Larue *et al.*, 2005). D'après Zoetendal *et al.*, (1998), malgré ces différences inter-individuelles, la flore bactérienne dominante active est stable d'un individu à l'autre. Cependant, cet effet « individu » reste non négligeable, puisqu'il supplante l'effet d'un antibiotique (Edwards *et al.*, 2005) ou d'un régime (Larue *et al.*, 2005).

Dans une étude basée sur l'utilisation de la microscopie électronique, il a été montré que le nombre, ou la **densité**, des bactéries attachées à la paroi du rumen variait d'un animal à l'autre (McCowan *et al.*, 1980). A notre connaissance, aucune étude n'a encore été réalisée pour savoir si la variabilité individuelle jouait sur la **diversité** de la communauté épimurale. Chez l'humain, cet effet hôte a été montré par DGGE pour la communauté bactérienne de la muqueuse intestinale (Green *et al.*, 2006). Les différences, au niveau de cette communauté, entre individus étaient de 66% (Green *et al.*, 2006). Ceci pourrait être expliqué par les caractéristiques immunologiques ou encore les récepteurs spécifiques aux bactéries présents sur les parois du tractus digestif, codés par le matériel génétique de l'hôte (Zoetendal *et al.*, 2001).

Les communautés bactériennes du contenu ruminal varient d'un individu à l'autre, même si les bactéries dominantes composant ces communautés, ne semblent pas être affectées. Au niveau de la communauté épimurale, seule une différence de densité a été mise en évidence d'un animal à l'autre.

3.3 L'âge

3.3.1 Colonisation du contenu ruminal par les bactéries

A la naissance, le tube digestif des ruminants est vierge de tout microorganisme. La colonisation se fait via les contacts du jeune avec sa mère et d'autres individus, l'environnement et le régime alimentaire (Long & Swenson, 1977; Mackie *et al.*, 1999). Chez le veau et l'agneau cette colonisation est rapide (Jayne-Williams, 1979) puisque dès le deuxième jour après la naissance, la concentration bactérienne au niveau du contenu ruminal atteint 10^9 cellules/ml (Fonty *et al.*, 1987). Au bout d'une semaine, cette concentration est comparable à celle observée chez un ruminant adulte : 10^{10} à 10^{11} cellules/ml. Chez l'agneau, lors de la première semaine de vie, les bactéries aérobies et anaérobies facultatives sont 10 à 100 fois moins importantes que les anaérobies strictes (Fonty *et al.*, 1987). Chez l'agneau et le veau, cette quantité diminue jusqu'à l'âge de deux mois pour atteindre une concentration de 10^5 cellules/ml comparable à celle d'un ruminant adulte (Anderson *et al.*, 1987; Fonty *et al.*, 1987). Chez les ruminants nouveaux nés, trois ou quatre jours après la naissance, les bactéries fibrolytiques apparaissent (Bryant *et al.*, 1958; Anderson *et al.*, 1987; Fonty *et al.*, 1987). Cette implantation nécessiterait un contact avec la mère ou d'autres individus (Fonty *et al.*, 1987). A ce stade, l'animal se nourrit exclusivement de lait et n'a donc pas encore reçu d'aliments solides, contenant des fibres végétales. Pour persister dans le rumen, ces bactéries cellulolytiques sont donc tributaires de l'activité des bactéries non-cellulolytiques (Fonty *et al.*, 1987). Chez l'agneau ces bactéries cellulolytiques atteignent des concentrations comparables à celles observées chez l'adulte (10^7 à 10^8 cellules/ml) une semaine après la naissance (Fonty *et al.*, 1987). Chez le veau leur développement est plus lent. Il faut attendre environ deux mois pour arriver à de telles concentrations (Anderson *et al.*, 1987). Avant sevrage, les bactéries amylolytiques, protéolytiques et utilisatrices de lactate sont présentes en nombre équivalent à celles observées chez l'adulte (Anderson *et al.*, 1987).

De par la colonisation importante et précoce du rumen, on peut se demander si la communauté bactérienne du contenu ruminal des jeunes est similaire à celle des adultes. Notons que dans le terme jeune, nous entendons ici des animaux âgés de une à treize semaines après la naissance. D'après Fonty *et al.*, (1987) les genres *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus* et *Bifidobacterium* sont très présents chez les agneaux (âgés de 2 à 10 jours), mais ne constituent pas des membres prédominants de la communauté bactérienne du contenu ruminal chez les adultes. Cette flore s'apparenterait plutôt à celle de la communauté épimurale de par l'importance des genres *Propionibacterium*, *Bacteroides* et

Eubacterium (Fonty *et al.*, 1987). Chez les bovins, une population bactérienne caractéristique des jeunes animaux a également été mise en évidence (Bryant *et al.*, 1958). Cette population n'est pas stable durant les treize premières semaines de vie. Des bactéries communes aux jeunes et aux adultes ont également été trouvées dans le contenu des pré-estomacs de veaux. Il s'agit de streptocoques anaérobies facultatifs, de ruminocoques, de ruminocoques non-cellulolytiques, des espèces *Prevotella ruminicola*, *Fibrobacter succinogenes* et enfin des genres *Butyrivibrio* et *Selenomonas* (Bryant *et al.*, 1958). Pour finir, il existe des bactéries spécifiques aux ruminants adultes (Bryant *et al.*, 1958; Fonty *et al.*, 1987). Par exemple, chez le bovin, il s'agirait entre autres des genres *Succinivibrio*, *Succinomonas* et *Lachnospira*. Cependant, ces bactéries n'étant pas majoritaires au niveau du contenu ruminal, il est possible qu'elles n'aient pas été détectées chez le jeune (Bryant *et al.*, 1958).

3.3.2 Colonisation de la paroi ruminale par les bactéries

La colonisation de la paroi du rumen par les bactéries est rapide (Mueller *et al.*, 1984a; 1984b; Rieu *et al.*, 1989; 1990). En effet, chez les agneaux, deux jours après la naissance, des bactéries adhérentes à la paroi du rumen peuvent déjà être observées (Rieu *et al.*, 1989; Rieu *et al.*, 1990). Les streptocoques et les enterobacteria s'établissent en premier (J2 après la naissance), suivis par les staphylocoques et les microcoques (J8 après la naissance) (Rieu *et al.*, 1989). Le genre *Clostridium* apparaît six jours après la naissance (Rieu *et al.*, 1989). D'après les travaux de Mueller *et al.*, (1984b), au niveau de la paroi du rumen, les bactéries aérobies et anaérobies facultatives auraient tendance à diminuer avec l'âge. Fonty *et al.*, (1987) montrent des résultats inverses avec une augmentation de ce type de bactéries lors des 10 jours suivant la naissance. A ce jour, aucun travail récent ne permet de valider l'une ou l'autre de ces affirmations.

Au cours du temps, on assiste donc à une complexification de la flore épithéliale (Mueller *et al.*, 1984a; 1984b; Rieu *et al.*, 1989; 1990). A la dixième semaine, la communauté épimurale est « adulte » (Mueller *et al.*, 1984a; Rieu *et al.*, 1989; Zitnan *et al.*, 1993). Les bactéries colonisant la paroi ruminale sont, comme pour le contenu ruminal, classées en trois groupes : 1) les bactéries présentes seulement chez les jeunes agneaux, 2) les bactéries persistant après la première colonisation et présentes chez l'adulte, et 3) les bactéries présentes seulement chez l'adulte (Mueller *et al.*, 1984a).

Les communautés bactériennes du contenu et de la paroi ruminale sont différentes entre le jeune ruminant âgé de 2 à 3 mois, et l'adulte. En effet, chez le jeune ces communautés évoluent pour se stabiliser vers dix à treize semaines après la naissance. Certaines bactéries sont présentes à tous les stades de la vie des animaux. D'autres, en revanche, sont spécifiques du stade nouveau-né ou adulte.

3.4 L'alimentation

3.4.1 Le niveau d'ingestion

L'effet du niveau d'ingestion de la ration sur la diversité bactérienne du contenu ruminal a été très peu étudié. Au sein d'un même essai, il a été montré, chez des ovins, que ce facteur n'avait pas d'influence sur la **densité** bactérienne de la phase liquide (Rodriguez *et al.*, 2003). Ce n'était pas le cas pour la **densité** bactérienne de la phase solide qui diminuait avec des niveaux d'ingestion importants (40g MS/kg vs 80g MS/kg de poids vif) (Rodriguez *et al.*, 2003). Cette diminution pourrait être liée à l'augmentation du taux de sortie des particules alimentaires, entraînant avec elles les microorganismes adhérents. Ceci est généralement observé avec des niveaux d'ingestion élevés. Dans une autre étude, par PCR DGGE, il a été observé, toujours sur moutons, qu'en fonction du niveau d'ingestion, la structure de la communauté bactérienne de la phase liquide n'était pas la même (McEwan *et al.*, 2005). A notre connaissance, aucune information quant à l'effet du niveau d'ingestion de la ration sur la **diversité** ou la structure des communautés bactériennes de la phase solide et de la paroi n'est à ce jour disponible.

3.4.2 Le régime alimentaire

Dans la bibliographie, les études menées pour évaluer l'impact du régime alimentaire sur la diversité bactérienne du rumen sont essentiellement basées sur la comparaison de régimes riches en fourrages et riches en concentrés. Ceci explique pourquoi dans le chapitre suivant seulement deux types de régimes (fourrage vs concentré) seront présentés.

3.4.2.1 Les bactéries du contenu ruminal

L'effet du régime alimentaire sur la diversité bactérienne du contenu ruminal a été observé dans plusieurs études (Tableau 1). La communauté bactérienne de la phase liquide, sous un régime riche en fourrage (100% foin de graminée ou 100% foin de luzerne + graminée), est principalement composée du phylum des *Bacteroidetes* (entre 40 et 68% selon

les études), et des *Firmicutes* (entre 25 et 57%). Les phyla des *Proteobacteria* et des *Spirochaetes* sont également présents mais en proportion moindre (3% et entre 0 et 4% ; respectivement) (Tableau 1). La nature du fourrage influe sur la présence de *Spirochaetes*. En effet ces derniers seraient favorisés lorsque du foin de luzerne est présent dans la ration (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Larue *et al.*, 2005) (Tableau 1).

Lorsque du concentré est présent dans la ration (entre 20 et 35%), dans la plupart des études, le phylum des *Firmicutes* devient majoritaire (entre 11 et 90% selon les études) (Tableau 1). Au sein de ce phylum on observe alors une diminution du nombre de ruminocoques (Tajima *et al.*, 2000). Plus précisément, c'est la proportion de certains ruminocoques cellulolytiques, comme *Ruminococcus albus*, qui diminue (Van der Linden *et al.*, 1984; Larue *et al.*, 2005). La proportion d'autres ruminocoques, dit amylolytiques, comme *R. bromii*, *R. callidus*, *R. hydrogenotrophicus*, *R. obeum* et *R. schinkii*, augmente avec un apport de céréales dans la ration (Larue *et al.*, 2005). D'autres bactéries amylolytiques, telles que *Mitsuokella spp.* et *Selenomonas spp.* appartenant elles aussi au phylum des *Firmicutes*, sont également plus importantes en nombre lorsque le régime alimentaire contient de l'amidon (Mackie & Gilchrist, 1979; Tajima *et al.*, 2000; Larue *et al.*, 2005). Toujours au sein des *Firmicutes*, avec un régime riche en concentré, la proportion de bactéries productrices (*Lactobacillus ruminis*, *Streptococcus bovis*...) et utilisatrices de lactate (*Selenomonas ruminantium*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, et *Megasphera elsdenii*) augmente (Tajima *et al.*, 2000; Tajima *et al.*, 2001). Ceci est en accord avec de précédents travaux réalisés via les techniques traditionnelles (Mackie & Gilchrist, 1979). Les phyla des *Proteobacteria* et des *Spirochaetes* sont minoritairement présents (7% et 1% en moyenne ; respectivement) dans la communauté bactérienne de la phase liquide d'animaux nourris avec un régime riche en céréales.

Pour des régimes très riches en concentré (92%), les *Firmicutes* représentent 95% des séquences bactériennes de la phase liquide (Tableau 1), dont plus de la moitié sont associées aux genres *Mitsuokella*, et *Selenomonas* (Tajima *et al.*, 2000). Le phylum des *Bacteroidetes* est minoritaire (2%) lorsque les quantités de concentré sont aussi importantes dans la ration. Les *Proteobacteria* et les *Spirochaetes*, eux, sont absents (Tajima *et al.*, 2000).

Pour la phase solide, sous un régime riche en fourrage (100% foin de graminée ou 100% foin de luzerne + graminée), il a été observé que les deux phyla majoritaires étaient les *Firmicutes* (entre 42 et 70% selon les études) et les *Bacteroidetes* (entre 25 et 54%) (Tableau 1). Les *Proteobacteria* sont également présents, en revanche pour ce type de régime, les *Spirochaetes* sont absents (Koike *et al.*, 2003; Larue *et al.*, 2005).

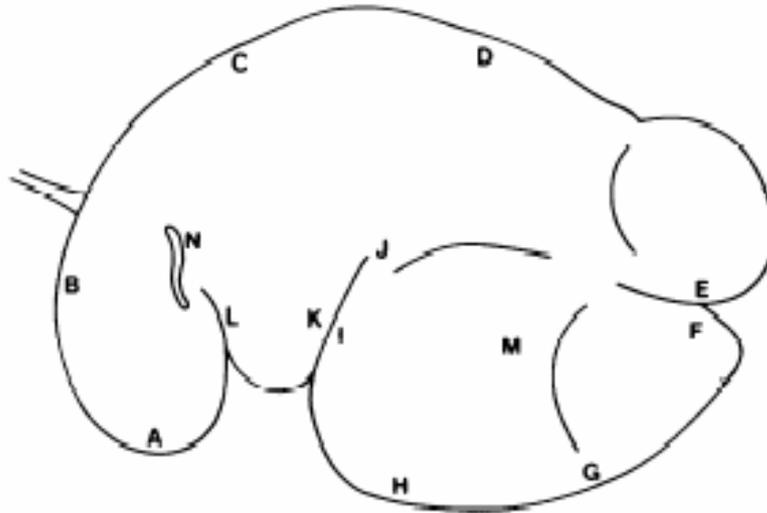


Figure 5. Représentation schématique des différents prélèvements effectués par McCowan *et al.*, (1980) au niveau de la paroi du rumen.

A: reticulum ventral; B: surface craniale du reticulum; C: surface dorsale du sac cranial; D: surface dorsale du sac dorsal; E: surface dorsale du pilier caudal; F: surface ventrale du pilier caudal; G: surface ventrale du sac caudo-ventral; H: surface ventrale du sac ventral; I: surface caudale du plier cranial; J: lèvre du pilier cranial; K: surface craniale du pilier cranial; L: lèvre du plis rimino-reticulaire; M: paroi gauche du sac caudoventral; N: base de la cannelure reticulaire.

Pour des rations contenant à la fois du fourrage et du concentré (entre 20 et 30%), le phylum majoritaire est celui des *Firmicutes* (entre 47 et 76%) (Tableau 1). Comme pour la phase liquide, une diminution des cellulolytiques au profit des amylolytiques est observée (Larue *et al.*, 2005). Le phylum des *Bacteroidetes* est, lui, en plus faible proportion (entre 11 et 30%) (Tableau 1). Les phyla des *Proteobacteria* et des *Spirochaetes* sont également observés pour ce type de ration (entre 1 et 5%) (Koike *et al.*, 2003; Larue *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006).

3.4.2.2 Les bactéries attachées à la paroi du rumen

Au niveau de la paroi ruminale, aucune étude n'a encore été réalisée pour évaluer l'effet du régime alimentaire sur la **diversité** de la flore épimurale. En revanche, en 1980 McCowan *et al.* ont décrit l'effet du régime alimentaire sur la **densité** de la communauté épimurale. Pour cela un premier lot de 4 taureaux a été nourri avec une ration comprenant 80% de concentré et 20% de foin de luzerne, tandis qu'un second lot de 3 animaux a été nourri avec un régime 100% foin de luzerne. Après abattage, des prélèvements de paroi ruminale ont été réalisés en différents sites épithéliaux (Figure 5). Par microscopie électronique, les auteurs ont montré que les différences de régimes alimentaires ne changeaient pas le nombre total de bactéries adhérant à l'épithélium ruminal, mais seulement leur distribution entre sites. En effet, avec un régime concentré, la région dorsale du rumen contenait un nombre plus important de bactéries adhérant à la paroi que la région ventrale, alors que l'inverse était observé chez les animaux nourris avec un régime 100% foin. Selon les auteurs, cette différence de répartition de la communauté épimurale selon le régime, serait liée à la nature physique de la ration ingérée. En effet, les contractions du réticulo-rumen conduisent, pour une ration riche en fourrage, à une stratification du digesta, avec au niveau dorsal une poche de gaz, dans la région ventrale une couche de liquide, et enfin, entre les deux premières couches citées, une couche de matériel fibreux. Ce matériel fibreux étant en contact avec la paroi, il aurait une action abrasive sur cette dernière diminuant le nombre de bactéries adhérant à l'épithélium au niveau des aires latérales du rumen (sites : B, E, I, J, K, L, et N; Figure 5). Les poches de gaz et de liquide seraient, elles, moins abrasives, permettant au niveau dorsal et ventral du rumen d'avoir une population bactérienne plus importante. Chez les animaux nourris avec un régime concentré, la consistance du digesta est plus homogène et proche du liquide. La partie dorsale fortement peuplée serait liée à la poche de gaz existante, non soumise à des phénomènes d'abrasion comme dans les autres zones du rumen.

Le régime alimentaire a un effet sur les communautés bactériennes du contenu ruminal. La présence de concentré dans la ration favorise les bactéries amylolytiques, productrices et utilisatrices de lactate. Dans des régimes riches en fourrage, c'est la présence de bactéries fibrolytiques qui domine. Actuellement, aucune information n'est disponible sur l'effet du régime alimentaire sur la diversité de la communauté épimurale.

3.5 Les protozoaires

De nombreuses études ont été réalisées, sur ovins, afin d'observer l'influence des protozoaires sur les microorganismes du rumen. Il est connu que la défaunation (= absence de protozoaires) conduit à une augmentation de la concentration bactérienne du contenu ruminal (Eadie & Hobson, 1962; Eadie & Gill, 1971; Kurihara *et al.*, 1978). En présence de protozoaires, il a également été observé que la quantité de bactéries amylolytiques est plus faible (Kurihara *et al.*, 1978; Arakaki *et al.*, 1994). En effet, les protozoaires entodiniomorphes sont connus pour ingérer les granules d'amidon (Kinoshita *et al.*, 1984), et avec elles, les bactéries amylolytiques adhérentes à ces granules. L'effet des protozoaires sur les bactéries cellulolytiques du rumen n'est pas encore très clair. Certaines études, montrent une augmentation de cette population après défaunation (Kurihara *et al.*, 1978; Williams & Withers, 1991), d'autres travaux indiquent plutôt une diminution (Eadie & Hobson, 1962; Abou Akkada & El-Shazly, 1964), dans certains cas, aucun effet de la défaunation n'a été observé (Whitelaw *et al.*, 1972; Eugène *et al.*, 2004).

Récemment, par la construction de banques de clones, l'effet des protozoaires sur la **diversité** de la communauté bactérienne de la phase liquide a été évalué (Ozutsumi *et al.*, 2005). Il a été montré que les animaux faunés contenaient une diversité bactérienne plus importante que leurs homologues défaunés. En effet, en présence de protozoaires, la phase liquide compte 98 UTO (31,4% des clones) répartis en cinq phyla : les *Firmicutes* (59,7%), les *Bacteroidetes* (34,4%), les *Spirochaetes* (2,6%), les *Actinobacteria* (2,0%) et les *Proteobacteria* (1,3%). En l'absence de protozoaires, le nombre d'UTO mis en évidence chute à 72 (24% des clones), le phylum des *Actinobacteria* disparaît alors que la proportion des autres phyla reste globalement la même. Chez les animaux défaunés, la quantité de bactéries composant le cluster E (phylum des *Firmicutes*) est plus importante (Ozutsumi *et al.*, 2006). D'après ces auteurs, ce groupe bactérien jouerait un rôle particulier au sein des rumens défaunés. Ce rôle reste encore à définir.

Au niveau épithélial, par microscopie électronique, il a été montré que les protozoaires, et notamment les *Holotriches*, étaient capables de s'accrocher, à la paroi du rumen (Abe *et al.*, 1981) et donc potentiellement d'avoir un impact sur la densité, voire la diversité, des bactéries présentes à ce niveau. Cependant, par des techniques de biologie moléculaire, aucun protozoaire n'a pu être mis en évidence au niveau épithélial (Shin *et al.*, 2004). Le faible nombre d'études réalisées sur le sujet et les résultats contradictoires en découlant font que l'effet des protozoaires sur la diversité de la communauté épimurale est, à ce jour, encore inconnu.

La présence de protozoaires diminue la quantité de bactéries présentes au niveau du contenu ruminal. Il semble que ce soit surtout la quantité de bactéries amylolytiques et celles composant le cluster E qui soit affectées. La présence de protozoaires augmente la diversité bactérienne au niveau du contenu ruminal.

3.6 Autre facteur influençant la diversité bactérienne du rumen : la température

L'effet de la température extérieure, sur la diversité bactérienne de la phase liquide, a récemment été testé sur vaches (Tajima *et al.*, 2007). Pour cela, des animaux ont été soumis successivement à trois températures différentes : 20°C, 28°C et 33°C, pour lesquelles une banque de clones, basée sur l'ADNr 16S, a été réalisée. Quelle que soit la température, les phyla des *Firmicutes* et des *Bacteroidetes* restent majoritaires (> 80%) au sein de la communauté bactérienne de la phase liquide. Les indices de biodiversité et le nombre d'UTO sont stables d'une banque à l'autre, même si la composition bactérienne de la communauté étudiée varie. En effet, le nombre de bactéries constituant le cluster E diminue lorsque la température augmente. Dans un chapitre précédant, nous avons vu que la quantité de bactéries composant ce cluster variait également en présence de protozoaires (Ozutsumi *et al.*, 2005). Le cluster E, semble donc plus sensible que d'autres aux variations de l'environnement (Tajima *et al.*, 2007).

Il est probable que la température n'influe pas directement sur la composition de la communauté bactérienne de la phase liquide. En effet, des variations de température pourraient influencer, entre autre, le niveau d'ingestion des aliments. Or comme nous l'avons vu précédemment, ce facteur modifie la composition de certaines communautés bactériennes

ruminale. La température serait donc un facteur indirect jouant sur la composition des bactéries du rumen.

4. Les techniques d'étude de la diversité d'une communauté microbienne

Comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents, les communautés bactériennes du rumen ont, par le passé, été étudiées via des techniques culturales et la microscopie électronique. Ces techniques ont permis d'obtenir des informations sur la taxonomie, l'écologie et la physiologie des bactéries du rumen. Cependant, reproduire *in vitro* les conditions de croissance nécessaires à certains organismes ruminants est parfois difficile. De plus, la proportion de bactéries cultivées, au sein du rumen, oscille entre 10 et 50% (Hespell *et al.*, 1997). De ce fait, ces techniques n'ont permis de mettre en évidence qu'une partie de la biodiversité existante. Les nouvelles technologies de biologie moléculaire permettent de pallier ce problème en mettant en évidence une diversité beaucoup plus importante que celle obtenue avec les techniques culturales (Stahl *et al.*, 1988; Pace, 1997). Dans la suite de ce chapitre, nous détaillerons ces techniques de biologie moléculaire : principe, méthodologie, avantages et limites.

4.1 Le choix du gène

Les techniques moléculaires d'études des communautés bactériennes sont basées sur l'amplification ou l'hybridation d'un gène cible. L'ADNr 16S, codant pour la petite sous unité ribosomale, est le plus utilisé. Ce gène est dit universel, il est présent chez tous les procaryotes. Ceci représente un avantage certain pour la réalisation d'analyses phylogénétiques. Cependant, l'utilisation de l'ADNr 16S présente certains inconvénients. En effet, au sein d'une même espèce bactérienne il peut y avoir plusieurs copies de cet ADN. Ces copies peuvent être hétérogènes entre elles (Klappenbach *et al.*, 2001; Shimizu *et al.*, 2001), compliquant ainsi l'analyse de la diversité dans des banques de clones ou des profils de fingerprint. Il a également été montré, que dans certains cas, les séquences d'ADNr 16S n'étaient pas assez divergentes pour permettre, la distinction d'espèces bactériennes proches, appartenant au même genre (Normand *et al.*, 1996; Qi *et al.*, 2001). L'ADNr 23S peut également être utilisé pour étudier la diversité de communautés bactériennes. Cependant, comme l'ADNr 16S, le 23S ne permet pas toujours la distinction d'espèces proches (Momol *et al.*, 1998). De plus, dans les banques de données, il existe moins d'informations pour l'ADNr 23S que pour le 16S. Ceci représente un inconvénient pour l'identification d'espèces bactériennes (Gutell *et al.*, 1994). Les séquences intergéniques (ITS) présentes entre les ADNr

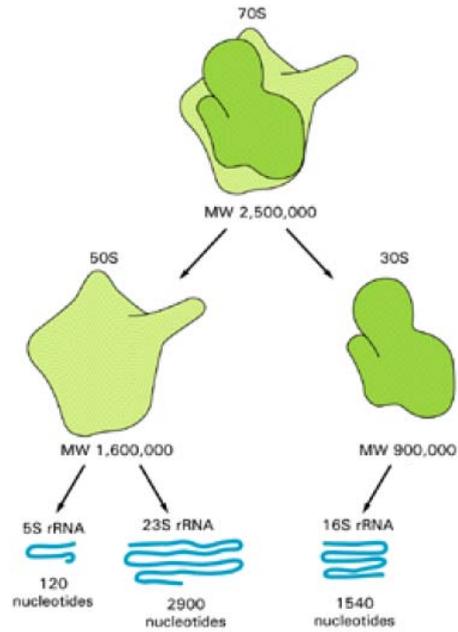


Figure 6. Schéma de l'ADN ribosomal (ADNr) chez les procaryotes.

ITS= séquences intergéniques.

16S= gène codant l'ARNr de la petite sous unité ribosomique.

23S et 5S= gènes codant la grosse sous unité ribosomique.

16S et 23S ou entre les ADNr 23S et 5S (Figure 6) peuvent également être utilisées pour caractériser la diversité de communautés bactériennes. L'ITS 16/23S a été beaucoup plus étudiée que l'ITS 23/5S. Ces régions sont extrêmement variables en taille et en séquence et permettent donc la distinction d'espèces bactériennes très proches (Otten & De Ruffray, 1996; Otten *et al.*, 1996; Garcia-Martinez *et al.*, 1999). Cependant, dans les bases de données, le nombre de séquences disponibles est moins important que pour l'ADNr 16S, limitant, comme pour le 23S, les analyses phylogénétiques. Ainsi, au niveau de l'ADNr, ce sont surtout l'ADNr 16S et la séquence intergénique 16/23S qui sont utilisés pour l'étude de la diversité.

D'autres gènes comme *rpoB*, codant pour la sous unité β de l'ARN polymérase, peuvent également être utilisés pour caractériser la diversité de communautés bactériennes (Dahllof *et al.*, 2000; Qi *et al.*, 2001; Case *et al.*, 2007). Chez les procaryotes ce facteur permet à l'ARN polymérase de se fixer de façon spécifique sur ses promoteurs. Le gène *rpoB* est présent en une seule copie au niveau du génome bactérien, et montre aussi une meilleure discrimination entre espèces que l'ADNr 16S (Qi *et al.*, 2001; Case *et al.*, 2007). L'inconvénient de ce gène est qu'aujourd'hui, il existe peu de séquences dans les banques de données. Ceci représente une limitation certaine lorsqu'il s'agit d'identification d'espèces.

D'autres gènes codant des fonctions définies, comme l'assimilation du nitrate (*nasA*) ou encore l'oxydation de l'ammoniac (*amoA*), peuvent également être utilisés pour caractériser la diversité bactérienne. La discrimination s'effectuera alors selon des groupes bactériens fonctionnels.

4.2 Les biais dus à l'extraction et à la PCR

Différentes méthodes d'extraction d'ADN ou d'ARN utilisées pour un même échantillon ne conduisent pas forcément à l'obtention d'une même diversité bactérienne (Martin-Laurent *et al.*, 2001; Stach *et al.*, 2001). Il est donc important de choisir la méthode d'extraction en fonction de la communauté microbienne en question, et de contrôler son efficacité et sa reproductibilité.

Quel que soit le gène ciblé, l'amplification par PCR représente également un biais dans l'analyse de la diversité d'une communauté microbienne. De ce fait, toutes les techniques basées sur la PCR (clonage, séquençage et fingerprint) sont sujettes à ce biais. En effet, il a été démontré que les microorganismes dont la proportion relative ne dépassait pas les 0.1% n'étaient pas détectés par des techniques dépendantes de la PCR utilisant des amorces universelles (Muyzer *et al.*, 1993; Casamayor *et al.*, 2000). De même, d'autres travaux ont

permis d'observer que l'amplification du matériel génétique de l'échantillon est réalisée au cours des 5 ou 6 premiers cycles PCR (Kurata *et al.*, 2001). Les cycles suivants ne font que réamplifier les fragments PCR obtenus dans les cycles précédents. Ceci implique que les séquences présentes dans l'échantillon en de nombreuses copies et pour lesquelles les amorces ont une forte complémentarité sont amplifiées préférentiellement (Dahllof, 2002). La température d'annealing des amorces (température optimale d'hybridation des amorces) joue également sur la mise en évidence de la diversité. Une température basse diminuera la spécificité des amorces et permettra donc de mettre en évidence une diversité plus importante, mais augmentera également le risque d'avoir des séquences non voulues. L'utilisation d'amorces dégénérées peut aussi permettre de mettre en évidence une diversité plus large, mais leur utilisation dans le cadre d'électrophorèse à double gradient (comme la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) génère des doubles bandes et donne donc une fausse image de la diversité réelle (Dahllof, 2002). La PCR ne permet donc pas de mettre en évidence les populations bactériennes minoritaires.

L'extraction d'ADN ou d'ARN et la PCR sont donc deux étapes pouvant introduire des biais dans l'analyse de la diversité d'une communauté microbienne.

4.3 Les techniques de fingerprint

L'avantage majeur des techniques de fingerprint est qu'elles permettent d'obtenir une « image » de la diversité d'une communauté bactérienne. De plus, elles rendent possible l'analyse simultanée de plusieurs échantillons. Ces techniques comportent une étape d'amplification de l'ADN par PCR. Comme nous l'avons vu précédemment, elles sont donc sujettes aux biais liés à cette étape.

Les techniques comme l'Amplified rDNA Restriction Analysis (ARDRA) et la Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) nécessitent l'utilisation d'enzymes de restriction. Ces outils générant plusieurs bandes pour une seule espèce, la diversité des profils obtenus pour des communautés microbiennes est donc relativement difficile à évaluer. Ces techniques sont plus appropriées pour les criblages de banques de clones ou d'isolats avant séquençage (Dahllof, 2002).

La Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) est une technique où un gène d'intérêt, le 16S par exemple, est amplifié par PCR puis dénaturé pour obtenir de l'ADN simple brin. Ces fragments sont ensuite séparés par électrophorèse non dénaturante. Durant

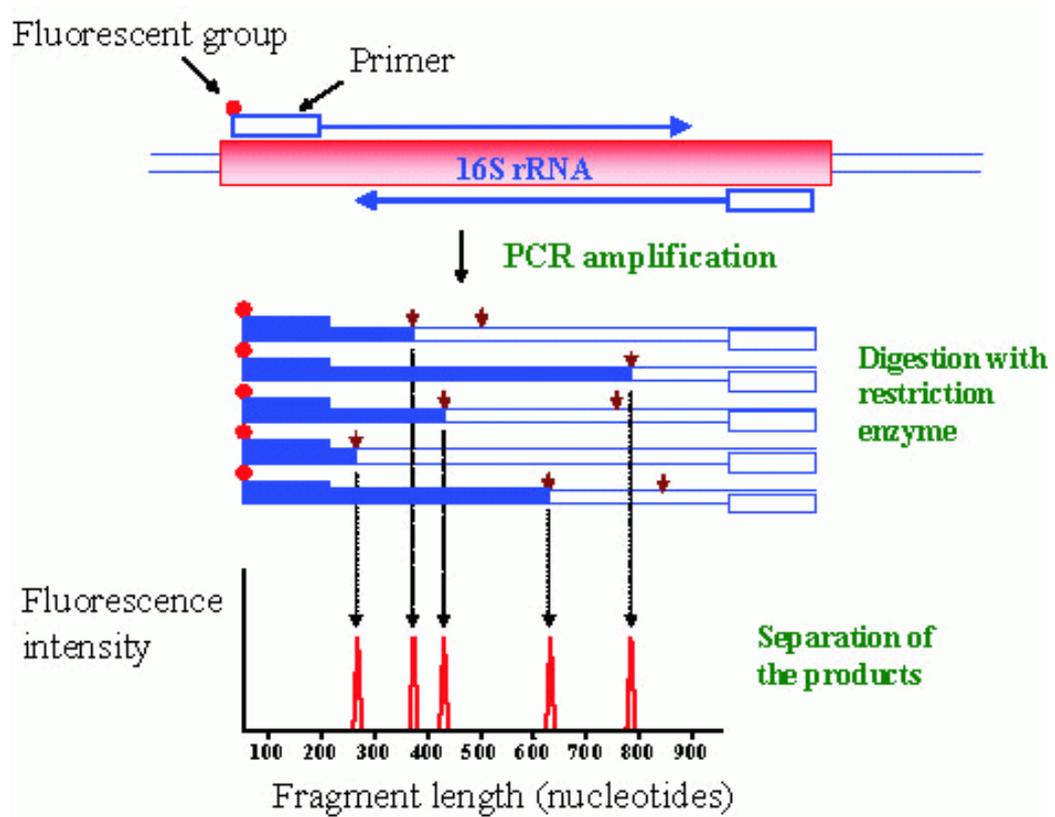


Figure 7. Principe de la Terminal-Restriction Length Polymorphism (T-RFLP).

(Internet, 5 mars 2008, <http://t-rfpred.sourceforge.net/method>)

l'électrophorèse, les ADN simple brin migrent en prenant une conformation caractéristique de leur séquence. Cette forme détermine le niveau de mobilité de la molécule dans le gel. Un changement de bases peut entraîner une modification de conformation conduisant à des migrations différentes au sein d'un même gel. Le plus gros désavantage de la SSCP est son manque de résolution qui peut aller de 50% (Liu *et al.*, 1996) à 97% en électrophorèse capillaire (Mogensen *et al.*, 2003). Ce manque de sensibilité peut être dû à la taille des produits PCR, aux conditions électrophorétiques (notamment la température), à la concentration en ADN... (Costabile *et al.*, 2006). Cet inconvénient, majeur, peut donc conduire, pour cette technique, à une sous estimation de la diversité d'une communauté bactérienne.

La Terminal-Restriction Length Polymorphism (T-RFLP) est une technique où l'amplification PCR est réalisée avec un jeu d'amorces dont une, celle en 5', est fluorescente. Les fragments ADN obtenus après amplification sont ensuite digérés via des enzymes de restriction. On obtient alors un profil où les différents fragments d'ADN sont séparés en fonction de leur taille. Par laser, seuls les fragments de restriction en position terminal sont visualisés sur le profil (Figure 7). De ce fait, malgré l'utilisation d'enzymes de restriction, une bande correspond à une espèce. Avec les bases de données existantes, il est également possible d'identifier le fragment d'ADN cible et de savoir à quelle espèce bactérienne il correspond. Un autre avantage de la T-RFLP, et plus particulièrement de la T-RFLP en électrophorèse capillaire, est qu'elle possède une résolution et une sensibilité de détection importante par rapport à d'autres techniques comme la SSCP ou encore la DGGE et la TGGE, techniques que nous décrirons plus tard (Dahllof, 2002; Nocker *et al.*, 2007). L'inconvénient de cette technique est le choix des enzymes de restriction pour des séquences inconnues. De plus, dans le cas de séquences connues, il a été démontré que pour des espèces bactériennes différentes, des fragments ADN de même longueur pouvaient être obtenus (Marsh, 1999). La diversité représentée par la T-RFLP peut donc, comme dans d'autres techniques, être surestimée.

La Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) est basée sur l'amplification des séquences intergéniques (ITS) localisées entre les ADNr 16S et 23S. Comparés au 16S, les ITS montrent une forte hétérogénéité dans la longueur et la composition nucléotidique des séquences. De ce fait, l'ARISA permet de différencier, plus finement que d'autres techniques de fingerprint basées sur le 16S, deux espèces bactériennes proches

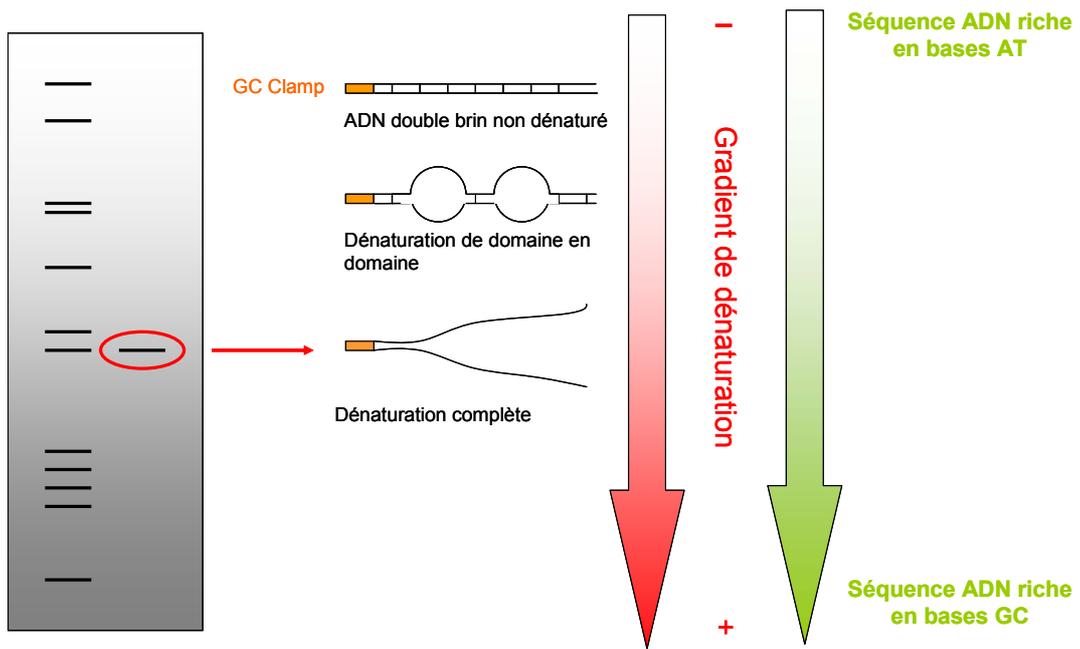


Figure 8. Principe de la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

(Klamer *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2004). Le principal inconvénient de cette technique est que la longueur des ITS varie au sein d'une même espèce (Nagpal *et al.*, 1998), et que de ce fait, un organisme peut conduire à la détection de plus d'une bande. Les techniques comme la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ou la Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) n'utilisent pas d'enzymes de restriction. Les produits PCR sont séparés sur gel selon un gradient de dénaturation ou de température (Figure 8). Une séquence de quarante paires de bases, riche en bases G et C, appelée GC Clamp, peut être placée à une des extrémités des fragments ADN amplifiés. Le GC Clamp permet une meilleure distinction entre deux séquences bactériennes proches (Sheffield *et al.*, 1989). Les bandes générées peuvent ensuite être excisées et séquencées. Ces techniques sont moins résolutive que la T-RFLP (Horz *et al.*, 2001) ou l'(A)RISA et sont évidemment sujettes aux biais liés à la PCR. De ce fait, une bande ne correspond pas toujours à une Unité Taxonomique Opérationnelle (UTO) (Sekiguchi *et al.*, 2001). Enfin, avec ces techniques, seulement environ 30 à 40 bandes ou pics (UTO) peuvent être détectées (Loisel *et al.*, 2006). Il y a donc un phénomène de saturation qui ne permet pas une représentation réelle de la biodiversité. Seule la diversité des bactéries majoritaires au sein d'une communauté est ainsi représentée. En DGGE, il est admis que les populations bactériennes dont la proportion relative est inférieure à 1% ne sont pas détectées (Muyzer *et al.*, 1993; Murray *et al.*, 1996; Fromin *et al.*, 2002).

Parmi les techniques de fingerprint qui permettent l'étude de la diversité des communautés bactériennes, la T-RFLP, la SSCP et l'ARISA sont surtout réalisées en électrophorèse capillaire (CE). La CE permet l'étude d'un nombre plus important d'échantillons sans avoir « d'effet gel » pouvant masquer d'autres effets intéressants (Hebenbrock *et al.*, 1995). En revanche, pour la DGGE ou encore la TGGE, la réalisation d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide est encore couramment utilisée. L'étude d'un grand nombre d'échantillons conduit donc à la confection de plusieurs gels dont la reproductibilité est parfois faible (Balogh *et al.*, 2004).

4.4 Les banques de clones

Une autre façon d'analyser la diversité d'une communauté est de créer une banque de clones. Cependant, il a été montré que l'abondance relative des différents groupes phylogénétiques qui composent une communauté, notamment bactérienne, peut changer entre différentes banques générées à partir d'un même échantillon (Leser *et al.*, 2002; Edwards *et*

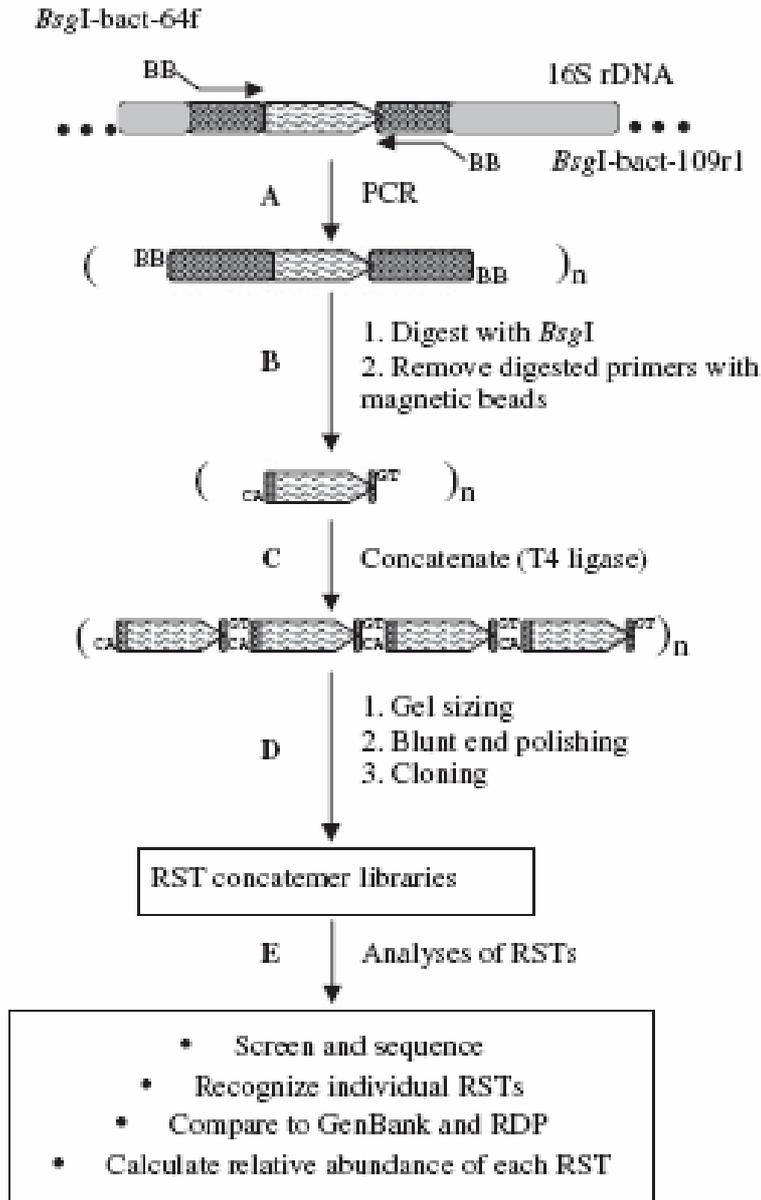


Figure 9. Principe de la Serial Analysis of Ribosomal Sequencing Tags (SARST).

La région V1 de l'ADNr 16S est amplifiée par PCR en utilisant les primer universels. S'en suit une étape d'élongation permettant, au niveau de l'amplifia, d'avoir un site de restriction *BsgI* et une « double biotine » aux extrémités 5'. Une digestion par *BsgI* et une purification sont ensuite réalisées. Les séquences cibles sont liées les unes aux autres et clonées. Ces « chaînes » de séquences, présentes dans les banques de clones, sont ensuite séquencées et comparées à une base de donnée (d'après Yu *et al.*, 2006).

al., 2004). Cette variation entre banques peut s'expliquer par les biais liés à la PCR. De part cette absence de reproductibilité, on peut donc supposer que les banques de clones ne représentent pas forcément la diversité réelle présente dans l'échantillon à analyser. Pour pallier ce problème, il existe des modèles mathématiques permettant de connaître le nombre de clones nécessaires pour estimer la diversité d'une communauté. Les banques de clones permettent donc une bonne analyse de la diversité, cependant leur coût important ainsi que le côté laborieux de leur mise en œuvre font qu'elles sont souvent délaissées au profit de techniques plus accessibles.

La Serial Analysis of Ribosomal Sequencing Tags (SARST) est une technique développée par Neufeld *et al.*, (2004). Cet outil est relativement proche des banques de clones. Les produits PCR issus de l'amplification des régions hypervariables V1 (Neufeld *et al.*, 2004) ou V6 (Kysela *et al.*, 2005) de l'ADNr 16S sont digérés et liés les uns à la suite des autres (Figure 9). Ces « chaînes » de séquences sont ensuite clonées et séquencées. Cette approche, plus économe que les banques de clones, permet pour chaque réaction de séquence d'avoir non pas un, mais plusieurs fragments (jusqu'à dix neuf) d'ADN identifiables (Neufeld *et al.*, 2004). Par cette technique Yu *et al.*, (2006) ont mis en évidence la présence de huit phyla au niveau de la phase solide du rumen contre cinq décrits par les banques de clones (Tajima *et al.*, 1999; Larue *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006). Plus précisément, ces auteurs ont pu identifier 236 phylotypes au niveau de cette phase ruminale (Yu *et al.*, 2006). La SARST semble donc plus avantageuse que les banques de clones. Tout d'abord, par son coût, mais également par la diversité bactérienne qu'elle met en évidence (elle couvrirait environ 99% de la diversité bactérienne ruminale (Yu *et al.*, 2006). Cependant, comme les banques de clone, la SARST est sujette aux biais liés à la PCR. De plus malgré les améliorations en terme de temps et de coût, la SARST reste tout de même une technique fastidieuse pour l'étude simultanée de plusieurs échantillons

4.5 Les pyroséquenceurs

Le pyroséquençage est une technique qui permet un séquençage direct et rapide, sans avoir à passer par le clonage, d'un grand nombre d'échantillons. Cette technique, en ciblant par exemple le gène de l'ADNr 16S, peut permettre de différencier des espèces bactériennes les unes des autres.

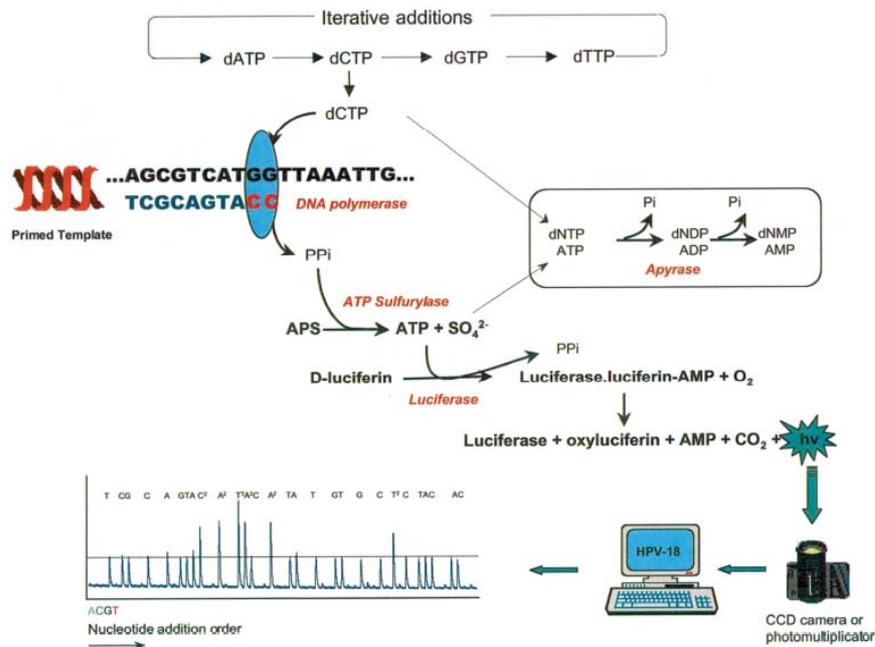


Figure 10. Principe du pyroséquençage (d'après Gharizadeh *et al.*, 2001).

Dans cette réaction, les nucléotides sont ajoutés les uns après les autres. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un PyroPhosphate (PPi). Grâce à une ATP Sulfurylase, ce PPi est transformé en ATP qui est utilisé par une luciférase pour émettre un signal lumineux. Ce signal est ensuite capté par le séquenceur qui le reproduit sous la forme d'un pic sur le pyrogramme.

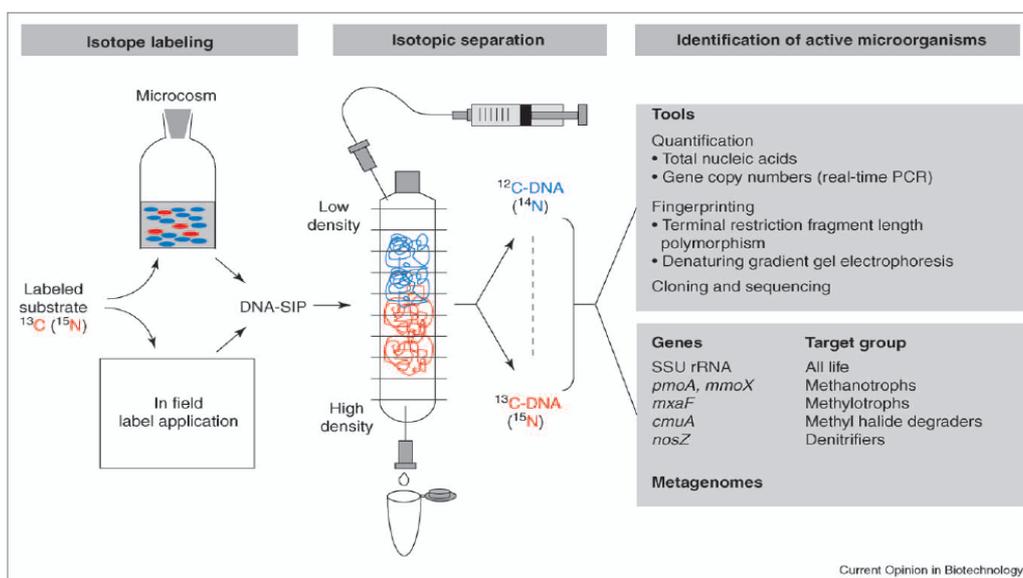


Figure 11. Principe de la Stable-Isotope Probing (SIP).

L'utilisation par certains microorganismes d'un substrat marqué conduit à l'incorporation de ce marqueur, isotope, au niveau de l'ADN microbien. Par centrifugation, un gradient de densité est alors obtenu séparant l'ADN marqué des autres molécules non marquées. Par PCR, séquençage ou technique de fingerprint, les microorganismes présents dans chacune des fractions peuvent être identifiés (d'après Fiedrich, 2006).

Dans un pyroséquençage les nucléotides ne sont pas ajoutés tous ensemble comme dans les réactions de séquence classiques, mais l'un après l'autre. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la Polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un PyroPhosphate. Grâce à une ATP Sulfurylase, ce pyrophosphate est transformé en ATP qui est utilisé par une luciférase pour émettre un signal lumineux. C'est ce signal qui est capté par le séquenceur qui le reproduit sous la forme d'un pic sur le Pyrogramme (Figure 10). La hauteur de ce pic est fonction de l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés en même temps. On peut donc déduire la séquence de la taille des pics obtenus. Par ailleurs, en cas de mélange de nucléotides à une même position (polymorphisme de séquence), la taille des pics permet d'avoir une quantification de la proportion de brins porteurs de l'un ou l'autre des nucléotides (Ronaghi *et al.*, 1996; Ronaghi *et al.*, 1998).

Un des désavantages du pyroséquençage est la limite de longueur de lecture (Ahmadian *et al.*, 2006). Plus précisément, cela signifie que plus le produit PCR est long, plus le séquençage, en entier, de ce dernier, sera difficile. Dans sa revue de synthèse Ronaghi (2001) évoque une longueur, du gène codant l'ADNr 16S, de 20 à 100 nucléotides pour distinguer différents groupes taxonomiques bactériens. Ces séquences, relativement courtes, peuvent, par la suite, limiter de potentielles études phylogénétiques. Une autre limite de cette technique est liée à la performance des quatre enzymes utilisées lors de la réaction : l'ADN Polymerase I, l'ATP sulfurylase, la Luciférase et l'Apyrase. Au cours du temps l'ajout dans le milieu réactionnel de nucléotides diminue cette activité enzymatique. Cette chute de l'activité enzymatique a évidemment des répercussions sur la longueur de lecture (Ronaghi, 2001).

4.6 Les isotopes stables

La stable-isotope probing (SIP) est une technique permettant l'identification, dans leur milieu naturel, des microorganismes selon leur fonction. Cet outil est basé sur l'incorporation d'un isotope stable dans les molécules d'ADN des microorganismes consommant un substrat marqué par ce même isotope. L'isotope le plus couramment utilisé est le C^{13} , mais d'autres isotopes comme le N^{15} ou le O^{18} peuvent également être utilisés (Friedrich, 2006; Schwartz, 2007). Par centrifugation un gradient de densité est obtenu, permettant ainsi d'isoler l'ADN des microorganismes ayant incorporé l'isotope (ex : C^{13}) du reste de la communauté non marquée (ex : C^{12}) (Figure 11) (Radajewski *et al.*, 2000). L'identification de ces microorganismes marqués, caractéristiques d'une fonction spécifique, peut se faire ensuite via

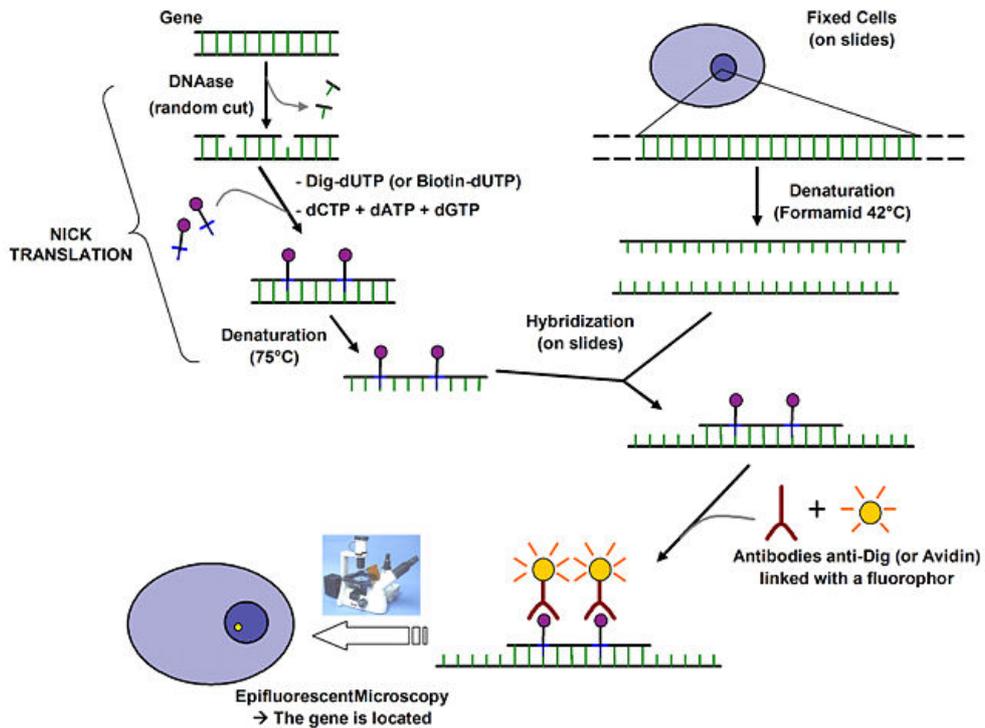


Figure 12. Principe de la Fluorescent *in situ* hybridisation (FISH).

(Internet, 10 mars 2008, http://fr.wikipedia.org/wiki/Hybridation_fluorescente_in-situ).

Obtention d'une sonde marquée par Nick Translation, hybridation *in situ* avec l'ADN dénaturé puis traitement avec des anticorps fluorescents pour localiser le gène d'intérêt au microscope à épifluorescence.

la PCR, le séquençage ou les techniques de fingerprint (DGGE et T-RFLP) (Friedrich, 2006). Cette dernière étape peut également être réalisée sur la fraction non marquée pour identifier le reste de la communauté. Le succès de la SIP-ADN dépend du degré d'enrichissement en isotope de l'ADN. Certains facteurs sont capables d'influencer cet enrichissement, comme les voies anaboliques effectives, la capacité de la cellule à assimiler le substrat, la durée d'exposition au marqueur, le taux de synthèse de l'ADN par les microorganismes de la communauté... (Lueders *et al.*, 2004). L'ARN, peut également être utilisé en SIP. On parle alors de SIP-ARN. Selon Manefield *et al.*, (2002), cette technique est plus sensible que la SIP-ADN. En effet, dans les cellules actives, la synthèse de l'ARN se produit à un taux élevé. L'ARN est donc marqué plus rapidement que l'ADN (Manefield *et al.*, 2002). L'inconvénient de cette technique est que la densité de l'ARN est différente de celle de l'ADN. Ainsi le gradient de densité peut contenir parfois jusqu'à vingt fractions (contre deux pour l'ADN) rendant alors difficile l'analyse de la diversité de l'ARN marqué (Manefield *et al.*, 2002). Pour pallier ce problème, une Retro Transcription PCR (RT-PCR) ainsi qu'une DGGE sont nécessaires pour chacune des fractions (Manefield *et al.*, 2002). Malgré sa sensibilité plus importante, la SIP-ARN semble donc plus contraignante que son homologue utilisant l'ADN.

4.7 L'hybridation

Le FISH ou fluorescent *in situ* hybridisation est une méthode qui permet par le biais de sondes fluorescentes de détecter la présence de séquences ADN spécifiques (Figure 12). Le FISH possède l'avantage de pouvoir détecter la présence de bactéries cibles dans leur milieu naturel. L'utilisation de différentes sondes fluorescentes de couleurs différentes selon leurs spécificités, permet l'identification et la quantification de plusieurs populations bactériennes au sein d'un même échantillon. Le principal inconvénient de cette technique est la dépendance vis à vis des banques de données. En effet, le choix des sondes détermine les bactéries cibles et de ce fait la quantification d'une espèce inconnue est impossible (Zoetendal *et al.*, 2004). Un des autres inconvénients du FISH est qu'il faut un nombre de copies relativement important du gène cible pour qu'il soit détecté.

Les puces à ADN sont également basées sur une technique d'hybridation. Immobilisées sur un support solide (matrice), des sondes (oligonucléotides longs ou produits PCR) spécifiques de différents gènes, permettent de détecter des cibles complémentaires marquées et présentes dans le mélange à analyser. Les signaux d'hybridation sont détectés selon le type

Fluorescence-Detection DNA Chip

The four bases A, T, G, and C bind A to T or G to C. A target DNA sequence is analyzed by checking which bases the target DNA bases bind.

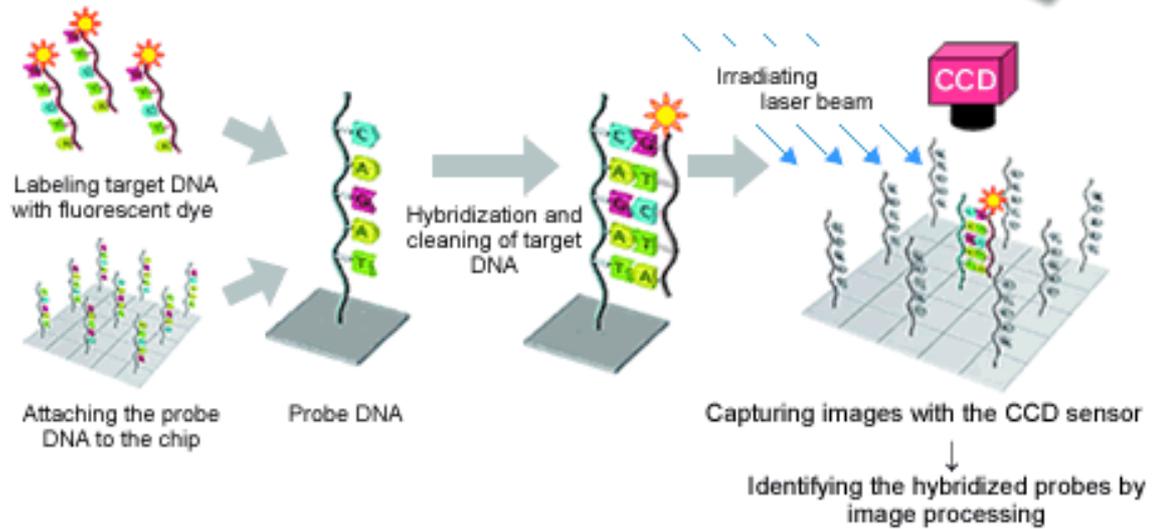


Figure 13. Principe des puces à ADN de détection.

(Internet, 11 mars 2008, http://museum.toshiba.co.jp/05human/images/12_02.gif).

de marquage par mesure radiographique ou par fluorescence et quantifiés. Les puces à ADN permettent l'identification d'une espèce microbienne ou d'un groupe fonctionnel sans avoir à passer par le séquençage (Figure 13). Cette technique nécessite encore quelques mise au point, mais en terme de détection elle s'avère être plus sensible que celles utilisant des gels comme, par exemple, la DGGE (Call *et al.*, 2001). L'inconvénient majeur des puces à ADN est qu'elles ne permettent pas l'identification des microorganismes inconnus. Cette technique, comme beaucoup d'autres, ne permet donc pas de mettre en évidence la diversité réelle.

Pour conclure, par rapport aux techniques culturales, les techniques liées à la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence une diversité plus importante, notamment en détectant les bactéries non cultivables. Cependant, aujourd'hui, principalement de part les biais liés à l'extraction d'ADN et à la PCR, il n'existe pas encore de techniques capables de détecter l'ensemble de la diversité existante dans un échantillon donné. De plus, comme nous venons de le voir, les différentes techniques de biologie moléculaire n'étudient pas la diversité de la même façon. Il semble donc important en fonction des objectifs établis de choisir l'outil adapté. En effet, les techniques de fingerprint permettent de comparer la diversité de plusieurs échantillons simultanément, mais elles ne conduisent pas à l'identification des microorganismes en présence. La réalisation de cette dernière étape nécessite l'utilisation d'outils tels que les banques de clones. La diversité fonctionnelle peut également être étudiée, pour cela, des techniques comme les puces à ADN ou encore la SIP sont requises.

Conclusions bibliographiques et objectifs

Au niveau du rumen, il est connu que les populations bactériennes du contenu sont affectées par certains facteurs (alimentaires et/ou microbiens). L'ensemble de ces modifications peut conduire à une modification de la diversité entraînant la perte de certaines fonctions bactériennes primordiales pour un fonctionnement optimal du rumen. La santé de l'animal peut s'en trouver affectée. A titre d'exemple, la distribution de régime contenant de fortes proportions de céréales peut entraîner un déséquilibre des populations bactériennes du contenu ruminal aboutissant à l'apparition de troubles digestifs tels que l'acidose. Les bactéries intimement attachées à la paroi du rumen, troisième communauté bactérienne du rumen, sont beaucoup moins importantes, en terme de biomasse, que celles du contenu ruminal. Ces bactéries auraient toutefois des caractéristiques physiologiques particulières permettant un bon fonctionnement du rumen en favorisant le recyclage de l'urée, le maintien de l'intégrité de l'épithélium et de sa capacité d'absorption, et les conditions d'anaérobiose. On peut penser qu'une variation de la diversité au niveau de la communauté épimurale pourrait modifier l'ensemble de ces processus avec des conséquences sur le fonctionnement global du rumen. Cependant, comme l'a montré notre synthèse bibliographique, les informations à notre disposition sur cette communauté ne permettent pas de statuer sur cette dernière supposition. En outre, les études disponibles sont anciennes et basées sur l'utilisation de techniques culturales qui donnent une image restreinte de la diversité existante car elles ne prennent pas en compte les bactéries non cultivables.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui a comme **objectif principal une meilleure connaissance de la diversité de la communauté épimurale et de ses facteurs de variation**. L'originalité de notre approche a été d'utiliser des **techniques de biologie moléculaire** qui permettent une observation plus précise de la diversité bactérienne en prenant en compte les bactéries non cultivables. Nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser une technique de fingerprint afin de pouvoir comparer la diversité bactérienne de plusieurs échantillons en même temps. Parmi les techniques existantes, nous avons opté pour la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (**DGGE**) du fait : 1) du nombre de données publiées à notre disposition, au démarrage de ce travail. Les informations disponibles sur cette technique étaient alors plus importantes que pour d'autres outils comme la TGGE ou encore la T-RFLP ; 2) de sa facilité de mise en œuvre, ainsi que sa bonne résolution sur gel. Les **banques de clones** ont également été utilisées pour la caractérisation de la composition de la communauté épimurale. Dans ce manuscrit les termes employés pour parler de diversité ne seront pas les mêmes selon la technique utilisée. En effet, on évoquera la diversité au travers

Tableau 1. Récapitulatif des différentes expérimentations réalisées.

Expérimentations	Publications	Animaux	Régimes	Facteurs de variation étudiés	Mesures	Techniques
Expérimentation 1	Publication 1	Agneaux, n=8	100% foin	Régime alimentaire	Bactéries (IB*, structure)	PCR-DGGE
		en lot	20% foin / 80% blé	Site de prélèvement épithélial	Bactéries (fonction d'oxydation de l'ammoniac)	PCR/amorces spécifiques
Expérimentation 2	Publication 2	Taurillons, n=24	44% foin / 43% maïs / 13% tourteau de soja	Régime alimentaire	Bactéries (IB, structure)	PCR-DGGE
		en lot	58% ensilage de maïs / 24% maïs / 18% tourteau de soja	Site de prélèvement épithélial	Protozoaires (dénombrement)	Comptage sous loupe binoculaire
			7% paille / 67% maïs / 25% tourteau de soja		pH et Paramètres fermentaires (AGV, NH3, Lactate)	Chromatographie phase gazeuse, colorimétries, méthode enzymatique...
Expérimentation 3	Publication 3	Moutons, n=8	100% foin	Régime alimentaire	Bactéries (IB, structure, composition)	PCR-DGGE, banques de clones
	Publication 4	en lot	35% foin / 65% blé	Retour à l'état initial Evolution temporelle	Protozoaires (dénombrement) pH et Paramètres fermentaires (AGV, NH3, Lactate)	Comptage sous loupe binoculaire Chromatographie phase gazeuse, colorimétries, méthode enzymatique...
Expérimentation 4		Moutons, n=5	75% foin / 25% maïs	Avec ou sans protozoaires	Bactéries (IB, structure) pH et Paramètres fermentaires (AGV, Lactate)	PCR-DGGE Chromatographie phase gazeuse, méthode enzymatique...

*IB : Indices de Biodiversité

de notions **d'indices de biodiversité** ou encore de **structure** (cluster, test de permutation) pour la DGGE, et de **composition** pour les banques de clones.

La première étape de ce travail a été d'étudier la **répartition de la diversité de la communauté épimurale au niveau de l'épithélium ruminal**. Ceci a été réalisé sur ovins et bovins abattus, sur lesquels la diversité de la communauté épimurale a également été observée en fonction de différents régimes alimentaires plus ou moins riches en céréale.

La deuxième étape de notre travail a été réalisée sur animaux vivants. Elle consistait en l'observation sur un même individu de **l'évolution de la diversité de la communauté épimurale en fonction du temps (sur plusieurs mois), du régime (\pm de céréale) ou de la composition de l'écosystème microbien ruminal (\pm de protozoaires)**.

Enfin, la dernière étape de notre étude a été la **caractérisation en terme de composition** (banques de clones) et **de fonctions** (PCR, amorces spécifiques) de la communauté épimurale. Dans toutes les expérimentations réalisées au cours de cette thèse, les communautés bactériennes du contenu ruminal (phase liquide et solide) ont été étudiées en parallèle de la communauté épimurale. Etant mieux connues, elles nous ont permis de valider ou non les résultats obtenus sur les bactéries attachées à la paroi du rumen.

Le travail expérimental de cette thèse est divisé en cinq chapitres (Tableau 1):

- Chapitre 1 : Effet du site de prélèvement épithélial et du régime alimentaire sur la diversité des communautés bactériennes du rumen chez des animaux en croissance. Cette partie comporte deux études, une sur agneaux (expérimentation 1 ; publication 1), et l'autre sur taurillons (expérimentation 2 ; publication 2).
- Chapitre 2 : Effet du régime alimentaire sur la diversité des communautés bactériennes du rumen chez des moutons adultes. Dans ce chapitre, l'évolution temporelle de la diversité de ces mêmes communautés a également été observée (expérimentation 3 ; publication 3).
- Chapitre 3 : Effet de la présence de protozoaires sur la diversité des communautés bactériennes du rumen chez des moutons adultes (expérimentation 4).
- Chapitre 4 : Caractérisation de la composition bactérienne de la communauté épimurale (expérimentation 3 ; publication 4).

- Chapitre 5 : Mise en évidence d'une fonction bactérienne au niveau de la communauté épimurale (expérimentation 1).

Etudes expérimentales

Chapitre expérimental 1

Effet du site de prélèvement épithélial et du régime alimentaire sur la diversité des communautés bactériennes du rumen chez des animaux en croissance

Publication 1

PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium

(Animal 1, 939-944)

PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier and D.P. Morgavi

INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Corresponding author: D.P. Morgavi. E-mail: morgavi@clermont.inra.fr

Running headline: Diversity of epithelium-attached rumen bacteria

Abstract

Bacteria attached to the rumen epithelium (or epimural community) are not well characterized and their role on rumen functioning is not totally understood. There is just one published report of a clone library from one cow that suggests that this epimural community differs from the bacteria associated with the rumen digestive contents. However, this time-consuming approach is not adapted for examining microbial population changes in groups of animals. In *in vivo* studies, when samples from several animals have to be analyzed simultaneously, a simpler technique has to be used. In this study a genetic fingerprinting technique, PCR-DGGE, was used to characterize the structure of the bacterial population attached to the rumen epithelium. This community was compared to that present in the solid and liquid phases of rumen content under two contrasting diets.

Rumen samples were obtained from four forage-fed and four high concentrate-fed (80:20, wheat grain:hay) five-month old lambs. After slaughter, samples from five epithelial sites and the solid and liquid digesta phases were taken for DNA extraction and analysis. Bacterial communities were profiled by PCR-DGGE using bacterial specific 16S rDNA primers. The fingerprints' analysis revealed that the epithelial community differed from those of rumen content in both diets. As expected, the nature of the feed influenced the bacterial communities from the solid and liquid rumen phases but no diet effect was observed in the rumen epithelial profiles suggesting a strong host effect on this bacterial population. Additionally, no differences were observed among the five epithelial sampling sites taken from each animal. The profile of the bacterial population attached to the rumen epithelium presented a high inter-animal variation, whether this difference has an influence in the function of this community remains to be determined.

Keywords Rumen bacteria, bacterial epimural community, diversity, DGGE

Introduction

Ruminants harbor symbiotic microbes in their gastrointestinal tract that are essential for the host animal development and adaptation to the environment. Among the different groups of microbes inhabiting the ruminant's forestomach, bacteria are the most diverse and play an indispensable role in health and nutrition. In the rumen, three different subpopulations of bacteria can be distinguished based on their localization: i) a planktonic population composed of bacteria free in the rumen fluid; ii) a population attached to feed particles; and iii) a population attached to the rumen epithelium (Cheng & Costerton, 1986). The latter is also known as the bacterial epimural community (**BEC**) (Mead & Jones, 1981). This community has been less studied than the others, probably because it represents less than 1% of the total ruminal microbial biomass (Czerkawski, 1986a) and its contribution to the rumen capacity to ferment feeds is relatively minor. However, the BEC plays an important role in the hydrolysis of systemic urea that diffuses from the blood across the rumen wall (Wallace *et al.*, 1979) and, consequently, on N metabolism. Tissue recycling and oxygen scavenging are other functions that have also been attributed to BEC (Cheng *et al.*, 1979).

The BEC was mainly described in the 1970s and 1980s using microscopy and cultural techniques (Bauchop *et al.*, 1975; Wallace *et al.*, 1979; McCowan *et al.*, 1980; Dehority & Grubb, 1981). These phenotype-based techniques underestimate biodiversity since they do not take into account the uncultured bacteria and do not discriminate between genetically close species. This perhaps offers an explanation for the contradictory results reported in some earlier studies describing BEC as either specific to the rumen epithelium (McCowan *et al.*, 1980) or similar to that found in rumen contents (Dehority & Grubb, 1981; Mead & Jones, 1981). The advent of genetic techniques has revealed an extensive microbial diversity that was previously undetected with culture-dependent methods (Stahl *et al.*, 1988; Pace, 1997). Indeed, recent work using cloning and sequencing has shown both the diversity of the BEC and its differences with the population present in rumen contents (Cho *et al.*, 2006). The clone library approach, preferred by some researchers because it allows the genotypic identification of bacterial species is; however, fastidious and not adapted for monitoring temporal and/or diet-induced changes in the rumen microbial population when groups of animals are used. Fingerprint profiles analyses based on 16S rDNA sequences are currently the techniques more adapted to study bacterial communities. In addition to their relative ease

of implementation and the ability to compare several samples, these techniques are promoted as better estimators of biodiversity (Pedros-Alio, 2006).

Diet is a major factor influencing the structure and function of the rumen microbial population. The nature of feeds, as well as the physico-chemical changes induced by their fermentation, is known to favor the development of certain functional microbial ecotypes in the rumen solid and liquid phases (Martin *et al.*, 2002). However, it is not well known whether the same types of changes are also true for BEC. In this work, we tested the effect of diet (forage *vs.* concentrate) on the structure of the bacterial population attached to the rumen epithelium using a genetic fingerprinting technique, 16S rDNA PCR-DGGE. The effect of localization within the rumen was evaluated at the same time, with comparison of the BEC to the bacterial communities present in the solid and liquid phases of rumen contents.

Materials and methods

Animals and feeds

Eight five-month old lambs, four males and four females, of similar genetic composition (stock INRA 401) were used in this study. The lambs were allotted into two homogenous groups, based on body weight and sex, which were fed forage (**F**, 100% alfalfa hay) or a high concentrate (**HC**, 80% cracked wheat and 20% alfalfa hay; DM basis) diet. Feeds were offered once daily at 0800 h for *ad libitum* intake. Animals were housed in individual pens with free access to fresh water and a mineral salt mix. At the start of the experiment, average body weight was 29.5 ± 2.8 kg and 29.5 ± 2.4 kg for the F and HC groups, respectively. Animals were slaughtered at a similar body weight of 38.8 ± 1.3 kg and 39.8 ± 1.3 kg after 5 and 4 weeks of feeding the F or HC diet, respectively. Animals were cared for in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous 1988).

Sampling of rumen epithelium and rumen content

Lambs were slaughtered at INRA-Theix's experimental abattoir. The entire gastrointestinal tract was removed immediately after slaughter and samples from the epithelium were taken from 5 reticulorumen locations considered representative of the bacterial diversity present on the rumen wall (Mead & Jones, 1981). These sites were the roof of the dorsal sac at the point where the cranio-caudal and left-right axes meet (**DS1**), the roof of the dorsal sac at a caudal position (**DS2**), the floor of the caudal sac (**CS**), the floor of the ventral sac (**VS**), and the right lateral area (**LA**) at the point where the cranio-caudal and dorso-ventral axes meet. Samples

were taken with the help of a biopsy punch (diameter 8 mm), washed with sterile phosphate-buffered saline (**PBS**) 0.01 mol/l, pH 6.8, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. The time elapsed between slaughter and collection of samples was less than 10 min in order to minimize postmortem changes in the tissue and related possible changes in the BEC (Bauchop *et al.*, 1975; Mead & Jones, 1981).

In addition to rumen epithelium, the liquid (**LP**) and solid (**SP**) rumen content phases were also sampled. The removed reticulorumens were cut open with the help of a sterile scalpel and contents were thoroughly mixed with an alcohol-sterilized spatula. Approximately 300 g of mixed rumen contents were filtered through a polyester monofilament fabric (250 μm mesh aperture). One-ml aliquots of the filtrate (LP) were dispensed in microtubes, centrifuged ($10000 \times g$, 10 min, 4°C), the supernatant removed, and the pellet was stored at -80°C . The retentate (SP) was washed with 50 ml of PBS, filtered as above, and stored at -80°C .

DNA extraction and PCR amplification

Total DNA was extracted from samples as described by Yu and Morrison (2004). A method specifically developed for the extraction of bacterial DNA from gastrointestinal tissues was also tested for the epithelial samples (Roussel *et al.*, 2005). This method gave similar results in term of yield and DGGE fingerprint profiles to those obtained with the method of Yu and Morrison (2004), developed for gastrointestinal contents, and thus all samples were extracted using this latter procedure.

The V3 variable region of the 16S rDNA gene of bacteria was amplified by PCR with primers 341f- ($5' - \text{CCTACGGGAGGCAGCAG} - 3'$) and 534r ($5' - \text{ATTACCGCGGCTGCTGG} - 3'$), the forward primer had a GC clamp at its $5'$ end (Muyzer *et al.*, 1993). The PCR mixture (50 μl) contained $1 \times$ PCR buffer, 1.5 mmol/l MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/l}$ of each dNTP, 0.25 $\mu\text{mol/l}$ of each primer and 2.5 U HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). Touchdown PCR was performed with an initial denaturation step of 95°C for 15 min; followed by 10 touchdown cycles of 94°C for 30 s, 61°C ($-0.5^{\circ}\text{C}/\text{cycle}$) for 30 s, and 72°C for 1 min; followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and a final elongation step of 72°C for 30 min to eliminate artifactual double bands (Janse *et al.*, 2004).

All PCR products were analyzed by electrophoresis on 2 % agarose gels containing ethidium bromide to check their size and estimate their concentration using a Low DNA Mass Ladder

(Invitrogen, Carlsbad, USA) and an imaging system (Chemimager; Alpha Innotech, San Leandro, USA).

DGGE

Polyacrylamide gel at an 8% concentration was prepared with a denaturant gradient between 40% and 60% (urea formamide). One hundred percent denaturant was defined as 7 mol/l urea and 40% (v/v) formamide (Muyzer *et al.*, 1993). Approximately 100 ng of PCR product were applied per well. Gel was submerged in $0.5 \times$ TAE buffer (40 mmol/l Tris base, 40 mmol/l glacial acetic acid, 1 mmol/l EDTA) and electrophoresed for 5 h at 60°C using a fixed voltage of 200 mV in a DGGE-2001 (CBS Scientific Co, Solana Beach, USA). Gels were silver stained using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Due to the large number of samples, several gels were required to carry out the analysis. In order to normalize for differences between gels a PCR product from a rumen sample was used on every gel (two lanes per gel) and the profile of this used as a standard during gel normalization and analysis. The percentage of similarity between gels' standards was 77.5 ± 10.6 (mean \pm SD).

DGGE Gel analysis

Gel images were acquired using an optical density calibrated scanner (ImageScanner, GE Healthcare, Piscataway, USA) at a spatial resolution of 400 dpi and each band was considered an operational taxonomical unit (OTU). Images were analysed using ImageQuant TL software (GE Healthcare, Piscataway, USA) and GelCompar II version 4.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). ImageQuant TL was used to quantify the banding profiles within each profile by determining the total number of bands (S), the peak surface of each band (n_i) and the sum of all the peak surfaces of all bands (N) (Fromin *et al.*, 2002). This information was used to calculate the community biodiversity using three indices: i) the Shannon's index (H) calculated with the formula $H = - \sum (n_i/N) \ln (n_i/N)$; ii) the dominance index (c) calculated with the formula $c = \sum (n_i/N)^2$; and iii) the evenness index (e) calculated with the formula $e = H/\ln S$ (Odum, 1971). These indices were then processed by analysis of variance using the MIXED procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA). The statistical model included animal, diet, localization (corresponding to the sampling sites for the rumen epithelium and the nature of the phase for the rumen content), and diet \times localization interaction. Animal within diet was considered as random effect. Because sampling site was not significant for epithelial samples, the data were grouped and compared to the liquid and

Table 1. Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid- and solid-associated bacterial communities

Samples ^a		Diet ^b	Index ^c				
			H	e	c		
Epithelium	F	2.818	cd	0.904	b	0.079	ab
	HC	2.967	ac	0.920	ab	0.062	bc
Liquid phase	F	2.546	d	0.931	ab	0.102	a
	HC	2.776	cd	0.926	ab	0.081	ab
Solid Phase	F	3.294	ab	0.969	a	0.041	c
	HC	3.265	b	0.961	ab	0.044	c
Effect	Localization		***	**		***	
	Diet		NS	NS		NS	
	Localization × diet		NS	NS		NS	

^aMeans of eight lambs for liquid and solid phases (s.e=0.1522, 0.0248, and 0.0126 for H, e, and c, respectively). Means of eight lambs and five sampling sites per animal for epithelial samples (s.e=0.0979, 0.0184, and 0.0073 for H, e, and c, respectively)

^bF=Forage diet; HC=High concentrate diet

^cH=Shannon's index, e=evenness, c=dominance

Within a column, means with different letters are significantly different (P < 0.05)

NS: P>0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001

solid rumen phases using the same model stated above. Effects were declared significant at $P < 0.05$.

GelCompar II was used to normalize and compare all the DGGE profiles using hierarchical clustering to join similar profiles into groups (Fromin *et al.*, 2002). To this end, all the images of DGGE gels were matched using the internal control sample and the bands were quantified after a local background subtraction. A tolerance in the band position of 1% was applied. The similarity among profiles was calculated with the Pearson product-moment correlation coefficient, recommended for the analysis of complex profiles (Savelkoul *et al.*, 1999), and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). A significance test based on pairwise similarity measures was used to compare the community profiles of different groups of samples (Kropf *et al.*, 2004). This permutation test was done using the PROC IML procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA) with 10^5 random permutations and based on the model of Kropf *et al.* (2004), which allows the utilization of more than one gel in the analysis. An additional permutation analysis was also done using the control samples, grouped by gel, to further test whether the effect of gel was significant.

Results

Bacterial diversity of rumen epithelial and rumen content samples

The biodiversity of BEC, as assessed by the indices of Shannon, evenness, and dominance calculated from the DGGE profiles, was not influenced by sampling site or diet (data not shown). There was a non-significant trend for samples taken from the upper part of the rumen to have higher values for the Shannon index than samples taken from the lower part (2.827 vs. 2.531 for DS1 and VS, respectively, $P = 0.16$). The comparison of BEC with the bacterial population of rumen content samples showed differences ($P < 0.01$) for all three indices (Table 1). In contrast there was not effect of diet or diet \times (bacterial population) interaction on these biodiversity indicators. The bacterial population attached to the rumen epithelium had mean values for the index of Shannon and dominance that were halfway of those for the solid and liquid phases of rumen contents. The solid phase had the highest value for the Shannon index and the lowest for the index of dominance.

Effect of localization on the bacterial community structure

Samples were allocated to four DGGE gels. A permutation test that included in the model all electrophoretic runs was used for the comparison of groups of samples. In addition, a

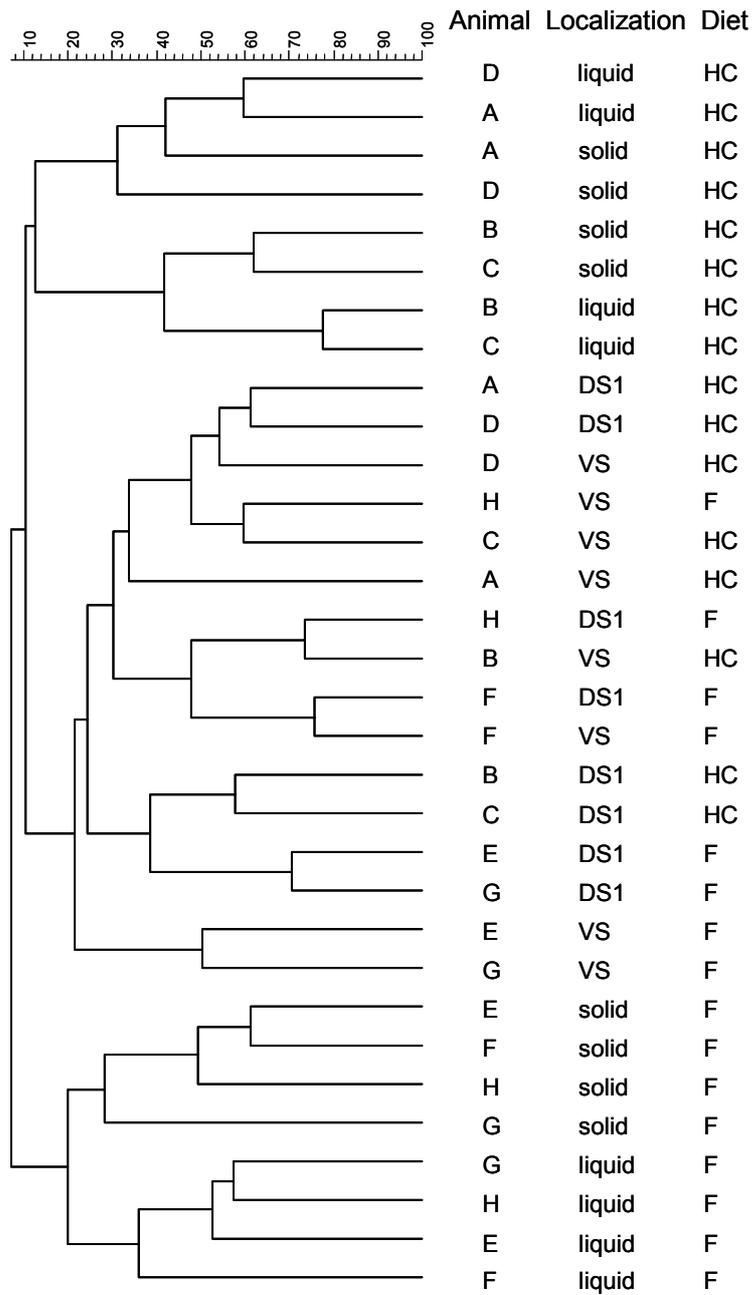


Figure 1. UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles. Samples are from the rumen epithelium ventral and dorsal sacs (VS and DS1) and the rumen liquid and solid phases, taken from eight lambs that received a forage (F) or a high concentrate (HC) diet.

permutation test analysis that considered standard samples from each gel as a group indicated that differences due to electrophoretic run were not significant ($P>0.05$).

Similar to the results obtained using biodiversity indices, the cluster analysis of BEC samples obtained from DGGE profiles indicated no differences in BEC structure associated with sampling site or diet (data not shown). In subsequent analysis, the two sites most different in terms of anatomical localization, *e.g.* VS and DS1, were selected as representatives of the rumen epithelium. When the clustering analysis was applied to rumen content and the selected epithelial samples, the dendrogram topology revealed that epithelial samples were distinctly grouped from the solid and liquid phase samples of rumen contents (Figure 1). The difference between sites is illustrated in Figure 2 using samples from one representative animal fed either F or HC diets as an example. The dendrogram obtained had two main nodes. One of them grouped the rumen content samples of forage-fed animals. This node was further branched at a second level that separated the LP from the SP samples. The other node, which contained the rest of the samples, was subdivided into two groups containing the rumen epithelial samples on one side and the rumen content samples of animals fed the HC diet on the other. Permutation test analysis of this dataset confirmed that BEC consistently differed from the bacterial community associated with the LP and SP samples ($P<0.01$; Table 2) and that the BEC was unaffected by diet, unlike the LP and SP bacterial communities ($P<0.05$; Table 2). The LP and SP samples of forage-fed animals were also significantly different ($P<0.05$). In agreement with the cluster analysis, no distinction was observed in the LP and SP sampled from the HC diet ($P>0.05$).

Discussion

Bacterial diversity plays a central role in the functioning and productivity of microbial ecosystems (Cardinale *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2005). Diversity can be studied by different methods. The construction of clone libraries is a frequently used method but it is less efficient in retrieving the diversity present in complex ecosystems (Pedros-Alio, 2006). In this work, we chose the fingerprinting technique PCR-DGGE, to advance our understanding of some of the parameters that govern the structure of the rumen epimural community and how it is affected by the environment, *e.g.* diet. DGGE analysis clearly showed that the bacterial community attached to the rumen epithelium was i) different from LP and SP bacterial communities present in the rumen and ii) that its structure was not affected by diet or sampling site. This distinction between the bacterial population attached to the rumen wall and those in rumen content is opposed to previous reports that described these populations as

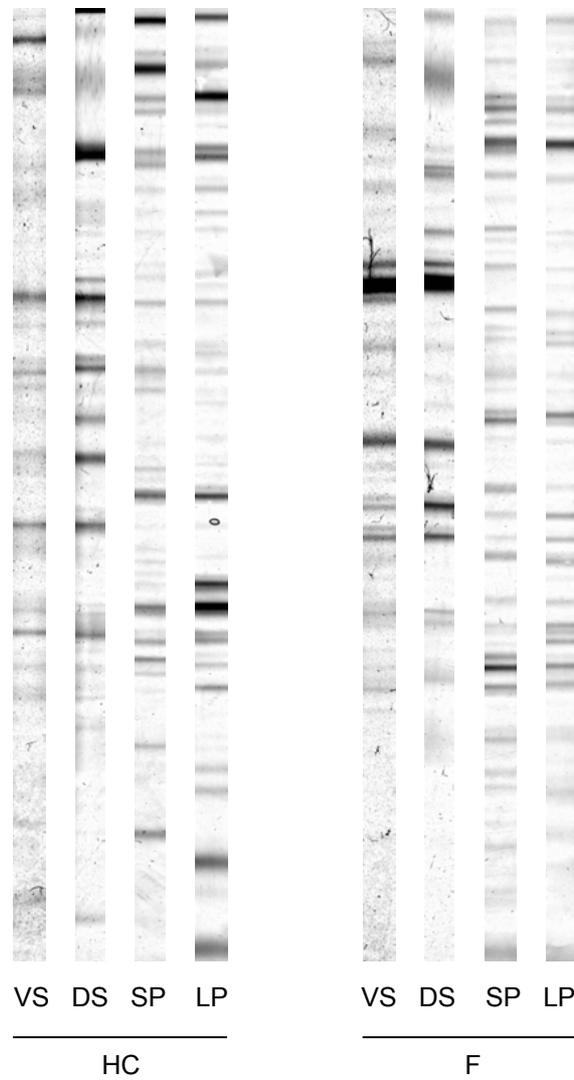


Figure 2. Typical DGGE profiles of the bacterial community attached to the rumen epithelium (ventral and dorsal sacs, VS and DS, respectively) and associated to the rumen liquid (LP) and solid phases (SP). Samples taken as example are from animals F and D fed a forage (F) and a high concentrate (HC) based diet, respectively.

taxonomically and physiologically similar (Dehority & Grubb, 1981; Mead & Jones, 1981). Other authors using similar culture-based techniques, however, described a unique tissue-adherent bacterial population in the bovine rumen (Cheng *et al.*, 1979). More recent works based on 16S rDNA gene sequences of clone libraries also support the uniqueness of this population (Mitsumori *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006). Permutation analysis indicated significant differences among samples from the epithelium, rumen contents from HC-fed animals and rumen contents from F-fed animals, even though the similarity values between the clustered profiles in the dendrogram were not that high (Figure 1). This low within-group similarity could be due to animal differences, despite their similar genetic composition and common rearing environment before and during the study. Friswell *et al.* (2006) reported a higher degree of similarity between the fecal flora of individual rats of the same strain. Laboratory rat strains are certainly more genetically homogeneous than the sheep stock used in this study and intrinsic differences in the gastrointestinal population sampled, e.g. rumen vs. feces, may have contributed to the dissimilar results. Other studies in ruminant species also reported large animal differences in the diversity of the bacterial population present in rumen contents (Edwards *et al.*, 2005; Larue *et al.*, 2005). Due to the intimate contact between animal tissue and BEC, the host influence on this population is stronger than for bacteria in rumen contents (Cheng & McAllister, 1997). The absence of differences detected in BEC due to dietary composition may also be explained by the same reason. However, it should be noted that subtle variations in the community might be undetected using this technique. DGGE has an abundance limit of 1% (Fromin *et al.*, 2002) and thus the contribution to diversity of less abundant taxons is underestimated. Nevertheless, these rare taxons have been proposed to be less relevant for the functioning of bacterial ecosystems (Pedros-Alio, 2006). In addition to the distinct structure of BEC, DGGE analysis differentiated the LP bacterial population from that of SP in forage-fed lambs. This could be explained by the increased proportion of fibre-degrading bacteria associated to solids reported for this type of diets (Michalet-Doreau *et al.*, 2001). For the concentrate-rich diet, the absence of differentiation between the liquid- and solid-associated bacteria is probably due to a large amount of small starch granules in LP that makes substrate separation between phases less defined.

The higher diversity of the SP population correlates with the high number of microbes found in close association with solids in the rumen (Cheng & McAllister, 1997). Shannon values also suggest that BEC, in spite of being less important in terms of biomass, was more diverse than the LP population. BEC, situated at the interface between the host tissues and rumen

Table 2. Results of permutation test comparing bacterial DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid-, and solid-associated bacterial communities^a

Pairwise comparisons			P<
Epithelium HC vs	Epithelium F		NS ^b
	LP F		***
	SP F		**
	LP HC		***
	SP HC		***
Epithelium F vs	LP F		***
	SP F		**
	LP HC		**
	SP HC		**
LP F vs	SP F		*
	LP HC		*
	SP HC		*
SP F vs	LP HC		*
	SP HC		*
LP HC vs	SP HC		NS

^aSamples are from the rumen epithelium (five sampling sites), liquid (LP) and solid (SP) phases from eight lambs that received a forage (F) or a high concentrate (HC) diet

^bNS: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

contents, is in contact with a variety of substrates and other microscale conditions. This heterogeneous environment could promote bacterial diversity as shown in other ecosystems (Horner-Devine *et al.*, 2004). The biodiversity measured with DGGE should be interpreted with caution though, because there is a limit in the number of OTU (bands) that can be visualized in a gel (Loisel *et al.*, 2006).

In conclusion, using PCR-DGGE, we have shown that BEC was different from the communities present in rumen contents of lambs. The bacterial population attached to the rumen epithelium was not affected by diet, indicating that the host animal may have a strong influence on the BEC structure. Similarity of BEC between animals was low, whether this difference in similarity has any influence on the function of this community remains to be determined.

Acknowledgements

S. Sadet is the recipient of an INRA-Auvergne region fellowship. The authors are grateful to J. Teuma, M. Bernard, and P. Faure for the care of animals, the personnel of INRA-Theix's experimental abattoir, D. Graviou and Y. Rochette for their technical assistance, F. Glasser for statistical advice, and P. Nozière for critical reading of the manuscript.

Chapitre expérimental 1

Effet du site de prélèvement épithélial et du régime alimentaire sur la diversité des communautés bactériennes du rumen chez des animaux en croissance

Publication 2

Diversity and structure of rumen bacterial communities in bulls fed high-concentrate diets

(British Journal of Nutrition, En préparation)

Diversity and structure of rumen bacterial communities in bulls fed high-concentrate diets

S. Sadet, D.P. Morgavi, C. Duc, M. Doreau, D. Micol and C. Martin

INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Introduction

Bacteria play a major role in the rumen function. Bacteria associated to the rumen content are considered to be the most important community for carbohydrate and protein degradation, and bacteria attached to the rumen epithelium (or epimural community) are involved in urea hydrolysis and oxygen scavenging (Wallace *et al.*, 1979; Cheng & McAllister, 1997). Assessing the diversity of bacterial communities (in term of richness and structure) is a way to address how they evolve in their environment and is important to better understand the effect of feeding practices on ruminant production. Recent data reported a difference in the diversity of the bacterial community associated to the liquid- and/or solid-phase of the rumen content between high- and low-concentrate diets (Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 1999; Tajima *et al.*, 2000; Kocherginskaya *et al.*, 2001; Koike *et al.*, 2003; Larue *et al.*, 2005). However, most studies did not analyze both bacterial communities, and were not carried out after a long period of adaptation to the diet. Moreover, the effect of high-concentrate diets on the diversity of the different rumen bacterial communities has never been reported.

The purpose of the experiment reported here was to investigate the effects of three high concentrate diets on the diversity and structure of the three rumen bacterial communities in bulls by using a genetic fingerprinting technique, 16S rDNA PCR-DGGE. This was carried out at the end of the fattening period, i.e. after a 6-month feeding a same diet.

Material and methods

Animals, experimental design and diets

Twenty-four young bulls (average age and BW at the beginning of the experiment were 267 ± 22 days and 326 ± 21 kg, respectively) from the Blond d'Aquitaine breed were used. The bulls were allotted into three homogenous groups based on age, body weight and condition score, and were fed three dietary treatments containing on a DM basis: 1) 44% natural grassland hay, 43% cracked corn grain and 13% soybean meal (HC); 2) 58% corn silage, 24% cracked corn grain and 18% soybean meal (SC), and 3) 8% wheat straw, 67% cracked corn

Table 1. Chemical composition of experimental feeds and diets (% DM)

		OM	CP	NDF	ADF	Starch
Feeds	Maize silage	94.3	7.3	47.8	23.9	25.8
	Natural grassland hay	93.4	10.8	61.3	30.1	–
	Wheat straw	92.2	4.6	70.6	40.1	–
	Maize grain	98.2	9.6	19.6	3.1	67.2
	Soybean meal	93.5	49.9	21.9	9.8	–
Diet ^a	HC	95.5	10.9	38.4	15.9	28.9
	SC	95.1	15.4	36.4	16.4	31.3
	C	96.6	19.2	19.1	7.92	44.8

^aHC = 44% natural grassland hay, 43% corn grain and 13% soybean meal; SC = 58% corn silage, 24% corn grain and 18% soybean meal; C = 8% wheat straw, 67% corn grain and 25% soybean meal

grain and 25% soybean meal (C). The net energy and digestible protein contents of the diets were calculated according to the institut National de la Recherche Agronomique (INRA, 1989) recommendations from expected feed intake to allow growth rates of 1500 g/d for HC, 1700 g/d for SC and 1900 g/d for C. Animals had *ad libitum* access to diets distributed once daily at 0900 h. The desired forage:concentrate ratio was maintained by daily adjustment of offered amounts of forage and concentrate, depending on the composition of refusals of the previous day. The mean percentage of refusals was ca. 10%. The chemical composition of feeds and diets is given in Table 1.

Animals were housed in individual pens with free access to fresh water and a mineral salt mix and cared for in accordance with the guidelines from animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous 1988). Animals have been slaughtered in an experimental slaughterhouse, at a similar body weight of 420 kg after a mean fattening period of 181, 155, and 138 days for diets HC, SC, and C, respectively.

Samplings for biochemical and microbiological analysis

One day before slaughter, approximately 250 g of mixed rumen contents were taken from the ventral sac of the rumen by rumenocentesis. Samples were taken from each animal 4 to 5 h after feeding and filtered through a polyester monofilament fabric (250 µm mesh aperture). From forty ml of ruminal fluid, pH was immediately determined and three 5-ml aliquots were done without conservative to determine lactate or after adding 0.5 ml of H₃PO₄ 5% (v/v) for volatile fatty acids (VFA) and for ammonia (NH₃) analyses. Samples were stored at -20°C until analyses. For protozoal counting, ruminal fluid samples were mixed with methylgreen-formalin solution (MFS;(Ogimoto & Imai, 1981)) in a 1:1 ratio and stored at room temperature in the dark until use.

At slaughter, the entire gastrointestinal tract was immediately removed, the reticulo-omasal and cut open with the help of a sterile scalpel in order to sample the ruminal epithelium and content. The epithelial samples were taken from the dorsal and ventral sacs using a biopsy punch (diameter 8 mm) according to the procedure described by Sadet *et al.*, (2007a). Then, samples were washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) 0.01 mol/l, pH 6.8, snap frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C until processing. The time elapsed between slaughter and freezing of samples was kept as short as possible (less than 30 min) in order to minimize postmortem changes in the tissue and related possible changes in the bacterial epimural community (Bauchop *et al.*, 1975; Mead & Jones, 1981).

Approximately 100 g of mixed rumen contents were sampled and filtered through a polyester monofilament fabric (250 µm mesh aperture) to obtain a liquid (LP) and a solid (SP) phase. Three 1-ml aliquots of LP were dispensed in microtubes. The remaining LP was centrifuged (10000 × g, 10 min, 4°C), the supernatant removed, and the pellet was stored at – 80°C. The SP was washed with 50 ml of PBS, filtered as above, and stored at – 80°C before microbial analysis.

Microbial ecosystem analyses

DNA extraction and PCR amplification.

Total DNA was extracted from samples as described by Yu and Morrison (2004). The V3 variable region of the 16S rDNA gene of bacteria was amplified by PCR with primers 341f (5' – CCTACGGGAGGCAGCAG – 3') and 534r (5' – ATTACCGCGGCTGCTGG – 3'), the forward primer had a GC clamp at its 5' end (Muyzer *et al.*, 1993). The PCR mixture (50 µl) contained 1× PCR buffer, 1.5 mmol/l MgCl₂, 200 µmol/l of each dNTP, 0.25 µmol/l of each primer and 2.5 U HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). Touchdown PCR was performed with an initial denaturation step of 95°C for 15 min; followed by 10 touchdown cycles of 94°C for 30 s, 61°C (- 0.5°C/cycle) for 30 s, and 72°C for 1 min; followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and a final elongation step of 72°C for 30 min to eliminate artifactual double bands (Janse *et al.*, 2004).

All PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels containing ethidium bromide to check their size and estimate their concentration using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) and an imaging system (Chemimager; Alpha Innotech, San Leandro, USA).

DGGE

Polyacrylamide gel at an 8% concentration was prepared with a denaturant gradient between 40% and 60% (urea formamide). One hundred percent denaturant was defined as 7 mol/l urea and 40% (v/v) formamide (Muyzer *et al.*, 1993). Approximately 100 ng of PCR product were applied per well. Gel was submerged in 0.5 × TAE buffer (40 mmol/l Tris base, 40 mmol/l glacial acid acetic, 1 mmol/l EDTA) and electrophoresed for 5 h at 60°C using a fixed voltage of 200 mV in a DGGE-2001 (CBS Scientific Co, Solana Beach, USA). Gels were silver stained using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Due to the large

Table 2. Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid and solid phase communities

		Epithelium			Solid phase			Liquid phase			SE	Effect ^c		
		HC ^b	SC	C	HC	SC	C	HC	SC	C		Localisation	Diet	Localisation x Diet
Biodiversity index ^a	H	3.23	3.32	3.39	3.10	3.11	3.28	3.32	3.50	3.3	0.08	**	NS	NS
	e	0.95	0.94	0.93	0.93	0.94	0.93	0.94	0.94	0.93	0.005	NS	NS	NS
	c	0.05	0.04	0.04	0.06	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	0.005	*	NS	NS

^aH=Shannon's index, e=evenness, c=dominance

^bHC = 44% natural grassland hay, 43% corn grain and 13% soybean meal; SC = 58% corn silage, 24% corn grain and 18% soybean meal; C = 8% wheat straw, 67% corn grain and 25% soybean meal

^cNS: P>0.05; *:P<0.05; **: P<0.01

number of samples, several gels were required to carry out the analysis. A PCR product from a rumen sample was used as control of the electrophoresis run and to normalize gels among them. The percentage of similarity between gels' standards was $80.3 \pm 9.2\%$ (mean \pm SD).

Protozoal counting

Protozoa were counted using a Dolfuss cell (Elvetec Services, Clermont-Ferrand, France) according to procedures describes by Jouany and Senaud (1982).

Biochemical analyses

Volatile fatty acids were determined by gas chromatography using 4-methylvaleric acid as the internal standard (CG 8000 gas chromatography, Carlo Erba Instrument, Milan, Italy). Ammonia N was measured by colorimetry following the method of Weatherburn (1967) and using an autoanalyzer (System II, Technicon Instruments Co. Tarrytown, NY, USA) as described by Davies and Taylor (1965). D- and L-lactic acid determination was done using an enzymatic method (EnzyPlusTM D-/L-lactic acid, Raisio Diagnostics, Lyon, France).

Statistical analyses

Gel images were acquired using an optical density calibrated scanner (ImageScanner, GE Healthcare, Piscataway, USA) at a spatial resolution of 400 dpi and each band was considered as an operational taxonomic unit (OTU). Images were analysed using ImageQuant TL software (GE Healthcare, Piscataway, USA) and GelCompar II version 4.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). ImageQuant TL was used to quantify the banding profiles within each profile by determining the total number of bands (S), the peak surface of each band (ni) and the sum of all the peak surfaces of all bands (N) (Fromin *et al.*, 2002). This information was used to calculate the community biodiversity using three indices: i) the Shannon's index (H) calculated with the formula $H = - \sum (ni/N) \ln (ni/N)$; ii) the dominance index (c) calculated with the formula $c = \sum (ni/N)^2$; and iii) the evenness index (e) calculated with the formula $e = H/\ln S$ (Odum, 1971). These indices were then processed by analysis of variance using the MIXED procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA). The statistical model included animal, diet, localisation (corresponding to the sampling sites for the rumen epithelium and the nature of the phase for the rumen content), and diet \times localisation interaction. Animal within diet was considered as random effect. Having no effect of the sampling site for the epithelium samples, only the data from the ventral sac were taken into

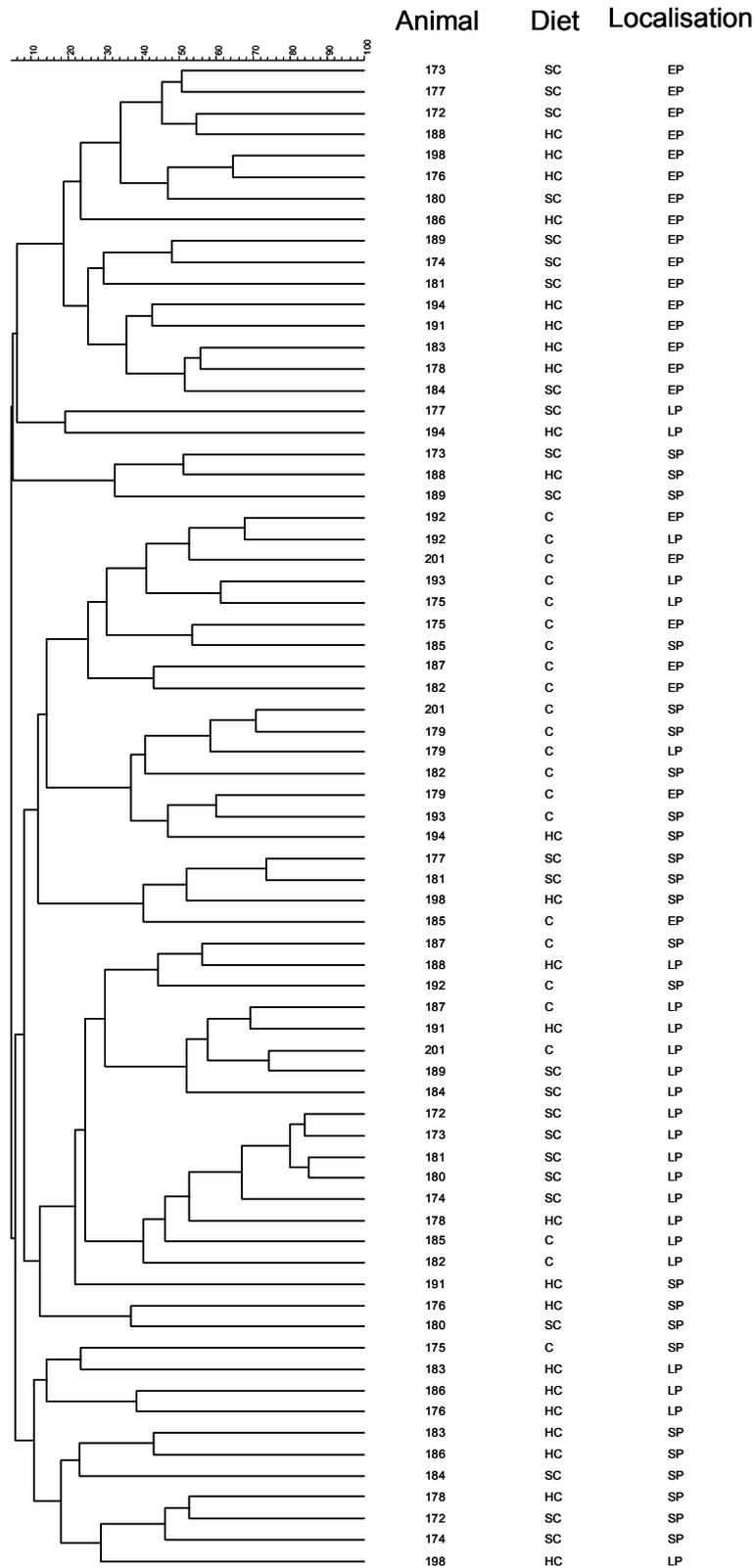


Figure 1. UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles. Samples are from the rumen epithelium (EP) and liquid (LP) and solid phase (SP), taken from twenty-four bulls that received different diets during 6 months (HC = 44% natural grassland hay, 43% corn grain and 13% soybean meal; SC = 58% corn silage, 24% corn grain and 18% soybean meal; C = 8% wheat straw, 67% corn grain and 25% soybean meal).

account and compared with those of the liquid and solid rumen phases using the same model stated above. Effects were declared significant at $P < 0.05$.

GelCompar II was used to normalize and compare all the DGGE profiles using hierarchical clustering to join similar profiles into groups (Fromin *et al.*, 2002). In this purpose, all the images of DGGE gels were matched using the internal control sample and the bands were quantified after a local background subtraction. A tolerance in the band position of 1% was applied. The similarity among profiles was calculated with the Pearson product-moment correlation coefficient, recommended for the analysis of complex profiles (Savelkoul *et al.*, 1999), and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). A significance test based on pairwise similarity measures was used to compare the community profiles of different groups of samples (Kropf *et al.*, 2004). This permutation test was done using the PROC IML procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA) with 10^5 random permutations and based on the model of Kropf *et al.* (2004), which allows the utilization of more than one gel in the analysis. An additional permutation analysis done on the control samples of all gels showed no gel effect ($P > 0.05$).

Ruminal pH, fermentative parameters and protozoa values were processed by analysis of variance using the MIXED procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA). The statistical model included animal and diet. Animal within diet was considered as the random effect. The diet effect was declared significant at $P < 0.05$.

Results

Effect of sampling site on the diversity and structure of the epimural bacterial community

The diversity and structure of the bacterial community attached to the rumen epithelium was studied both in the ventral and dorsal sac for the three diets. No difference between these two sampling sites was observed for the biodiversity indices, cluster analysis and permutation test (data not shown).

Diversity and structure of the different rumen bacterial communities

Biodiversity indices of the epimural, LP and SP bacterial communities for each diet are presented in Table 2. Irrespective of the index (H, e, c), no diet effect was observed on these parameters ($P > 0.05$). However, the Shannon's (H) and dominance (c) indices differed between bacterial communities. The solid phase bacterial community (H=3.16 and c= 0.053, mean of the three diets) was different from that of the liquid phase (H=3.37 and c= 0.043,

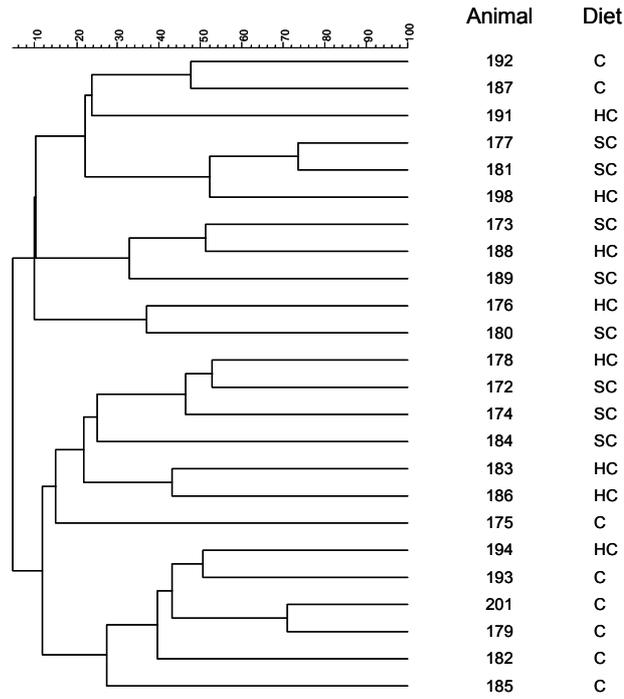
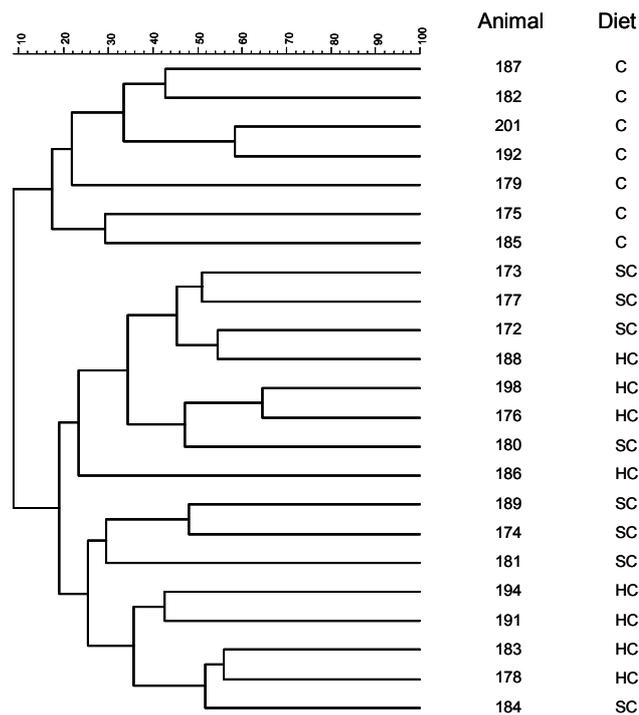
A**B**

Figure 2. UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles. Samples are from the rumen solid phase (SP) (**A**) and epithelium (EP) (**B**) taken from bulls that received different diets during 6 months (HC = 44% natural grassland hay, 43% corn grain and 13% soybean meal; SC = 58% corn silage, 24% corn grain and 18% soybean meal; C = 8% wheat straw, 67% corn grain and 25% soybean meal).

mean of the three diets), this last one being similar with the bacterial community of the epithelium ($H=3.31$ and $c= 0.045$, mean of the three diets).

The clustering analysis of DGGE fingerprints grouped together the majority of samples from the epimural bacterial community indicating a difference of structure with the rumen content bacterial communities (Figure 1). The permutation test confirmed this observation and highlighted also a difference of structure between the two bacterial communities of the rumen content ($P<0.001$), except for diet C (Table 3). Concerning the diet effect, the clustering analysis showed a different effect depending on the bacterial community considered. While no effect of diet was seen on the liquid phase bacterial community, a diet effect was observed on the bacterial community of the solid phase and that of the epithelium, particularly in the latter (Figure 2). These effects were confirmed by the permutation test, where the bacterial community structure varied between the diets C and SC for the solid phase of the rumen content ($P<0.05$), and between all the diets for the epithelium ($P<0.05$ between SC and C; $P<0.001$ between C and the two other diets; Table 3).

Ruminal protozoa

The total protozoa count varied between diets (Table 4). It was higher (about 6 fold) with SC than with the two other diets. This was mainly due to variations in the number of entodiniomorphs, which made up the great majority (more than 97%) of the protozoal community for the three diets. The holotrichs were absent from the ruminal fluid of bulls fed the diet C.

Ruminal pH and fermentative parameters

No diet effect was observed on ruminal pH and fermentative parameters (Table 5). On average for the three diets, the ruminal pH was 5.73, the total VFA and NH_3 concentration was respectively 145 mM and 4 mM, and that of total lactate did not exceed 4 mM.

Discussion

DGGE analysis showed that the structure and diversity of the epimural community was similar between the ventral and dorsal sac of the rumen for all diets. This observation confirms recent results, obtained with the same fingerprint technique, and describing the uniformity of the epimural community among different sites of the rumen epithelium of lambs fed different diets (Sadet *et al.*, 2007a). However, other works reported an epithelial sampling site effect on the density of the bacteria determined with cultural techniques in sheep

Table 3. Results of permutation test comparing bacterial DGGE fingerprints of rumen epimural, liquid phase and solid phase from bulls fed three different concentrate diets^a

		Epithelium			Liquid phase			Solid phase		
		HC	SC	C	HC	SC	C	HC	SC	C
Epithelium	HC		*	***	***	***	***	***	***	***
	SC			***	***	***	*	NS ^b	***	**
	C				***	***	*	***	***	**
Liquid phase	HC					NS	NS	*	**	*
	SC						NS	*	**	*
	C							NS	NS	NS
Solid phase	HC								NS	NS
	SC									*
	C									

^a HC = 44% natural grassland hay, 43% corn grain and 13% soybean meal; SC = 58% corn silage, 24% corn grain and 18% soybean meal; C = 8% wheat straw, 67% corn grain and 25% soybean meal

^bNS: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Table 4. Ruminal protozoal numbers in bulls fed three different concentrate diets

Protozoal numbers ($\times 10^3/\text{mL}$)	Diet ^a			SE	Diet effect ^b
	HC	SC	C		
Total protozoa ^c	215 (5.12)	1342 (5.98)	254 (5.22)	220.6	**
Holotrichs	7.0 (3.27)	8.6 (3.78)	0 (0)	2.14	*
Entodiniomorphs	208 (5.09)	1333 (5.98)	254 (5.22)	219.3	**

^a HC = 44% natural grassland hay, 43% corn grain and 13% soybean meal; SC = 58% corn silage, 24% corn grain and 18% soybean meal; C = 8% wheat straw, 67% corn grain and 25% soybean meal

^bNS: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

^cValues in parentheses are the \log_{10} transformations of the data

(Bauchop *et al.*, 1975) and cows (McCowan *et al.*, 1980). Because molecular techniques detect both cultivable and non cultivable bacteria, they are able to highlight a more important biodiversity compared to cultural techniques and they are hence preferred for the study of the microbial diversity of ecosystems (Stahl *et al.*, 1988; Pace, 1997).

The epimural community differed from that associated to the solid phase of the rumen content in term of diversity for all diets. This distinction between the bacteria attached to the rumen wall and those more prevalent in the rumen content is in agreement with recent results obtained by PCR-DGGE on lambs (Sadet *et al.*, 2007a), or by 16S rDNA gene sequences of clone libraries on cows (Mitsumori *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006). By using culture-based techniques, Cheng *et al.*, (1979) described also a unique tissue-adherent bacterial community in the bovine rumen. Using similar culture-based techniques it has also been reported a taxonomical similarity between bacterial communities of the epithelium and the rumen content (Dehority & Grubb, 1981; Mead & Jones, 1981). However, the data presented in this work and the bulk of the literature indicate that the bacterial community attached to the rumen epithelium has a distinct diversity from those of the rumen content irrespective of the composition of the diet and animal species (bovine or ovine). This suggests also that the bacteria associated to the rumen epithelium may have specific functions in the global ruminal function.

Concerning the bacterial communities present in the rumen content, our results showed a difference in the diversity and structure of the LP and SP communities for the diets HC and SC, both containing 30% starch, while for the diet C containing 45% of starch, these differences were not seen. The difference of bacterial structure between the liquid- and solid-phase of the rumen content has already been observed in previous studies on sheep (Larue *et al.*, 2005; Sadet *et al.*, 2007b) or cows (Tajima *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2006) fed diets containing less than 20% of starch. Moreover, the similarity of structure between these two bacterial communities has also been reported in lambs (Sadet *et al.*, 2007a) and sheep (Sadet *et al.*, 2007b) fed high-starch diets (between 45-55%). Therefore, it would appear that the difference in structure between the two bacterial communities from the rumen content could be related to a threshold of starch proportion present in the diet of approximatively 35-40%. For starch-rich diets, the absence of differentiation between the liquid- and solid-associated bacteria is probably due to a higher homogeneity in the physical and chemical characteristics of the two phases: larger proportion of small starch granules than will be partitioned in the liquid and less forage particles in the solid, which makes them less defined.

Table 5. Ruminal pH and fermentative parameters from bulls fed three different concentrate diets

Item	Diet ^a			SE	Diet effect ^b
	HC	SC	C		
pH	5.57	5.88	5.74	0.26	NS
Total VFA (mmoles/L)	134.7	135.4	165.8	10.91	NS
Acetate (%)	59.3	59.1	59.3	2.26	NS
Propionate (%)	21.1	23.1	19.4	1.93	NS
Butyrate (%)	13.0	12.0	16.2	1.36	NS
Valerate (%)	2.27	2.09	2.46	0.49	NS
Caproate (%)	1.13	0.68	0.80	0.32	NS
Isobutyrate + Isovalerate (%)	4.36	3.70	3.07	0.57	NS
Ratio acetate/ propionate	3.09	2.57	3.47	0.59	NS
Total lactate (mmol/L)	1.81	3.75	2.97	0.60	NS
L-lactate (mmol/L)	0.83	1.92	1.35	0.34	NS
D-lactate (mmol/L)	0.97	1.84	1.63	0.27	NS
NH ₃ (mmol/L)	4.03	4.63	2.50	1.05	NS

^a HC = 44% natural grassland hay, 43% corn grain and 13% soybean meal; SC = 58% corn silage, 24% corn grain and 18% soybean meal; C = 8% wheat straw, 67% corn grain and 25% soybean meal

^bNS: P>0.05

The diet effect on the structure of rumen bacteria varied with the community considered. For the bacterial community associated to the epithelium, its structure was different for all diets. This was not in agreement with our previous works on lambs (Sadet *et al.*, 2007a) or sheep (Sadet *et al.*, 2007b) fed more contrasting diets in term of starch content (0 vs 55% and 0 vs 45%, respectively) than in our study in bulls (30% on average for diets HC and SC vs 45% for the diet C). However, in ovine studies, animals were fed the diets during only 1-2 months vs 6 months in this study. It is possible that epithelial bacteria are affected by diet only after long periods more than 2 months.

As for the rumen content, the structure of the liquid phase bacterial community was the same between the three diets studied. A diet effect on this community was reported in bovine (Tajima *et al.*, 2000; Kocherginskaya *et al.*, 2001) and ovine studies (Sadet *et al.*, 2007b; Sadet *et al.*, 2007a). However, in those works, the difference in starch proportion between diets was at least superior to 40%, whereas it was only of 15% in this study. It is possible that the difference of composition between diets was not marked enough to highlight variations in community structure. On the contrary, a diet effect was observed on the solid phase bacterial community structure. This supported previous data obtained in sheep (Koike *et al.*, 2003; Larue *et al.*, 2005; Sadet *et al.*, 2007a) for diets containing low or high starch, suggesting that the solid phase bacterial community would be more reactive to diet than that of the liquid phase. These modifications were not observed for the physico-chemical parameters indicating that the overall rumen function was not affected.

Conclusion

In bulls fed high concentrate diets, the epimural community was different from those of the rumen content irrespective of diet. For the first time by PCR-DGGE, a diet effect was observed on the epimural community that could be due to both the starch proportion in diet and the relatively long duration of the feeding period. The bacteria associated to the solid phase of the rumen content were also affected by diet but without a side effect on ruminal fermentation parameters.

Chapitre expérimental 2

Effet du régime alimentaire sur la diversité des communautés bactériennes du rumen chez des moutons adultes

Publication 3

Temporal stability and effect of diet changes on bacterial communities and rumen physico-chemical parameters in the rumen of sheep

(British Journal of Nutrition, En préparation)

Temporal stability and effect of diet changes on bacterial communities and rumen physico-chemical parameters in the rumen of sheep

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier and D.P. Morgavi

INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Introduction

The microbial community and its inherent capacity to degrade plant substrates and produce end-products of fermentation are in direct relation with the nature of the diet.

It is often simplistically assumed that for a given diet the rumen microbial symbionts are at an optimal equilibrium and make the best use of the nutrients present in the rumen. In a similar way it is assumed that, when changes in the diet occur, the microbial community adapts rapidly to the new conditions in their environment. It is well documented that modifications in rumen microbial composition and structure are provoked by diets rich in energy such as those used in high producing dairy and beef animals (Tajima *et al.*, 2000; Kocherginskaya *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2001). These microbial changes also modify the rumen capacity to degrade fibrous plant components and physico-chemical parameters (Mertens & Lofton, 1980; Van der Linden *et al.*, 1984).

As production cycles in ruminants are long, animals are subjected to marked variations in the quality and quantity of feeds they receive, e.g. seasonal changes in pastures under grazing conditions and rations matching the production requirements in lactating dairy cows. In spite of these recurring diet variations there is scarce information on whether the rumen microbial community reverts to its initial state when the animal is fed back the preceding diet or, on the contrary, the community evolves influenced by shifts in diet. We and others have observed that in some animal trials planned to test the effect of diet or feed additives and based on a cross-over or Latin square designs, differences between treatments recorded in period one were attenuated when groups were switched in subsequent periods (Beauchemin *et al.*, 2003; Brossard *et al.*, 2003). We hypothesized that a remaining effect of the previous diet/treatment on the microbial community could help explain these results. From a practical point of view to test this hypothesis is important as it could affect the outcome of some feeding management practices.

Table1. Chemical composition of experimental diets (%DM)

Item	Diet¹	
	F	HC
Organic matter	91.2	94.8
Crude protein	14.7	11.8
NDF	45.2	27.6
ADF	32.8	14.6
Starch	0	10.7

¹F diet=100% Hay; HC diet=65% Wheat + 35% Hay

In this work we focused on rumen bacteria. The objective was to monitor the evolution of bacterial communities using a fingerprinting method (PCR-DGGE) during and after a diet change. Bacterial communities associated to the liquid and solid phases of rumen content were examined as well as the community attached to the rumen epithelium. A second objective was to observe the temporal stability of these three rumen bacterial communities when diet remained constant for a 5-month period.

Material and methods

Animals, experimental design and diets

Eight 2-year old rumen-cannulated Texel wethers were used in a 20-week long study. Animals were allotted in two groups at random; in each group, mean body weight was 51 ± 2 kg. One group was fed alfalfa hay throughout the study; the constant diet (CD) group. The other group, named the variable diet (VD) group, was fed a alfalfa hay the first 4 weeks, a high concentrate diet (65% pelleted ground wheat and 35% alfalfa hay; DM basis) during the 8 following weeks, and then switched back to alfalfa hay for the last 8 weeks of the study.

Animals were fed at 90% of voluntary intake (based on alfalfa hay intake before the trial, about 1.3 kg DM/day) to ensure the diet was ingested quickly and without refusals. Feeds were offered daily in two equal parts at 0800 h and 2000 h. The chemical composition of feeds is given in Table 1. Throughout the experimental period, animals were housed in individual stalls (1.00 x 1.50 m) with automatic waterers and individual feed-bunks, and had free access to mineralized salt blocks.

Ethics approval was obtained from the Auvergne Regional Committee of Ethics in Animal Experimentation (CE 5-06) and procedures on animal were in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous, 1988).

Samples for microbiological and biochemical analysis

Samples for microbiological and biochemical analysis were taken before the morning feeding at four weeks intervals throughout the experimental period.

Samples from the rumen epithelium were taken from the left ventral lateral area of the rumen that was accessed through the fistula. The sampling area was washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) 0.01 mol l^{-1} , pH 6.8. Papillae were taken with the help of sterile tweezers and scissors. Epithelium samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. Approximately 300 g of mixed rumen contents were filtered through a polyester monofilament fabric (250 μm mesh aperture) to obtain the liquid (LP) and solid

phases (SP). One-ml aliquots of the filtrate (LP) were dispensed in microtubes, centrifuged ($10000 \times g$, 10 min, 4°C), the supernatant removed, and the pellet stored at -80°C . The retentate (SP) was washed with 50 ml of PBS, filtered as above, and 2 g were stored at -80°C .

Samples for biochemical analysis were collected on two consecutive days. Rumen contents were filtered as above and 5-ml aliquots of the filtrate fraction were taken for lactic acid, volatile fatty acids (VFA), and NH_3 determination. In addition, eight-ml aliquots of the filtrate fraction were taken for protozoa counting. For VFA and NH_3 , samples were preserved by adding 0.5 ml of H_3PO_4 5% (v/v) and stored at -20°C until analysis. For protozoal counting, samples were mixed with methylgreen-formalin solution (MFS) (Ogimoto & Imai, 1981) in a 1:1 ratio and stored at room temperature in the dark until use.

Ruminal pH was determined, for each animal, the week before collection of biochemical samples during the 12-h period between the morning and afternoon feeding. The pH was measured on two consecutive days every hour for the first 4 h and then every two hours. The pH data were averaged over the two days to calculate for each wether the mean pH, minimum and maximum pH, proportion of the measured time in which pH was under 6.0 or 5.5, and area under pH 6.0 and 5.5.

***In sacco* measurements**

The rumen degradation of alfalfa hay was measured in all animals at each fourth week of the experimentation. Polyester bags (pore size: $53 \mu\text{m}$; internal dimensions: 5 x 10 cm; Ankom CO., Fairport, NY) were dried (80°C for 24h), weighed, and filled with 3 g of ground alfalfa hay (sieve size 3 mm). Duplicate bags were introduced, throughout the cannula, into the rumen just before morning feeding for 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h. On removal, bags were rinsed in a washing machine with three successive 2 min washings, dried (80°C for 48h), and weighed. The DM degradation kinetics were fitted to the exponential model described by Orskov and McDonald (1979): $\text{disappearance}(t) = a + b(1 - e^{-ct})$ where disappearance (t) is the percentage disappearance from the bag at time t, of the rapidly (a) and slowly (b) degradable fraction, and c is the constant rate of degradation of fraction b. Effective degradability was calculated using the particle outflow rate of 0.06h^{-1} , average rate for this type of animal under similar feeding conditions (Vérité *et al.*, 1988).

Microbiological analyses

DNA extraction and PCR amplification

Total DNA was extracted from samples as described by Yu and Morrison (2004). For denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), the V3 variable region of the 16S rDNA gene of bacteria was amplified by PCR with primers 341f- (5' – CCTACGGGAGGCAGCAG – 3') and 534r (5' – ATTACCGCGGCTGCTGG – 3'), the forward primer had a GC clamp at its 5' end (Muyzer *et al.*, 1993). The PCR mixture (50 µl) contained 1× PCR buffer, 1.5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 200 µmol l⁻¹ of each dNTP, 0.25 µmol l⁻¹ of each primer and 1.25 U HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). Touchdown PCR was performed with an initial denaturation step of 95°C for 15 min; followed by 10 touchdown cycles of 94°C for 30 s, 61°C (- 0.5°C cycle⁻¹) for 30 s, and 72°C for 1 min; followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and a final elongation step of 72°C for 30 min to eliminate artifactual double bands (Janse *et al.*, 2004).

All PCR products were analyzed by electrophoresis on 2 % agarose gels containing ethidium bromide to check their size and estimate their concentration using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) and an imaging system (Chemimager; Alpha Innotech, San Leandro, USA).

DGGE

Polyacrylamide gels at an 8% concentration were prepared with a denaturant gradient between 40% and 60%. One hundred percent denaturant was defined as 7 mol l⁻¹ urea and 40% (v/v) formamide (Muyzer *et al.*, 1993). Approximately 100 ng of PCR product were applied per well. Gels were submerged in 0.5× TAE buffer (40 mmol l⁻¹ Tris base, 40 mmol l⁻¹ glacial acid acetic, 1 mmol l⁻¹ EDTA) and electrophoresed for 5 h at 60°C using a fixed voltage of 200 mV in a DGGE-2001 (CBS Scientific Co, Solana Beach, USA). Gels were silver stained using a commercial kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). A PCR product from a rumen sample was used as control of the electrophoresis run and to normalize gels among them. Gel images were acquired using an optical density calibrated scanner (ImageScanner, GE Healthcare, Piscataway, USA) at a spatial resolution of 400 dpi and each band was considered as an operational taxonomical unit (OTU).

Protozoa

Protozoa were counted using a Dolfuss cell (Elvetec Services, Clermont-Ferrand, France) according to procedures describes by Jouany and Senaud (Jouany & Senaud, 1982).

Biochemical analysis

VFA were determined by gas chromatography using crotonic acid as the internal standard (CP9002 gas chromatography, Chrompack, Middleburg, The Netherlands) (Morgavi *et al.*, 2003). NH₃ was measured by colorimetry following the method of Weatherburn (Weatherburn, 1967) and using a technicon autoanalyzer II system (Technicon Instruments Co. Tarrytown, NY, USA) as described by Davies and Taylor (1965a).

D- and L-lactic acid determination was done using an enzymatic method (D-/L-lactic acid, Boehringer Mannheim 1112821, Roche Diagnostics, Meylan, France).

Statistical analysis

Images of DGGE gels were analysed using ImageQuant TL software (GE Healthcare, Piscataway, USA) and GelCompar II version 4.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). ImageQuant TL was used to quantify the banding patterns within each profile by determining the total number of bands (S), the surface intensity of each band (ni) and the sum of all the surfaces of all bands (N). This information was used to calculate the community biodiversity using three indices: i) the Shannon's index (H) calculated with the formula $H = -\sum (ni/N) \ln (ni/N)$; ii) the dominance index (c) calculated with the formula $c = \sum (ni/N)^2$; and iii) the evenness index (e) calculated with the formula $e = H/\ln S$ (Odum, 1971). These indices were then processed by group using the analysis of variance and the repeated measure of the MIXED procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA). Animal was considered as the experimental unit on which all the measures were repeated. The repeated measure was the period. The statistical model included period, localisation (corresponding to the rumen epithelium and the LP and SP of the rumen content), and period×localisation interaction. Effects were declared significant at $P < 0.05$.

GelCompar II was used to normalize and compare all the DGGE profiles using hierarchical clustering to join similar patterns into groups (Fromin *et al.*, 2002). To this end, all the images of DGGE gels were matched using the internal control sample and the bands were quantified after a local background subtraction. A tolerance in the band position of 1% was applied. The similarity among profiles was calculated with the Pearson product-moment correlation coefficient, recommended for the analysis of complex profiles (Savelkoul *et al.*, 1999), and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). A significance test based on pairwise similarity measures was used to compare the community profiles of different groups of samples (Kropf *et al.*, 2004). This permutation test was done using the PROC IML procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA) with 10⁵ random permutations and based on the model of Kropf *et al.* (2004), which

Table 2. Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid- and solid-associated bacterial communities from constant diet group (n=4)

Index ¹	Localisation ²	Time (week)					SEM	Effect ³		
		4	8	12	16	20		Localisation	Period	Localisation×Period
H	SP	3.03	2.59	2.6	2.76	2.68				
	LP	3.07	2.97	2.85	3.02	2.94	0.13	**	NS	NS
	E	2.37	2.65	2.79	2.77	2.53				
e	SP	0.95	0.89	0.95	0.89	0.95				
	LP	0.88	0.85	0.84	0.86	0.83	0.03	***	NS	NS
	E	0.76	0.81	0.86	0.86	0.82				
c	SP	0.06	0.07	0.09	0.07	0.08				
	LP	0.06	0.06	0.08	0.06	0.07	0.01	NS	NS	NS
	E	0.11	0.07	0.07	0.07	0.08				

¹H=Shannon's index, e=evenness, c=dominance

²SP=Solid phase; LP=Liquid phase; E=Epithelium

³NS: non significant ($P>0.05$); **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Table 3. Count of protozoa in constant diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹
	4	8	12	16	20		Period
Total protozoa (log ₁₀)	5.37	4.54	3.23	5.12	4.91	0.5	NS
Holotrichs (log ₁₀)	4.79 ^a	1.45 ^d	2.33 ^{cd}	3.17 ^{bc}	3.91 ^{ab}	0.52	*
Entodiniomorphs (log ₁₀)	5.22	1.54	3.18	5.11	4.86	0.49	NS

¹NS: non significant ($P>0.05$); *: $P<0.05$

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 4. Ruminal VFA composition, lactate and ammonia concentration in constant diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹
	4	8	12	16	20		Period
Total VFA (mM)	87.53 ^c	109.93 ^{ab}	117.33 ^a	96.08 ^{bc}	107.14 ^{ab}	7.28	*
Acetate (mM)	58.61 ^c	74.2 ^{ab}	81.14 ^a	67.18 ^{bc}	73.39 ^{ab}	5	*
Propionate (mM)	15.03 ^{bc}	19.02 ^a	19.45 ^a	14.58 ^c	17.41 ^{ab}	2.27	*
Butyrate (mM)	8.31	9.93	10.93	9.17	10.08	0.93	NS
Total lactate (mM)	2.94	1.89	1.73	2.3	1.76	0.57	NS
NH ₃ (mM)	11.19 ^a	9.52 ^{abc}	8.16 ^c	8.66 ^{bc}	10.22 ^{ab}	0.51	*

¹NS: non significant ($P>0.05$); *: $P<0.05$

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

allows the utilization of more than one gel in the analysis. An additional permutation analysis was also done using the control samples, grouped by gel, to further test whether the effect of gel was significant. No significant differences due to electrophoretic run were found ($P>0.05$).

For each group separately, protozoa, fermentation parameters, pH, and degradability values were processed by analysis of variance using the repeated measure of the MIXED procedure of SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA). Animal was considered as the experimental unit on which all the measures were repeated. The repeated measure was the period. Effects were declared significant at $P<0.05$.

The relation between the bacterial community and rumen physico-chemical parameters and protozoa was evaluated by a coinertia analysis using the ADE 4 package (Thioulouse *et al.*, 1997).

Results

Temporal effect

Microbiological analyses

The effect of time on rumen bacteria in the absence of any diet change (constant diet group) was evaluated on three communities using the PCR-DGGE fingerprinting technique. The bacterial communities were obtained from distinct localizations within the rumen: liquid and solid rumen content and the rumen epithelium. Cluster analysis classed the epimural (attached to the rumen epithelium) community at a different node than that of rumen content (data not shown). A permutation test confirmed statistically this result and also revealed that LP and SP bacterial communities were different from each other ($P<0.01$). The biodiversity index of Shannon and the index of evenness also highlighted the difference existing between these communities (Table 2). This differentiation between LP, SP and the epimural communities was expected and the evolution over time of each one of them was considered independently. When each community was monitored throughout the 5-month experimentation period, they were stable as judged by the similarity of the biodiversity indices (H, e and c; Table 2) and the absence of grouping in the cluster analysis ($P>0.05$; data not shown). In a similar way, total protozoal concentration was not affected by time ($P>0.05$). But the number of holotrichs differed between periods ($P<0.05$; Table 3).

Biochemical analyses

Table 5. Ruminal pH parameters in constant diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹ Period
	4	8	12	16	20		
Mean	6.35 ^c	6.64 ^a	6.46 ^{bc}	6.52 ^{ab}	6.63 ^a	0.04	**
Minimum	6.09 ^b	6.29 ^a	6.07 ^b	6.27 ^a	6.25 ^a	0.05	*
Maximum	6.62 ^d	6.96 ^b	6.85 ^c	6.9 ^{bc}	7.12 ^a	0.04	***
Time under 6.0 (h)	0.25	0	0	0	0	0.11	NS
Area under 6.0 (pH x h)	0.02	0	0	0	0	0.01	NS
Time under 5.5 (h)	0	0	0	0	0	0	NS
Area under 5.5 (pH x h)	0	0	0	0	0	0	NS

¹NS: non significant ($P > 0.05$); *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

Table 6. *In sacco* DM degradation of alfalfa hay in constant diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹ Period
	4	8	12	16	20		
Undegradable fraction (A) (%)	30.21	27.52	23.19	26.82	27.76	1.44	NS
Slowly degradable fraction (b) (%)	31.15	33.4	38.31	36.31	37.53	1.77	NS
Degradation constant rate (c) (%.h ⁻¹)	0.09	0.09	0.08	0.09	0.1	0.01	NS
Rapidly degradable fraction (a) (%)	38.63 ^{ab}	39.08 ^a	38.49 ^{ab}	36.86 ^b	34.71 ^c	0.77	*
Effective degradability (D) (%)	49.45 ^{ab}	47.72 ^b	45.52 ^c	49.01 ^b	51.29 ^a	0.68	**

¹NS: non significant ($P > 0.05$); *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

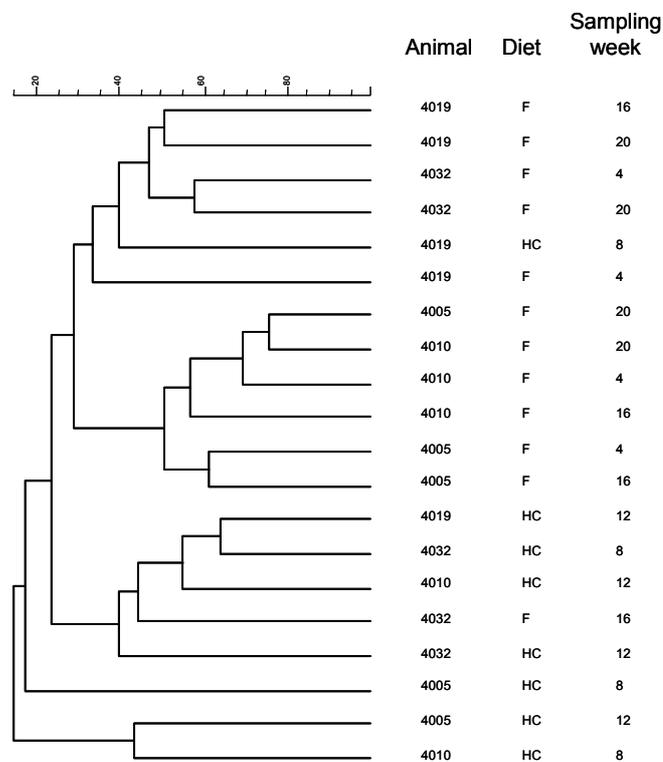


Figure 1. UPGMA dendrogram generated from bacterial DGGE profiles. Samples are from the rumen liquid phase, taken from eight lambs that received alternatively a forage (F), a high concentrate (HC) and finally a forage (F) diets during five months.

Total VFA concentration was variable between periods ($P<0.05$; Table 4). A 25% difference was observed between the highest and lowest values but there was not a tendency to increase or decrease throughout the trial. The variations in total VFA concentration were due to acetate and propionate concentrations. Ammonia concentration also fluctuated at a range similar to that of VFA (~25%; $P<0.05$).

Ruminal pH was within normal values for this type of forage diet. However, mean, minimum and maximum pH measures between periods were significantly different (Table 5). The *in sacco* DM degradability of alfalfa hay varied by nearly 6% points between the highest value of 51.3 and the lowest of 45.5 ($P<0.01$; Table 6). As for VFA and ammonia, not real trend from the start to the end of the trial could be discerned.

Diet effect

Microbiological analyses

The diet effect was tested with the variable diet group. Similarly to the temporal effect presented above, each bacterial community was considered independently. Cluster analysis indicated a diet effect on the structure of the LP bacterial community (permutation test $P<0.001$; Figure 1). The dendrogram also showed a marked animal effect as samples from the forage diet clustered together in two subgroups of two animals each. Samples from the high concentrate diet had a higher within group variation, suggesting that the ecosystem reacted differently to the change in diet depending on the animal. In contrast, the epimural and the SP communities were not affected by diet ($P>0.05$). The biodiversity indices were not affected by diet changes either ($P>0.05$; Table 7).

A diet effect was observed in the number of protozoa, which was lower when animals were fed the high concentrate diet ($P<0.05$; Table 8). This reduction was due by a similar decrease in the concentration of holotrichs and entodiniomorphs. At week 16 and 20, when animals were fed again the forage diet, protozoa concentrations increased but did not reach the concentrations observed at week 4.

Biochemical analyses

No effect of diet was observed for VFA and lactate. In contrast, ammonia concentration decreased significantly when animals received the high concentrate diet and returned to its initial value when fed again the forage diet but only at the end of the trial (Table 9). As expected, a diet effect was found for the mean and the minimum ruminal pH, which decreased when animals were fed the high concentrate diet ($P<0.001$) (Table 10). The time and area

Table 7. Biodiversity indices from DGGE fingerprints of the rumen epimural, liquid- and solid-associated bacterial communities from variable diet group (n=4)

Indices ¹	Localisation ²	Time (week)					SEM	Effect ³		
		Diet ⁴						Localisation	Period	Localisation* Period
		4	8	12	16	20				
		F	HC	HC	F	F				
H	SP	2.48	2.31	2.65	2.91	2.52				
	LP	2.84	2.54	2.94	3.15	2.98	0.13	***	*	NS
	E	2.48	2.62	2.49	2.53	2.38				
e	SP	0.82	0.73	0.85	0.84	0.85				
	LP	0.85	0.81	0.85	0.88	0.87	0.02	*	NS	NS
	E	0.82	0.81	0.8	0.82	0.78				
c	SP	0.1	0.09	0.09	0.07	0.11				
	LP	0.08	0.11	0.07	0.05	0.06	0.02	*	NS	NS
	E	0.11	0.08	0.09	0.11	0.12				

¹H=Shannon's index, e=evenness, c=dominance

²SP=Solid phase; LP=Liquid phase; E=Epithelium

³NS: non significant ($P>0.05$); *: $P<0.05$; ***: $P<0.001$

⁴F=Forage; HC=High concentrate

Table 8. Count of protozoa in variable diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹
	Diet ³						
	4	8	12	16	20		
	F	HC	HC	F	F		Period
Total protozoa (log ₁₀)	5.65 ^a	4.65 ^c	4.92 ^{bc}	5.22 ^b	5.04 ^b	0.09	**
Holotrichs (log ₁₀)	4.98 ^a	3.54 ^b	3.47 ^c	3.51 ^c	3.96 ^c	0.12	***
Entodiniomorphs (log ₁₀)	5.52 ^a	4.61 ^c	4.9 ^{bc}	5.21 ^{ab}	4.99 ^b	0.09	**

¹NS: non significant ($P>0.05$); **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

³F=Forage; HC=High concentrate

Table 9. Ruminal VFA composition, lactate and ammonia concentration in variable diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹
	Diet ²						
	4	8	12	16	20		
	F	HC	HC	F	F		Period
Total VFA (mM)	93.02	79.22	80.63	89.68	104.19	11.84	NS
Acetate (mM)	64.16	48.51	51.73	63.52	64.48	7.34	NS
Propionate (mM)	16.05	19.08	14.95	14.51	17.81	2.82	NS
Butyrate (mM)	7.28	7.47	8.89	6.91	13.31	2.79	NS
Total lactate (mM)	3.13	1.15	2.41	3.62	2.56	0.82	NS
NH ₃ (mM)	10.24 ^a	5.24 ^b	5.37 ^b	6.42 ^b	9.73 ^a	0.89	*

¹NS: non significant ($P>0.05$); *: $P<0.05$

²F=Forage; HC=High concentrate

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

under pH 6.0 were also significantly higher in those periods ($P<0.01$). All of these pH parameters returned to the initial background values for a forage diet at week 16 and 20 of the experimentation. The degradation *in sacco* of alfalfa hay was affected by a high concentrate diet (Table 11). The extent and the rate of degradation decreased significantly in the high concentrate diet periods ($P<0.05$). At weeks 16 and 20, these degradation parameters were not the same as the ones observed at week 4. The degradation constant rate and the effective degradability were stimulated by the passage by high concentrate diet.

In this variable diet group, the relationship between bacterial communities and the rumen physico-chemical parameters was further explored by coinertia analysis that allowed to couple bacterial data with rumen fermentation and feed degradation characteristics. For the rumen content localisations (solid and liquid phases), the coinertia analysis showed an interaction between bacterial community structure and concurrent measures taken on pH, fermentative parameters, DM degradability and protozoa (Monte Carlo test $P\leq 0.05$; Figures 2 and 3).

However, the ellipses representing statistically the 90% confidence for the diet treatment showed an overlapping of treatments in particular for the environmental variables. In addition within the forage diet samples no subgrouping by period (4, vs 16, and 20 weeks) was evidenced depending on the period.

Discussion

This study was designed to test: a) the stability of the rumen bacterial ecosystem through time in sheep fed a forage diet and b) the capacity of the ecosystem to revert to its forage-fed structure following a high concentrate diet feeding period. PCR-DGGE is an adapted tool for monitoring, on a long period, the effects of diet on gastrointestinal ecosystems (Favier *et al.*, 2002) and it was the technique chosen in this study. Each bacterial community monitored was considered separately as they differ in their structure (Larue *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Sadet *et al.*, 2007a). These differences were also evidenced in this work.

In the constant diet group, bacterial communities, as well as protozoal numbers, were stable throughout the 5-month experiment. In contrast, temporal variations in rumen pH, fermentative and degradability parameters were observed. The changes in pH, although significant, were relatively small and probably of little biological importance. However, differences observed between periods in VFA concentration and effective feed degradability might affect animal performances. It is not discernible from this trial, whether these results, which seem in contradiction with the absence of changes, in the bacterial community were due to a decrease or increase in the bacterial function or to an insufficient sensitivity of the

Table 10. Ruminal pH parameters in variable diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹
	Diet ²						
	4	8	12	16	20		
	F	HC	HC	F	F		Period
Mean	6.44 ^a	6.02 ^b	5.87 ^b	6.69 ^a	6.75 ^a	0.11	**
Minimum	6.17 ^a	5.23 ^b	5.05 ^b	6.43 ^a	6.36 ^a	0.11	***
Maximum	6.75	6.86	6.96	7.02	7.12	0.12	NS
Time under 6.0 (h)	0 ^b	12.5 ^a	13 ^a	0 ^b	0 ^b	2.06	**
Area under 6.0 (pH x h)	0 ^b	6.41 ^a	6.63 ^a	0 ^b	0 ^b	1.73	*
Time under 5.5 (h)	0	5.5	5	0	0	1.65	NS
Area under 5.5 (pH x h)	0	2.54	1.74	0	0	0.99	NS

¹NS: non significant ($P>0.05$); *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

²F=Forage; HC=High concentrate

Table 11. *In sacco* DM degradation of alfalfa hay in variable diet group (n=4)

Item	Time (week)					SEM	Effect ¹
	Diet ²						
	4	8	12	16	20		
	F	HC	HC	F	F		Period
Undegradable fraction (A) (%)	36.18 ^a	26.04 ^b	25.21 ^b	25.54 ^b	26.25 ^b	1.69	*
Slowly degradable fraction (b) (%)	24.56 ^b	28.12 ^b	26.12 ^b	36.56 ^a	39.37 ^a	2.01	*
Degradation constant rate (c) (%.h ⁻¹)	0.08 ^{bc}	0.07 ^{cd}	0.05 ^d	0.1 ^b	0.13 ^a	0.01	**
Rapidly degradable fraction (a) (%)	39.25 ^b	45.55 ^a	48.56 ^a	37.88 ^b	34.37 ^c	1.01	***
Effective degradability (D) (%)	50.44 ^b	41.55 ^c	37.23 ^d	48.48 ^b	53.5 ^a	0.9	***

¹*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Within a row, means with different letters are significantly different ($P < 0.05$)

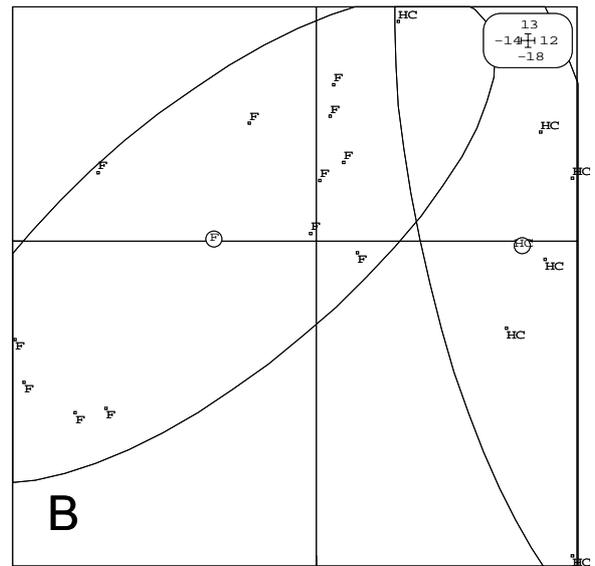
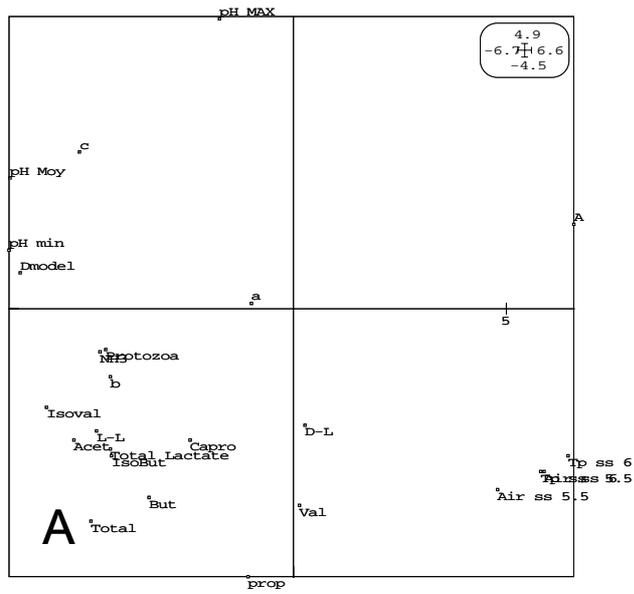
²F=Forage; HC=High concentrate

DGGE method. This technique had an abundance limit of 1% (Fromin *et al.*, 2002), and the less abundant bacteria species are underestimated.

In the variable diet group, the epimural community diversity and structure was not affected by successive diet changes. This was in accordance with a recent study based on the same molecular biology technique where lambs were fed a high concentrate (80% wheat and 20% alfalfa hay) or a forage diet (100% alfalfa hay) (Sadet *et al.*, 2007a). The SP bacterial community was also not affected. However, a diet effect was observed on the structure of the LP bacterial community, which returned to its initial “forage” state when animal were fed again alfalfa hay following the high concentrate diet. A diet effect was previously reported on LP and SP bacterial communities obtained from 100% forage-fed animals or from animals fed diets containing different proportions of cereals (80% wheat (Sadet *et al.*, 2007a) and 30% (Larue *et al.*, 2005)). The high concentrate diet’s effect on rumen content bacteria was accompanied with decreases in mean pH values and DM degradabilities of forage. These results were expected and had already been reported (Burrin & Britton, 1986; Goad *et al.*, 1998). Protozoa concentrations were also affected by the high concentrate diet; this was in accordance with the literature (Bonhomme, 1990; Dehority & Orpin, 1997). In contrast, no increase in volatile fatty acid concentration was observed with the high concentrate diet. Although in the variable diet group, an increased fermentation activity from the cereal substrate was evidenced by the low rumen pH, the failure to observe higher VFA concentrations could be due to an increase in absorption under acidic conditions (Nozière & Hoch, 2007). Among the parameters that were affected by the high concentrate diet only pH returned to its initial value four weeks after the diet perturbation. Protozoal numbers were more variable following the diet change and *in sacco* degradability of forage was indeed stimulated following the exposition to the high concentrate diet.

A coinertia analysis showed more clearly the relationship between rumen content bacterial structure and rumen protozoa and physico-chemical parameters for this group of animals. This multivariate statistical method was used to identify trends between the bacteria and the environmental data set (Culhane *et al.*, 2003). The environmental variable that explained most of the variation between diets was the pH. Another information that can be interpreted from the graphics is that the group of samples from high concentrate fed animals was less homogenous than the forage samples. Otherwise, coinertia, in this particular case, did not give any additional information than the one obtained with cluster and ANOVA analysis.

Environmental data



Bacterial data

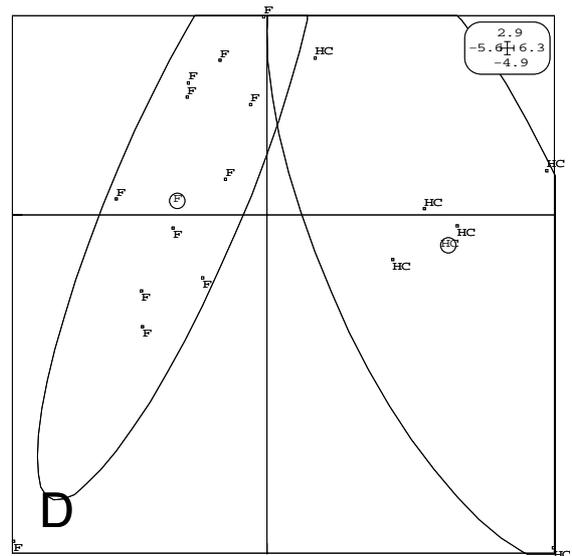
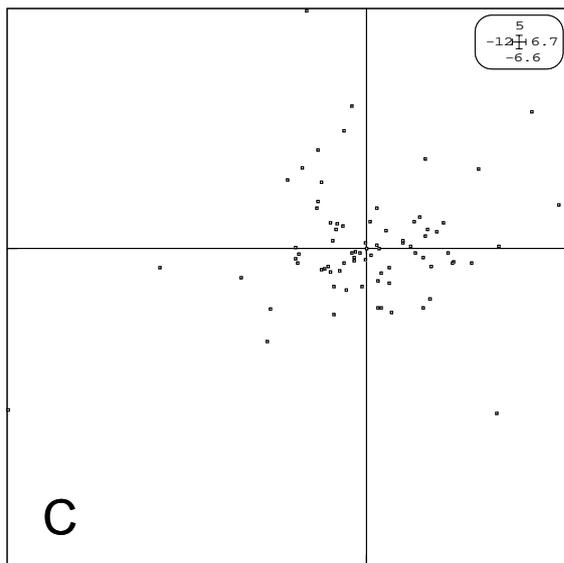


Figure 2. Factor maps (F1XF2) of the coinertia analysis on environmental variables (A, B) and bacteria species (C, D) for rumen liquid phase localisation of the variable diet group. Ellipses represent the 90% confidence for the diet treatment.

F= Forage diet; HC= High Concentrate diet.

In sacco degradation parameters: Dmodel= effective degradability; a= rapidly degradable fraction; b= slowly degradable fraction; c= degradation constant rate; A= undegradable fraction.

Fermentation parameters: D-L= D-lactate; L-L= L-lactate; Acet= acetate; But= butyrate; Prop= propionate; Val= valerate; Capro= caproate; Isobut= isobutyrate; Isoval= isovalerate; Total= total volatile fatty acids.

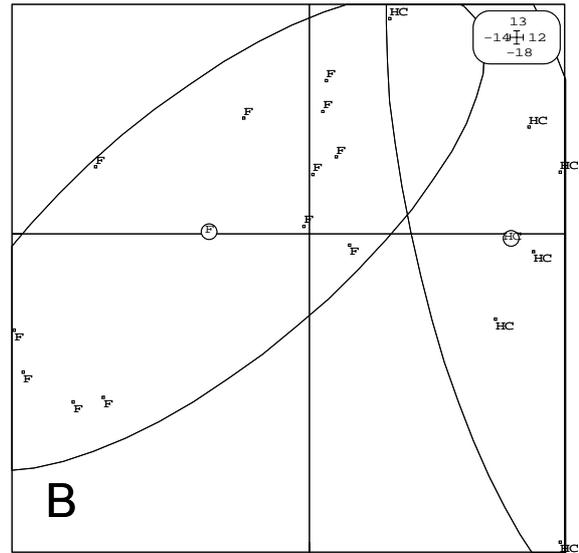
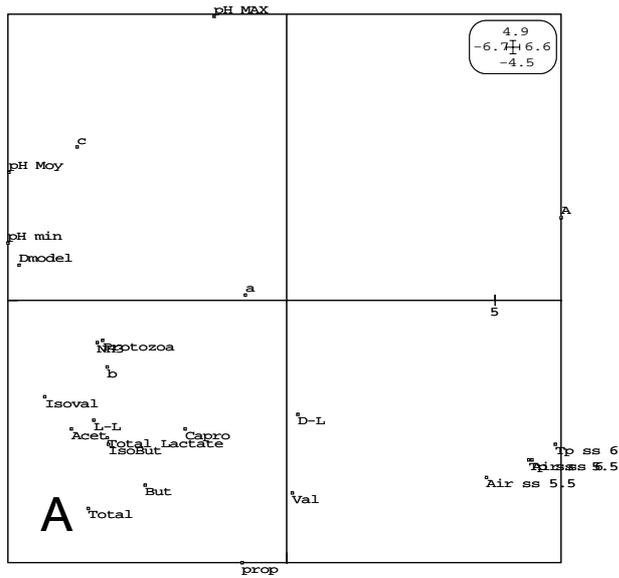
pH parameters: moy= mean; min= minimum; max= maximum; Air ss 5.5= area under 5.5; Time ss 5.5= time under 5.5; Time ss 6= time under 6; Air ss 6= area under 6.

In conclusion, the LP, SP and epimural bacterial communities of forage fed sheep were stable during five months. The LP community was the only one to be affected by a diet change, but its structure was restored when sheep were fed again the forage diet. The stability and adaptability of the bacterial communities contrast somehow with the differences observed in fermentations parameters and *in sacco* degradability. These latter results should be confirmed by additional experiments.

Acknowledgements

S. Sadet is the recipient of an INRA-Auvergne region fellowship. The authors are grateful to the personnel of the experimental unit for the care of the animal; M. Fabre for protozoa counting.

Environmental data



Bacterial data

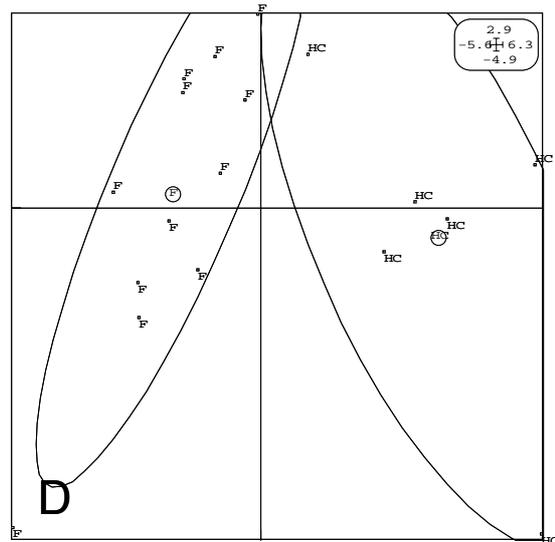
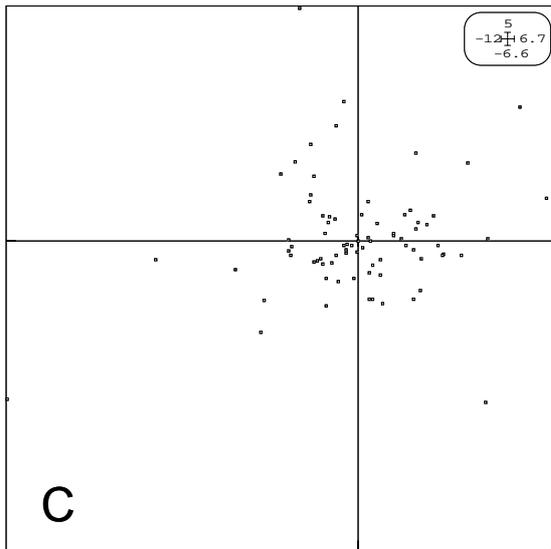


Figure 3. Factor maps (F1XF2) of the coinertia analysis on environmental variables (A, B) and bacteria species (C, D) for rumen solid phase localisation of the variable diet group. Ellipses represent the 90% confidence for the diet treatment.

F= Forage diet; HC= High Concentrate diet.

In sacco degradation parameters: Dmodel= effective degradability; a= rapidly degradable fraction; b= slowly degradable fraction; c= degradation constant rate; A= undegradable fraction.

Fermentation parameters: D-L= D-lactate; L-L= L-lactate; Acet= acetate; But= butyrate; Prop= propionate; Val= valerate; Capro= caproate; Isobut= isobutyrate; Isoval= isovalerate; Total= total volatile fatty acids.

pH parameters: moy= mean; min= minimum; max= maximum; Air ss 5.5= area under 5.5; Time ss 5.5= time under 5.5; Time ss 6= time under 6; Air ss 6= area under 6.

Chapitre expérimental 3

Effet des protozoaires sur la communauté bactérienne attachée à la paroi du rumen et celles du contenu ruminal chez le mouton

Effet des protozoaires sur la communauté bactérienne attachée à la paroi du rumen et celles du contenu ruminal chez le mouton

Introduction

Les protozoaires, avec $10^4 - 10^6$ cellules / ml de contenu ruminal, sont, après les bactéries (10^{11} cellules / ml) et les Archeae ($10^7 - 10^9$ cellules / ml), les microorganismes les plus importants, en terme de nombre, au niveau du rumen (Mackie *et al.*, 2000). Les protozoaires sont impliqués dans la dégradation et la fermentation des aliments ingérés par le ruminant (Williams & Coleman, 1997). Avec les bactéries, ces microorganismes sont souvent en compétition pour l'utilisation des substrats (Williams & Coleman, 1997). Entre protozoaires et bactéries du contenu ruminal, il existe également une relation de prédateur-proie pouvant avoir des répercussions sur la fermentation ruminale et l'utilisation des nutriments (Williams & Coleman, 1997). Chez les ovins, il a été démontré, par l'utilisation de techniques culturales, que cette prédation modifiait la proportion des différentes espèces bactériennes du rumen, ainsi que la biomasse bactérienne qui pouvait être 50 à 90% plus faible chez des animaux faunés (= avec protozoaires) que chez des animaux défaunés (= sans protozoaires) (Eadie & Hobson, 1962; Eadie & Gill, 1971; Williams & Coleman, 1997). Plus précisément, il a été observé, avec des régimes riches en amidon, que la présence de protozoaires diminuait la quantité de bactéries amylolytiques dans le rumen. En effet, les protozoaires, et plus spécifiquement les entodiniomorphes, sont connus pour ingérer les granules d'amidon (Kinoshita *et al.*, 1984), et avec eux, les bactéries amylolytiques qui s'y attachent. L'effet des protozoaires sur les bactéries cellulolytiques n'est pas clair, puisqu'il a été montré que la présence de ces microorganismes eucaryotes, dans le rumen de mouton, conduisait, selon les cas, à une diminution (Kurihara *et al.*, 1978; Williams & Withers, 1991), à une augmentation (Eadie & Hobson, 1962; Abou Akkada & El-Shazly, 1964; Eugène *et al.*, 2004) ou à l'absence de variation de la concentration bactérienne cellulolytique (Whitelaw *et al.*, 1972). L'impact des protozoaires sur les communautés bactériennes du rumen a été récemment étudié sur bovins par des techniques de biologie moléculaire. Ainsi, Ozutsumi *et al.* (2005; 2006) ont mis en évidence, par le biais de la RT-PCR et de banques de clones (312 clones séquencés), que la diversité et la composition de la communauté bactérienne du contenu ruminal étaient différentes entre animaux faunés et défaunés. D'après ces auteurs, les animaux faunés, auraient des séquences bactériennes regroupées en cinq phyla : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Actinobacteria* et

X 5

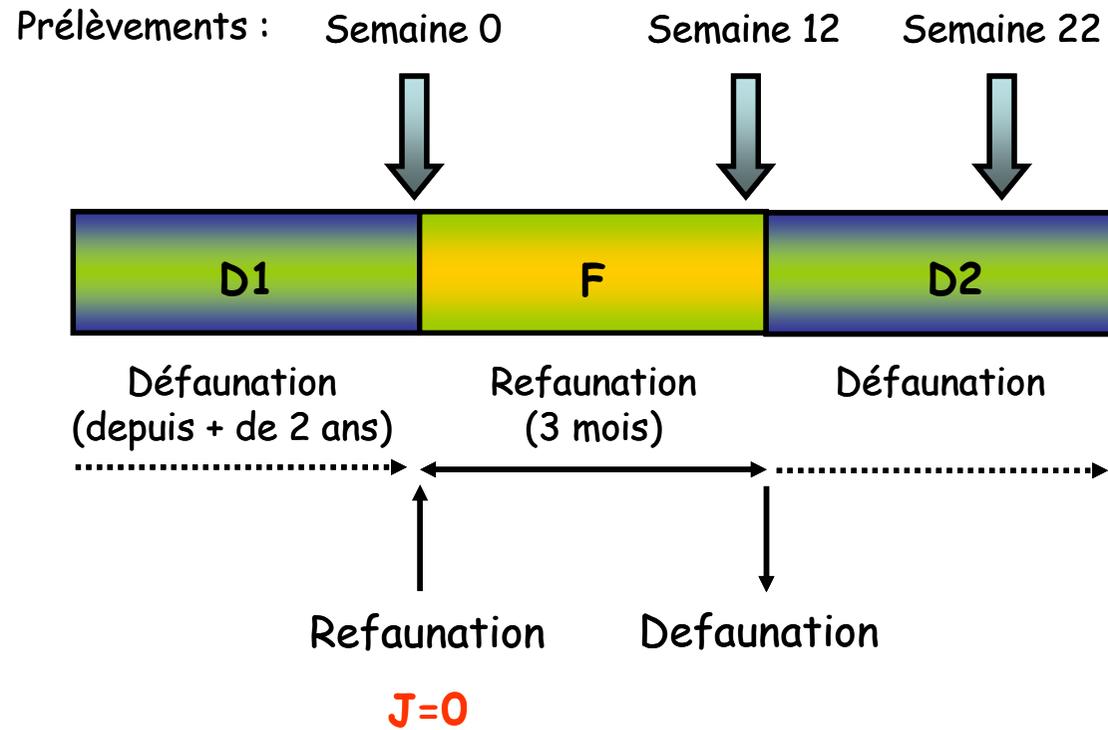


Figure 1. Schéma expérimental de l'expérimentation 4.

Les périodes D1 et D2 sont représentatives de la défaunation. La période F est représentative de la refaunation. A chacune de ces trois périodes, des prélèvements des phases liquide et solide du contenu ruminal, et de paroi ont été réalisés au niveau du rumen.

Proteobacteria. Le phylum majoritaire serait celui des *Firmicutes* (59,7%), et le nombre d'Unités Taxonomiques Opérationnelles (UTO) mis en évidence serait de 98 (31,4% des clones). Chez les bovins défaunés seuls quatre phyla seraient observés. Les *Firmicutes* seraient toujours prédominant (65,7%), en revanche, les *Actinobacteria* seraient absents (Ozutsumi *et al.*, 2006) et le nombre d'UTO observé serait de 72 (24% des clones). La présence de protozoaires dans le rumen affecterait donc la composition bactérienne du contenu ruminal, et augmenterait sa diversité bactérienne. Jusqu'à aujourd'hui aucun autre travail sur ce sujet n'a été effectué. Connaissant les différences de résultats existant entre plusieurs banques de clones réalisées sur un même échantillons (Leser *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2004), les conclusions de Ozutsumi *et al.* (2005) restent donc encore à vérifier.

La communauté épimurale aurait un rôle essentiel dans le maintien des conditions physico-chimiques du rumen via la dégradation de l'oxygène et l'hydrolyse de l'urée diffusant au travers de la paroi du rumen (Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979). Cette communauté bactérienne serait également importante dans l'absorption des nutriments en dégradant les cellules kératinisées de l'épithélium (Dinsdale *et al.*, 1980). La stabilité de la diversité de cette communauté serait donc importante pour un fonctionnement optimal du rumen. Par des techniques de biologie moléculaire, aucun protozoaire n'a pu être mis en évidence au niveau épithélial (Shin *et al.*, 2004). Cependant, par microscopie électronique, il a été montré que les protozoaires, et notamment les *Holotriches*, étaient capables de s'accrocher, à la paroi du rumen (Abe *et al.*, 1981). Le peu d'études réalisées sur ce sujet, ne permet pas encore de statuer sur l'existence de protozoaires au niveau de l'épithélium ruminal.

L'objectif de notre travail était d'étudier, par PCR-DGGE, l'effet des protozoaires sur la diversité et la structure de la communauté épimurale, validant ou non de ce fait la présence de protozoaires au niveau de l'épithélium ruminal. En parallèle, cet effet a également été observé sur les communautés bactériennes du contenu.

Matériel et méthodes

Animaux et schéma expérimental

Cinq moutons mâles, adultes, castrés et canulés au niveau du rumen, ont été utilisés dans cet essai composé de trois périodes expérimentales successives. Au début de l'expérimentation, tous les animaux étaient défaunés de longue date (plus de deux ans ; période D1). Au jour J0, les ovins ont été refaunés par inoculation d'une population mixte de 10^3 protozoaires provenant de trois moutons faunés conventionnels (période F). Douze semaines après inoculation, les animaux

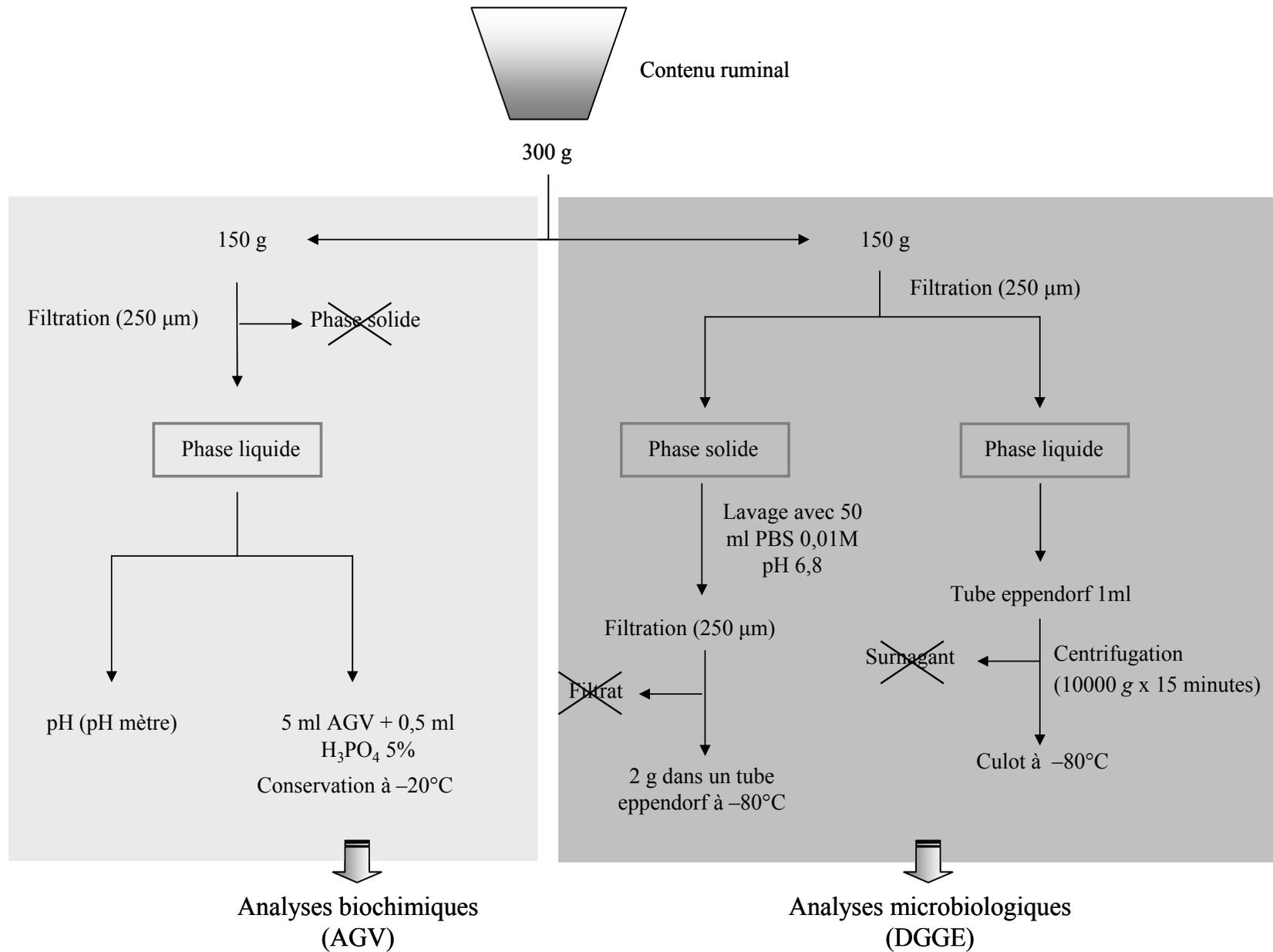


Figure 2. Traitement des échantillons de contenu ruminal en vue des analyses microbiologiques et biochimiques (expérimentation 4).

ont été à nouveau défaunés (période D2) selon la technique de Jouany & Senaud (1979). Dans ce schéma expérimental, chaque animal était son propre témoin (Figure 1).

Pendant toute la durée de l'expérimentation les animaux ont reçu une fois par jour, une ration d'entretien composée de 700 g de foin de luzerne, 200 g de foin de prairie et 300 g de grain de maïs.

Prélèvements pour les analyses microbiologiques et biochimiques

Des prélèvements d'épithélium et de contenu ruminal ont été réalisés à J0 avant inoculation des protozoaires, puis douze semaines après la refaunation, et enfin dix semaines après la nouvelle défaunation. Des analyses microbiologiques et biochimiques ont ensuite été effectuées à partir de ces prélèvements.

Les prélèvements de papilles ruminales ont été réalisés, pour chaque période expérimentale, dans l'aire latérale du rumen, via la canule, par biopsie en utilisant une pince et une paire de ciseaux stériles. Avant biopsie, la paroi ruminale a été lavée à l'aide d'une pissette contenant une solution saline, stérile, de tampon phosphate (PBS) 0,01 mol/l, pH 6,8. Après prélèvement, les papilles ont été mises dans des tubes cryogéniques et plongées directement dans l'azote liquide. Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à analyse de la diversité bactérienne.

Au même moment, environ 150 g de contenu ruminal ont été prélevés et filtrés via une membrane en nylon (250 μm). Trois aliquotes de 1 ml de filtrat ont été déposés dans des microtubes puis centrifugés ($10000 \times g$, 10 min, 4°C). Le surnageant a été éliminé et le culot conservé à -80°C en attendant les analyses microbiologiques. Ce culot correspondait à la phase liquide (PL) du contenu ruminal. La fraction solide restant sur la membrane en nylon a été lavée deux fois avec 50 ml de PBS 0,01 mol/l, pH 6,8, puis filtrée comme décrit précédemment. Trois aliquotes de 2 g ont été déposées dans des microtubes et conservées à -80°C en attendant les analyses microbiologiques. Ces échantillons correspondaient à la phase solide (PS) du contenu ruminal (Figure 2).

En parallèle, environ 150 autres grammes de contenu ruminal ont été filtrés sur une membrane en nylon (250 μm). Cinq ml de filtrat ont été ajoutés à 0,5 ml de H_3PO_4 5% (v/v) pour l'analyse des acides gras volatiles (AGV). Le pH a également été mesuré sur ce filtrat (Figure 2).

Analyses microbiologiques

Extraction d'ADN et PCR

L'ADN provenant des échantillons de la paroi et du contenu ruminal a été extrait selon le protocole prescrit par Yu et Morrison (2004).

La région V3 de l'ADNr 16S bactérien a été amplifiée par PCR en utilisant les amorces 341f- (5' – CCTACGGGAGGCAGCAG – 3') et 534r (5' – ATTACCGCGGCTGCTGG – 3'). L'amorce sens possédait un GC clamp à son extrémité 5' (Muyzer *et al.*, 1993). Le mix PCR (50 µl) contenait 1× de tampon PCR, 1,5 mmol/l de MgCl₂, 200 µmol/l de chaque dNTP, 0,25 µmol/l de chaque amorce et 2,5 U HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). Le programme PCR était le suivant: une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min; suivit de 10 cycles « touchdown » à 94°C pendant 30 s, 61°C (- 0,5°C/cycle) pendant 30 s, et 72°C pendant 1 min; 25 cycles à 94°C pendant 30 s, 56°C pendant 30 s, et 72°C pendant 1 min; et une étape d'élongation finale de 72°C pendant 30 min afin d'éliminer de potentiels artefacts dues aux doubles bandes (Janse *et al.*, 2004).

Tous les produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium, afin de contrôler leur taille et d'estimer leur concentration en utilisant un Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA).

DGGE

Des gels de polyacrylamide à 8% ont été préparés avec un gradient de dénaturation (urée formamide) compris entre 40% et 60%. Une solution d'acrylamide à 100% de dénaturation est définie par 7 mol/l d'urée et 40% (v/v) de formamide (Muyzer *et al.*, 1993). Environ 100 ng de produit PCR ont été déposés dans chaque puit. Le gel a ensuite été plongé dans une cuve DGGE-2001 (CBS Scientific Co, Solana Beach, USA) contenant du tampon TAE à 0,5 × (40 mmol/l Tris base, 40 mmol/l acide acétique glacial, 1 mmol/l EDTA). La migration a été effectuée pendant 5 h à 60°C en utilisant un voltage fixé à 200 mV. Les gels ont ensuite été colorés à l'argent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Dans le premier chapitre expérimental de cette thèse, il a été montré que les communautés bactériennes de la paroi, et des phases liquide et solide du contenu ruminal étaient distinctes en terme de structure. De ce fait, pour limiter de potentiels effets gels pouvant masquer, dans notre cas, l'effet de la défaunation ou de la refaunation sur les communautés bactériennes du rumen, nous avons choisi d'observer séparément les bactéries attachées à la paroi du rumen, de celles des phases liquide et solide du contenu ruminal. Pour chaque communauté, trois gels ont été réalisés. Afin de pouvoir comparer les gels entre eux, un même échantillon appelé standard, a été déposé sur l'ensemble des gels.

Comptage des protozoaires

Les protozoaires ont été dénombrés pour chaque période (F, D1 et D2) sur cellules de Dolfuss (Elvetec Services, Clermont-Ferrand, France) selon le protocole décrit par Jouany and Senaud (1982).

Analyses biochimiques

L'analyse des AGV a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CP9002 gas chromatography, Chrompack, Middleburg, The Netherlands) en utilisant l'acide crotonic comme standard interne (Morgavi *et al.*, 2003).

Analyses statistiques*Analyse des gels de DGGE*

Les images représentatives des différents gels de DGGE ont été acquises en utilisant un scanner calibré en densité optique (ImageScanner, GE Healthcare, Piscataway, USA) avec une résolution de 400 dpi.

L'analyse des gels de DGGE a été réalisée par le logiciel GelCompar II version 4.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Pour chaque profil, le nombre total de bandes (S), la surface du pic relative à chaque bande (n_i) et la somme de toutes les surfaces des pics de toutes les bandes (N) ont été pris en compte (Fromin *et al.*, 2002). A partir de ces informations, trois indices de biodiversité ont été calculés : i) l'indice de Shannon's (H) dont la formule est $H = - \sum (n_i/N) \ln (n_i/N)$; ii) la dominance (c) dont la formule est $c = \sum (n_i/N)^2$; et iii) la régularité (e) dont la formule est $e = H/\ln S$ (Odum, 1971).

A partir de ces trois indices, une analyse de variance a été réalisée via la procédure MIXED en mesure répétée du logiciel SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA). Le modèle statistique comprenait l'animal comme facteur aléatoire et le traitement (D1, F et D2) en mesure répétée. Les différences ont été déclarées significatives à $P < 0,05$.

Le logiciel GelCompar II a été utilisé pour normaliser et comparer les différents profils de DGGE. Le clustering a été utilisé pour regrouper les échantillons les plus proches (Fromin *et al.*, 2002). Les images de gels de DGGE ont été "matchées" en utilisant toujours un même échantillon comme standard interne. Les bandes ont été quantifiées après suppression du bruit de fond. Une tolérance de 1% sur la position de la bande a été appliquée. La similarité entre profils a été calculée via le coefficient de corrélation de Pearson. Le clustering a été réalisé par la méthode unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). Un test de

Tableau 1. Indices de biodiversité obtenus pour la communauté bactérienne attachées à la paroi du rumen, et celles des phases liquide et solide du contenu ruminal.

Communautés bactériennes	Indices ¹	Période ²				Effet période ³
		F	D1	D2	ESM	
Paroi	H	2,7	2,58	2,74	0,131	NS
	e	0,88	0,91	0,93	0,018	NS
	c	0,08	0,07	0,08	0,013	NS
Phase solide	H	1,55	1,56	1,57	0,041	NS
	e	0,95	0,95	0,95	0,005	NS
	c	0,03	0,03	0,03	0,004	NS
Phase liquide	H	1,53	1,58	1,48	0,051	NS
	e	0,95	0,96	0,95	0,005	NS
	c	0,03	0,03	0,04	0,004	NS

¹H= indice de Shannon ; e= indice de régularité ; c= indice de dominance.

²F= période de refaunation ; D1=période de défaunation longue ; D2=période de défaunation courte.

³NS: $P > 0,05$

permutation (ou de Monté Carlo) (Kropf *et al.*, 2004) a été réalisé (procédure PROC IML SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA) à partir de la matrice de corrélation de Pearson générée du cluster. Ce même test a été appliqué aux standards pour tester l'effet gel, qui s'est avéré non significatif ($P > 0,05$). Le pourcentage de similarité des standards entre gels regroupant, séparément, des échantillons de paroi, de PL et de PS était respectivement de 58,61%, 75,90% et 74,45%.

Analyse des paramètres physico chimiques

Les résultats de concentration en AGV et de pH ruminal ont été analysés via la procédure MIXED en mesure répétée du logiciel SAS v8 (SAS Inst. Inc., Cary, USA). Comme précédemment, le modèle statistique comprenait l'animal comme facteur aléatoire et le traitement (D1, F et D2) en mesure répétée. Les différences ont été déclarées significatives à $P < 0,05$.

Résultats et Discussion

Le comptage des protozoaires a confirmé l'absence de ces microorganismes pour les périodes de défaunation D1 et D2. Après refaunation (période F), le nombre de protozoaires était de 7×10^5 cellules / ml de jus de rumen, valeur comparable à celles trouvées dans la littérature pour des animaux conventionnels (Williams & Coleman, 1997). Pour les trois communautés bactériennes du rumen, les indices de biodiversité n'ont montré aucune différence entre les deux périodes de défaunation D1 et D2 ($P > 0,05$). De ce fait, dans les paragraphes qui vont suivre, nous parlerons de défaunation au sens large sans faire la distinction entre les périodes D1 et D2. Dans notre étude, les indices de biodiversité de Shannon (H), de régularité (e) et de dominance (c), calculés à partir des profils de DGGE de la communauté épimurale, étaient comparables en présence ou en absence de protozoaires ($P > 0,05$) (Tableau 1). La réalisation d'un cluster, ainsi que d'un test de permutation, sur l'ensemble des échantillons de paroi prélevés (Figure 3) a également montré l'absence d'effet des protozoaires sur la communauté épimurale ($P > 0,05$). D'après notre étude, la présence de protozoaires n'aurait donc aucune incidence sur la diversité et la structure de la communauté épimurale. On peut supposer que l'attachement des bactéries au niveau de la paroi ruminale rend plus difficile leur prédation par les protozoaires qui ingèrent plus facilement les bactéries libres ou associées aux particules alimentaires du contenu ruminal. Ceci est en accord avec une étude récente basée sur l'utilisation de banques de clones montrant l'absence de protozoaires au niveau de l'épithélium ruminal (Shin *et al.*, 2004). Cette absence de protozoaires au niveau de la paroi est en revanche contestée par une étude plus ancienne,

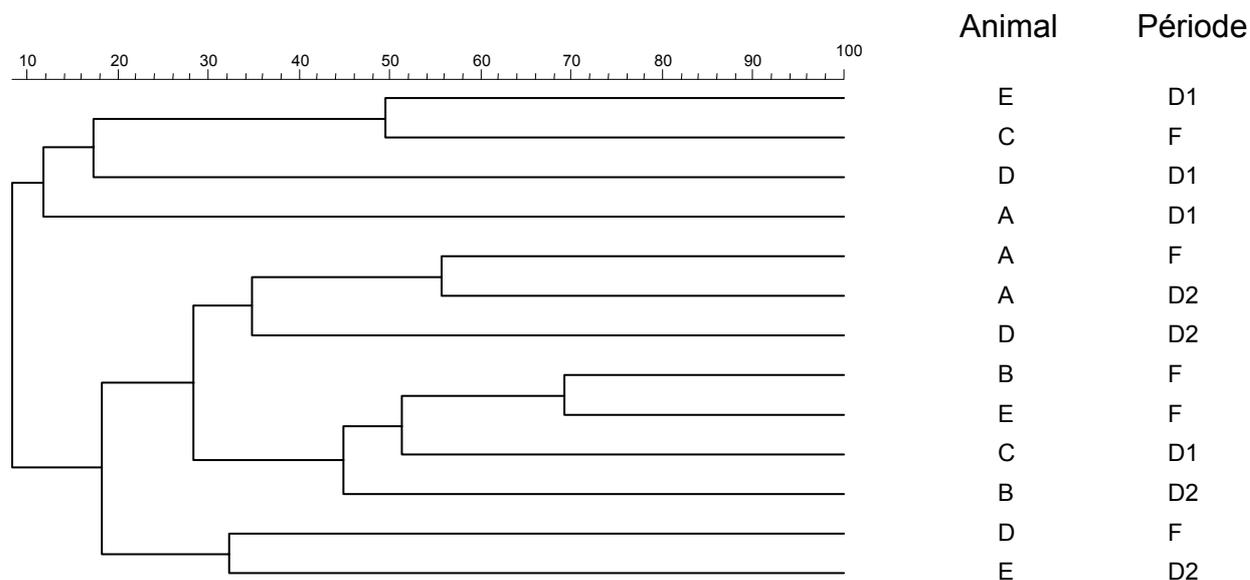


Figure 3. Dendrogramme réalisé par la méthode des UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages). Les échantillons représentés proviennent de la paroi du rumen de cinq moutons ayant reçu le même régime. Les périodes D1 et D2 sont représentatives de la défaunation. La période F est représentative de la refaunation.

Tableau 2. Effet des protozoaires sur la concentration des acides gras volatils dans le rumen.

AGV	Période ¹			ESM	Effet Période ²
	F	D1	D2		
AGV totaux (mM)	113,31	99,07	102,24	12,61	NS
Acetate (mM)	75,84	66,11	67,68	9,77	NS
Propionate (mM)	14,59 ^b	20,78 ^a	19,85 ^a	2,01	**
Butyrate (mM)	12,54	8,62	8,03	1,3	0,06
Valérate (mM)	1,2	1,04	0,87	0,13	NS
IsoAGV (mM)	6,5	4,51	5,63	0,48	NS
Acétate / Propionate	3,57	4,5	3,48	0,24	NS

¹F=période de refaunation ; D1=période de défaunation longue ; D2=période de défaunation courte.

Dans les lignes, les moyennes avec des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,05$)

²NS: $P > 0,05$; **: $P < 0,01$.

montrant par microscopie électronique que les protozoaires, et notamment les *Holotriches*, sont capables de s'accrocher, à la paroi du rumen (Abe *et al.*, 1981) et donc potentiellement d'ingérer les bactéries attachées à cet épithélium. Dans notre étude, il est également possible qu'une prédation ait lieu, mais que son effet sur la diversité de la communauté épimurale soit trop faible pour être détecté par DGGE.

Dans notre expérimentation, la présence de protozoaires, au niveau des phases liquide et solide du contenu ruminal, n'a eu aucun effet sur les trois indices de biodiversité H, e et c ($P > 0,05$) (Tableau 1). L'analyse de la structure des communautés bactériennes des phases liquide et solide du contenu ruminal (par cluster et test de permutation) a également montré l'absence d'effet des protozoaires sur ces communautés bactériennes (Figure 4) ($P > 0,05$) suggérant l'absence de prédation des bactéries par les protozoaires au niveau du contenu ruminal. Ceci peut paraître surprenant sachant qu'un protozoaire peut ingérer 10^5 cellules bactériennes par heure (Williams & Coleman, 1997). De plus, dans la littérature, il a été montré que l'élimination des protozoaires conduisait à une augmentation de la concentration bactérienne (Eadie & Hobson, 1962; Eadie & Gill, 1971) et plus précisément, à l'obtention d'une diversité bactérienne moindre au niveau de la phase liquide (Ozutsumi *et al.*, 2005; Ozutsumi *et al.*, 2006). Dans notre étude, l'absence de modification, au niveau de la diversité bactérienne du contenu ruminal, peut signifier que cette prédation a lieu, mais qu'elle est non sélective (Williams & Coleman, 1997) et que, de ce fait, elle n'affecte pas la structure des communautés bactériennes.

La concentration en AGV totaux (105 mM en moyenne) était la même en présence ou en l'absence de protozoaires ($P > 0,05$). En revanche, la concentration en propionate était significativement plus faible en présence de protozoaires ($P < 0,01$) (Tableau 2). La concentration en butyrate, elle, avait tendance à augmenter chez les animaux faunés ($P = 0,06$) (Tableau 2). Les résultats obtenus sur ces deux AGV sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature au niveau du contenu ruminal en présence de protozoaires (Williams & Coleman, 1997).

Pour conclure, dans notre étude, un effet des protozoaires sur certains paramètres fermentaires a pu être observé, alors que les trois communautés bactériennes du rumen, en terme de diversité et de structure, étaient comparables, d'une part entre D1 et D2, et d'autre part, entre animaux défaunés et refaunés. Pour les bactéries du contenu ruminal, l'absence d'effet des protozoaires sur la diversité bactérienne peut s'expliquer par une prédation non sélective. Pour les bactéries attachées à la paroi du rumen, l'absence d'effet des protozoaires peut s'expliquer par le fait que cette communauté bactérienne n'interagit pas avec les ciliés ou bien que la DGGE n'est pas assez sensible pour mettre en évidence les changements existants. L'utilisation d'une technique

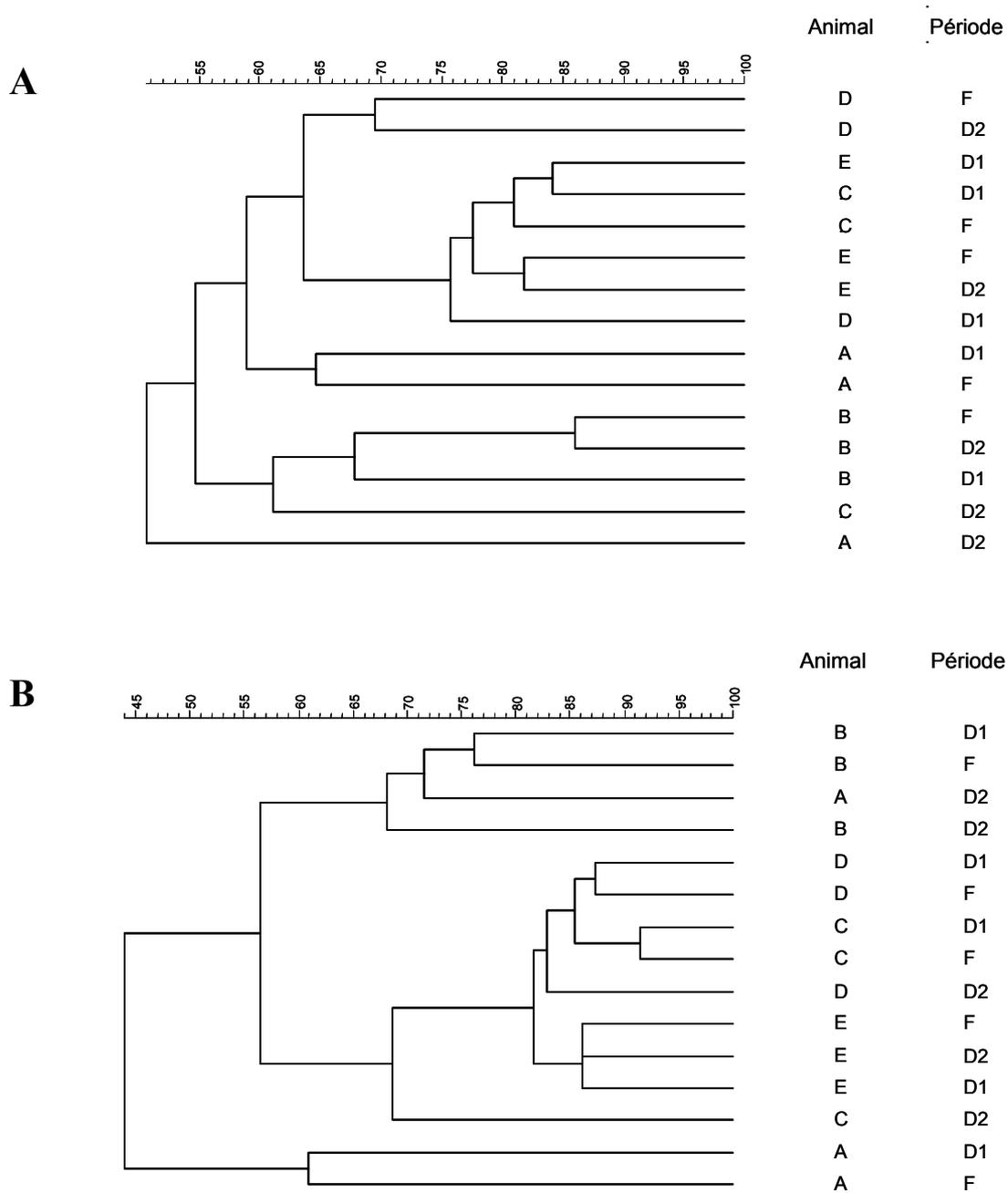


Figure 4. Dendrogrammes réalisés par la méthode des UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages). Les échantillons représentés proviennent de la phase liquide (**A**) ou de la phase solide (**B**) du contenu ruminal de cinq moutons ayant reçu le même régime. Les périodes D1 et D2 sont représentatives de la défaunation. Les périodes F sont représentatives de la refaunation.

plus sensible et plus reproductible comme l'Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA) aurait peut être permis de voir un effet des protozoaires sur cette communauté.

Chapitre expérimental 4

Caractérisation de la composition bactérienne de la communauté épimurale

Publication 4

Abundance of *Proteobacteria* and of opportunistic pathogens in the bacterial community associated to the rumen epithelium

(FEMS Microbiology letters, Soumis)

Abundance of *Proteobacteria* and of opportunistic pathogens in the bacterial community associated to the rumen epithelium

Sophie Sadet, Cécile Martin, and Diego P. Morgavi

INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

Corresponding author: D.P. Morgavi. E-mail: morgavi@clermont.inra.fr

Running headline: Rumen epithelium bacterial community

Summary

The aim of this work was to describe the bacterial community attached to the rumen epithelium and assess whether a cereal-rich diet used in modern, intensive ruminant production systems affects its diversity. Three 16S rDNA gene libraries of about forty clones each were prepared from epithelial samples taken from a wether fed sequentially alfalfa hay, a cereal-rich (65% wheat) diet, and again alfalfa hay. No overt effect of diet was observed on the bacterial types detected, which were in general different from those commonly found in rumen contents. *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, and *Proteobacteria* were the predominant phyla. In contrast to the bacteria present in the gastrointestinal contents the community attached to the rumen epithelium had a high proportion (13%) of *Proteobacteria*. Up to 26% (32 out of 120) of the clones were similar to bacteria potentially pathogenic, notably *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* suggesting that the rumen epithelium may have a role more important than previously thought as a reservoir of undesirable bacteria.

Keywords Rumen bacteria, rumen epithelium, bacterial community; *Proteobacteria*; opportunistic pathogen, *Campylobacter*

Introduction

Information on the bacteria attached to the rumen epithelium or epimural community is fragmented and incomplete as compared to the bacterial community of rumen content which has been extensively characterized. Earlier works, using electron microscopy and cultural methods identified the distinctiveness of some of these epimural bacteria (Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979). More recent reports based on cloning and sequencing of the 16S rDNA gene reinforced the notion that this community differ from that of the rumen content (Mitsumori *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006). However, the data from these latter works are somehow contrasting. In both cases a cow fed a mixed diet was used as a donor, but while Cho *et al.* (2006) using a universal bacterial primer reported that the *Bacteroidetes* and, to a lesser extent, the *Firmicutes* were the only two phyla represented in this community, Mitsumori *et al.* (2002), using methanotroph-specific 16S rDNA primers, exposed a high diversity of bacteria affiliated to the *Proteobacteria* phylum.

The rumen epithelium may be a reservoir of pathogenic bacteria. Presence of pathogens such as *Fusobacterium necrophorum* in the rumen wall is more frequently observed in animals receiving cereal-rich diets (Nagaraja *et al.*, 2005) as inflammation of the epithelium induced by the acidic environment favors the colonization by this bacterium (Takayama *et al.*, 2000). The relationship between diet and colonization of the rumen epithelium by this well characterized pathogen has been well demonstrated. However, it is less clear whether other bacteria attached to the rumen are affected by an acidogenic diet and whether diet affects the relative proportion of potential pathogens. In this work the phylogenetic diversity of the bacterial epimural community in the rumen of sheep was evaluated under two different dietary conditions, forage or a cereal-rich diet.

Material and methods

Animal and sample collection

Samples were taken from a 2-year old rumen-cannulated Texel wether fed alfalfa hay for four weeks (H1 period), a high concentrate diet (65% pelleted ground wheat and 35% alfalfa hay; DM basis) during the 8 following weeks (C period), and then switched back to alfalfa hay for the last 8 weeks of the study (H2 period). The wether was housed in an individual stall (1.00 × 1.50 m) and had free access to water and a salt lick block. Feeds were offered daily in two equal parts at 0800 h and 2000 h. This study was part of a larger trial in which the effect of time and diet on rumen fermentation characteristics were monitored over a 20-week period. Ethics approval (CE 5-06) was obtained from the Auvergne Regional Committee of Ethics in

Animal Experimentation and was in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture (Anonymous 1988).

Samples from the rumen epithelium were taken from the left ventral lateral area of the rumen that was accessed through the fistula. The structure of the bacterial community from this rumen area was not different from that of other areas of the rumen, *e.g.*, dorsal and ventral sacs (Sadet *et al.*, 2007a) and was therefore preferred because it allowed repeated sampling on the same animal. Sampling of rumen epithelium was done at week 4, 12, and 20 before the morning feeding. The sampling area was washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) 0.01 mol l⁻¹, pH 6.8. Papillae were taken with the help of sterile tweezers and scissors. Epithelial samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing.

Sample analysis

DNA extraction and PCR amplification

Total DNA was extracted from samples as described by Yu and Morrison (2004). The 16S rDNA bacterial gene was amplified by PCR with primers F8- (5' – AGAGTTTGATCMTGGCTC – 3') and 1492r (5' – GNTACCTTGTTACGACTT – 3') targeting the 16S rDNA bacterial gene (Weisburg *et al.*, 1991). The PCR mixture (50 µl) contained 1× PCR buffer, 3.75 mmol l⁻¹ MgCl₂, 300 µmol l⁻¹ of each dNTP, 0.3 µmol l⁻¹ of each primer and 1 U HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). PCR was performed with an initial denaturation step of 95°C for 15 min; followed by 25 cycles of 94°C for 30 s, 52°C for 1 min 30 s, and 72°C for 2 min; and a final elongation step of 72°C for 30 min. PCR products were electrophoresed on 2 % agarose gels containing ethidium bromide to check their size and estimate their concentration using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) and an imaging system (Chemimager; Alpha Innotech, San Leandro, USA).

Clone libraries

PCR products were cloned into *E. coli* TOP10 Chemically Competent cell using a pCR[®]4-TOPO[®] vector (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions to produce a library from each of the three samples. DNA from randomly picked clones was amplified using the same primers and PCR conditions as described above. PCR products were purified with QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced. The absence of chimeras in the sequences was checked using the program CHECK-CHIMERA (Larsen *et al.*, 1993). Sequences were subjected to blast searches

Table 1. Characterization of 16S rDNA gene clones from bacteria attached to the rumen epithelium of a wether fed forage (H1 and H2) and a concentrate (C; 65:35, wheat:forage) diet

Nearest known bacterium ^a	Number of clones per period ^b			Pathogen ^c	
	H1	C	H2		
Firmicutes	20	16	19		
<i>Anaerovorax odorimutans</i>	-	-	1	(0, 1)	-
<i>Anaeroplasma varium</i>	-	1	-	(0, 0)	-
<i>Eubacterium</i>	2	-	-	(0, 2)	+
<i>Sulci</i>	2	3	3	(0, 5)	+
<i>Solobacterium moorei</i>	-	2	2	(0, 0)	+
<i>Mogibacterium pumilum</i>	-	-	2	(0, 2)	+
<i>Butyrivibrio</i>					
<i>Fibrisolvens</i>	4	-	1	(0, 5)	-
<i>Hungatei</i>	5	-	-	(0, 5)	-
<i>Holdemania filiformis</i>	1	-	-	(0, 0)	-
<i>Succiniclasticum ruminis</i>	-	1	-	(0, 0)	-
<i>Parasporobacterium paucivorans</i>	1	-	-	(0, 0)	-
<i>Ruminococcus productus</i>	-	-	1	(0, 0)	-
<i>Clostridium</i>					
<i>Lactatifermentans</i>	-	1	-	(0, 1)	+
<i>Xylanovorans</i>	-	1	-	(0, 1)	+
<i>Paraputrificum</i>	-	1	-	(0, 1)	+
<i>Syntrophococcus sucromutans</i>	-	1	-	(0, 1)	-
Other <i>Firmicutes</i>	5	5	9		
Proteobacteria	7	4	5		
<i>Acidovorax</i>	-	-	1	(0, 1)	-/+ ^d
<i>Eikenella corrodens</i>	-	1	1	(0, 2)	+
<i>Campylobacter hyointestinalis subsp hyointestinalis</i>	6	2	-	(8, 0)	+
<i>Suttonella indologenes</i>	1	-	-	(0, 1)	+
<i>Brachymonas denitrificans</i>	-	-	1	(1, 0)	-
<i>Pelobacter acetylenicus</i>	-	-	1	(0, 0)	-
Other <i>Proteobacteria</i>		1	1		
Bacteroidetes	13	21	13		
<i>Prevotella</i>	2	2	-	(0, 1)	-
<i>Ruminicola</i>	1	14	1	(1, 0)	-
<i>Oralis</i>	2	-	-	(0, 0)	-
<i>Brevis</i>	-	-	1	(0, 0)	-
<i>Loescheii</i>	-	-	1	(0, 0)	-
<i>Pontibacter actiniarum</i>	1	-	-	(0, 0)	-
<i>Pedobacter terricola</i>	-	-	1	(0, 0)	-
<i>Barnesiella viscericola</i>	-	3	-	(0, 0)	-
Other <i>Bacteroidetes</i>	7	2	9		
Spirochaetes			1		
<i>Treponema refringens</i>	-	-	1	(0, 1)	+
TM7			1		-

^aTaxonomic assignment is based on the closest culturable isolate identified by BLAST.

^bValues in parentheses represent the number of clones whose sequences are ≥ 97 and $\geq 90\%$ (italics) identical to the bacterial species listed.

^cKnown pathogen or reported to be more prevalent in disease.

^dOnly one literature report of an *Acidovorax* sp. associated to disease.

(BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequences were deposited at the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers AM884023 to AM884142.

Results and Discussion

Due to the relatively high individual variation reported for the rumen microbial ecosystem (Edwards *et al.*, 2005; Sadet *et al.*, 2007a) we choose to use a single animal to facilitate the interpretation of the effect of diet on the epimural community. Samples for library construction were taken from a wether that was subjected to successive periods of feeding a forage diet, a cereal-rich diet, and back to the forage diet. The wether, which did not have any health problem throughout the trial, had a mean daily rumen pH of 6.45, 5.78, and 6.76 for the H1, C, and H2 periods, respectively. For the H periods the pH was never below 6.0. For the C period, the rumen remained 3 h daily under a $\text{pH} \leq 5.5$. Forty, 41, and 39 clones were sequenced from the H1, C, and H2 libraries, respectively. The 120 sequences obtained showed a similarity of 88% or higher to other sequences deposited in the NCBI database with the vast majority of best “hits” originating from rumen clones. However, only 10 clones (about 8%) were $\geq 97\%$ identical to cultured bacterial species with another 30 clones (25%) that were $\geq 90\%$ identical to known bacteria (Table 1).

The sequences were assigned to five different phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, and the candidate phylum TM7 being the first two the predominant ones representing 85% of the total. In the two forage diet periods *Firmicutes* represented nearly 50% of the total population and *Bacteroidetes* were about 35 %, while in the concentrate-rich diet feeding period these percentages were inversed (Figure 1). This shift was largely driven by the increase in *Prevotella* clones observed in period C. These two phyla have also been found in the rumen epithelium (Cho *et al.*, 2006) although the *Bacteroidetes* predominated at 94% of the total. These authors used a different animal type; a cow fed a mixed rice hull and concentrate diet and a different set of primers to amplify the 16S rDNA gene that may explain the discrepancy with our results. The ratio of *Firmicutes* to *Bacteroidetes* that we found in the forage regime was similar to that reported by Yu *et al.* (2006) for the rumen content community of a sheep fed a similar diet. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the most important phyla found in digestive rumen contents and, more generally, in the gastrointestinal tract of mammals (Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 1999; Daly *et al.*, 2001; Cotta *et al.*, 2003; Eckburg *et al.*, 2005; Larue *et al.*, 2005; Ley *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006).

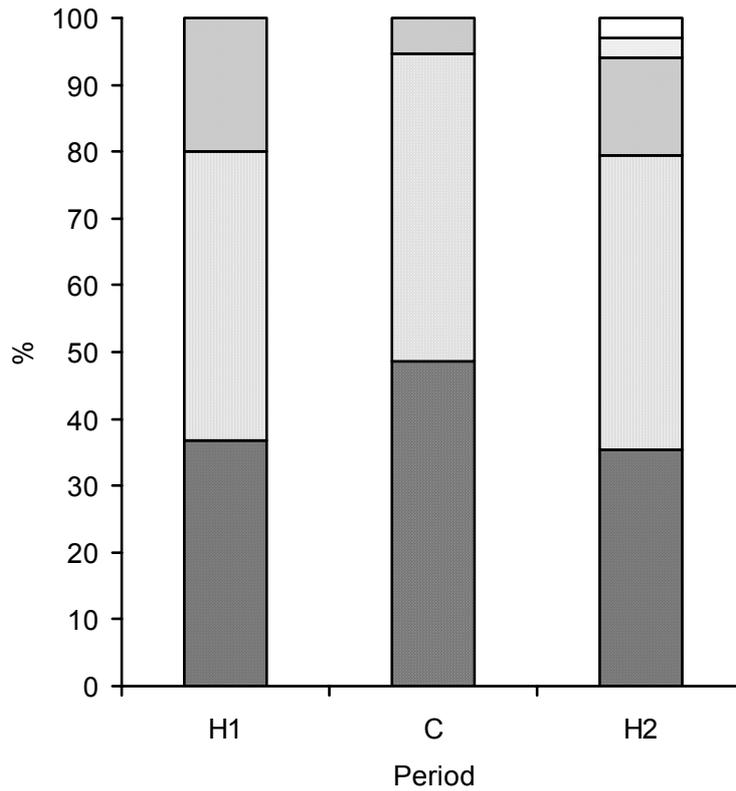


Figure 1. Relative proportion of phyla found in the bacterial community attached to the rumen epithelium of a wether fed forage (H1 and H2) and a concentrate (C; 65:35, wheat:forage) diet. *Bacteroidetes* ■, *Firmicutes* ■, *Proteobacteria* ■, *Spirochaetes* ■, and TM7 □ . n= 39, 41, and 40 for H1, H2, and C periods, respectively.

The other three phyla represented in our libraries were the *Proteobacteria* at 13% of the sequences, the *Spirochaetes*, and the candidate phylum TM7. These last two were the less abundant with just a single (< 1% of the total) representative sequence from each. Diet seemed not to have any influence on the relative proportion of *Proteobacteria* nor on the bacterial types detected. The proteobacteria are also present in rumen contents but they are proportionally less important; less than 4% of the total community belong to this phylum (Whitford *et al.*, 1998; Tajima *et al.*, 1999; Larue *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006). The presence of trace amounts of oxygen diffusing through the rumen epithelium may favor a higher density of proteobacteria as many members of this phylum are microaerophiles or facultative anaerobes and hence not sensible to oxygen toxicity. Indeed, oxygen consumption by the epimural community is thought to be beneficial to the strict anaerobes of the rumen microbial ecosystem (Cheng *et al.*, 1979).

At the genera level the epimural community clones were generally not affiliated to the most abundant phylotypes reported in the rumen content biotope (Stewart *et al.*, 1997). The exception being the clones affiliated to *Prevotella* and *Butyrivibrio*, although even for these clones the percentage of similarity was in most cases below the 95% threshold level. This low resemblance in the bacterial types found in the rumen epithelium as compared to rumen contents is in agreement with previous works using microscopy (Bauchop *et al.*, 1975), cultivation (Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979), and fingerprinting (Sadet *et al.*, 2007a) approaches. Mitsumori *et al.* (2002) using methanotroph-specific primers also highlighted the difference between the rumen fluid and the rumen epithelium for the proteobacterial community. A striking feature of our clones was the closeness of many of them to genera defined as potential or opportunistic pathogens. A total of 32 clones (~26 % of the total) fell within this category. Most clones affiliated with the *Proteobacteria* are potentially pathogenic, similarly to some clones affiliated with the *Firmicutes*. In contrast, none of the *Bacteroidetes* clones have this characteristic.

Several clones were $\geq 97\%$ identical to *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* (Table 1). This bacterium is known to cause gastrointestinal illness in humans (Altekruse & Swerdlow, 2002) and pigs (Gebhart *et al.*, 1983). In ruminants, it has been found in feces and gastrointestinal contents of cattle (Grau, 1988; Inglis *et al.*, 2004) and in deer suffering chronic diarrhea (Hill *et al.*, 1987). Although *C. jejuni* and *C. lanienae* were the most abundant Campilobacteria shed by cattle (Inglis *et al.*, 2004), *C. hyointestinalis* was isolated in higher number from rumen contents than *C. jejuni* (Grau, 1988). The capacity of *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* to colonize the rumen epithelium as evidenced by the

several clones isolated in this work is in agreement with its higher prevalence in ruminal contents.

In addition to *Campylobacter*, several other clones similar to bacteria associated to infections in mammals were present in the rumen epithelium libraries. These clones, representing up to 20% of the total sequences, were affiliated to *Eubacterium sulci* (formerly *Fusobacterium sulci* (Jalava & Eerola, 1999); 86 to 91% similarity), *Solobacterium moorei* (86 to 88% similarity), *Mogibacterium pumilum* (90 and 92% similarity), *Eikenella corrodens* (90 and 92% similarity), and pathogenic *Clostridia* (90 to 96% similarity) among others (Table 1). Many of them are commonly found in oral infections and are recognized opportunistic pathogens in humans (Downes *et al.*, 2001; Sheng *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2006).

F. necrophorum, a common inhabitant of the rumen wall, was not found in this study. This bacterium is an opportunistic pathogen that causes liver abscesses in ruminants, particularly when receiving a high concentrate diet (Nagaraja *et al.*, 2005). The diet fed in C period had a high proportion of concentrate and the animal was considered as having a sub-clinical acidosis syndrome (Martin *et al.*, 2006). However, concentration of lactate, a preferred substrate of *F. necrophorum*, was low (~ 2 mM) and not different from H periods and could be the reason for the non detection of *Fusobacteria*.

In conclusion, this study showed that the bacterial community attached to the rumen epithelium has some unique characteristics. The abundance of bacteria affiliated to the phylum *Proteobacteria* and the presence of *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis* and other potential pathogens suggest an environmental niche for this group of bacteria that merits to be further investigated.

Acknowledgements

S. Sadet is the recipient of an INRA-Auvergne region fellowship. The authors are grateful to J. E. Edwards for critical reading of the manuscript and to the personnel of the experimental unit for the care of the animal.

Chapitre experimental 5

Mise en évidence de bactéries oxydant l'ammoniac et/ou le méthane au sein de la communauté épimurale

Mise en évidence de bactéries oxydant l'ammoniac et/ou le méthane au sein de la communauté épimurale

Introduction

On suppose à la communauté épimurale plusieurs fonctions dont la dégradation de l'oxygène et le recyclage des cellules desquamées de la paroi (Cheng *et al.*, 1979). Cependant, aujourd'hui, une seule fonction, caractéristique de ces bactéries a pu être mise en évidence. Il s'agit de l'hydrolyse de l'urée diffusant de façon passive, du sang vers le rumen, au travers de la paroi ruminale (Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979). Par des uréases d'origine microbienne, l'urée est donc hydrolysée en dioxyde de carbone et en ammoniac (NH_3). Cet ammoniac est ensuite majoritairement utilisé par les microorganismes du rumen pour leur synthèse protéique (Figure 1). Ces protéines microbiennes sont une source d'azote pour l'animal. Récemment, par l'utilisation d'amorces ciblant spécifiquement les bactéries méthanotrophes, Mitsumori *et al.*, (2002) ont observé la présence du genre *Nitrosomonas* au niveau de l'épithélium ruminal. *Nitrosomonas europaea* est une bactérie capable d'oxyder l'ammoniac grâce à deux enzymes : l'ammonia monooxygénase (AMO), qui oxyde l'ammoniac en hydroxylamine (NH_2OH), et l'hydroxylamine oxidoreductase (HAO) qui catalyse l'oxydation du NH_2OH en nitrite (NO_2^-) (Figure 1) (Wood, 1986). Cette oxydation, réalisable grâce à l'oxygène du sang qui diffuse au travers de la paroi ruminale, est une autre voie d'utilisation de l'ammoniac. Pour le ruminant, l'oxydation du NH_3 peut constituer une perte au niveau de la disponibilité en azote.

L'ammonia monooxygénase est proche en terme de séquences d'acides aminés de la méthane monooxygénase (Holmes *et al.*, 1995). Au niveau de l'épithélium ruminal, la mise en évidence de *Nitrosomonas* (Mitsumori *et al.*, 2002) laisse donc supposer une oxydation du méthane à ce niveau (Hyman & Wood, 1983; Semrau *et al.*, 1995; Jiang & Bakken, 1999). Cette oxydation a été observée *in vitro* par Kajikawa *et al.*, (2003) au niveau de la phase liquide du contenu ruminal, mais d'après ces auteurs, ce phénomène ne représente que 0,2 à 0,5% du méthane produit. L'importance de l'oxydation du CH_4 par des microorganismes méthanotrophes présents au niveau de l'épithélium ruminal (Mitsumori *et al.*, 2002) reste à définir.

En utilisant des amorces spécifiques des bactéries méthanotrophes, Mitsumori *et al.*, (2002), ont donc montré que les bactéries attachées à la paroi du rumen pouvaient oxyder l'ammoniac et probablement le méthane. Le but de notre étude était de confirmer l'existence de ces deux

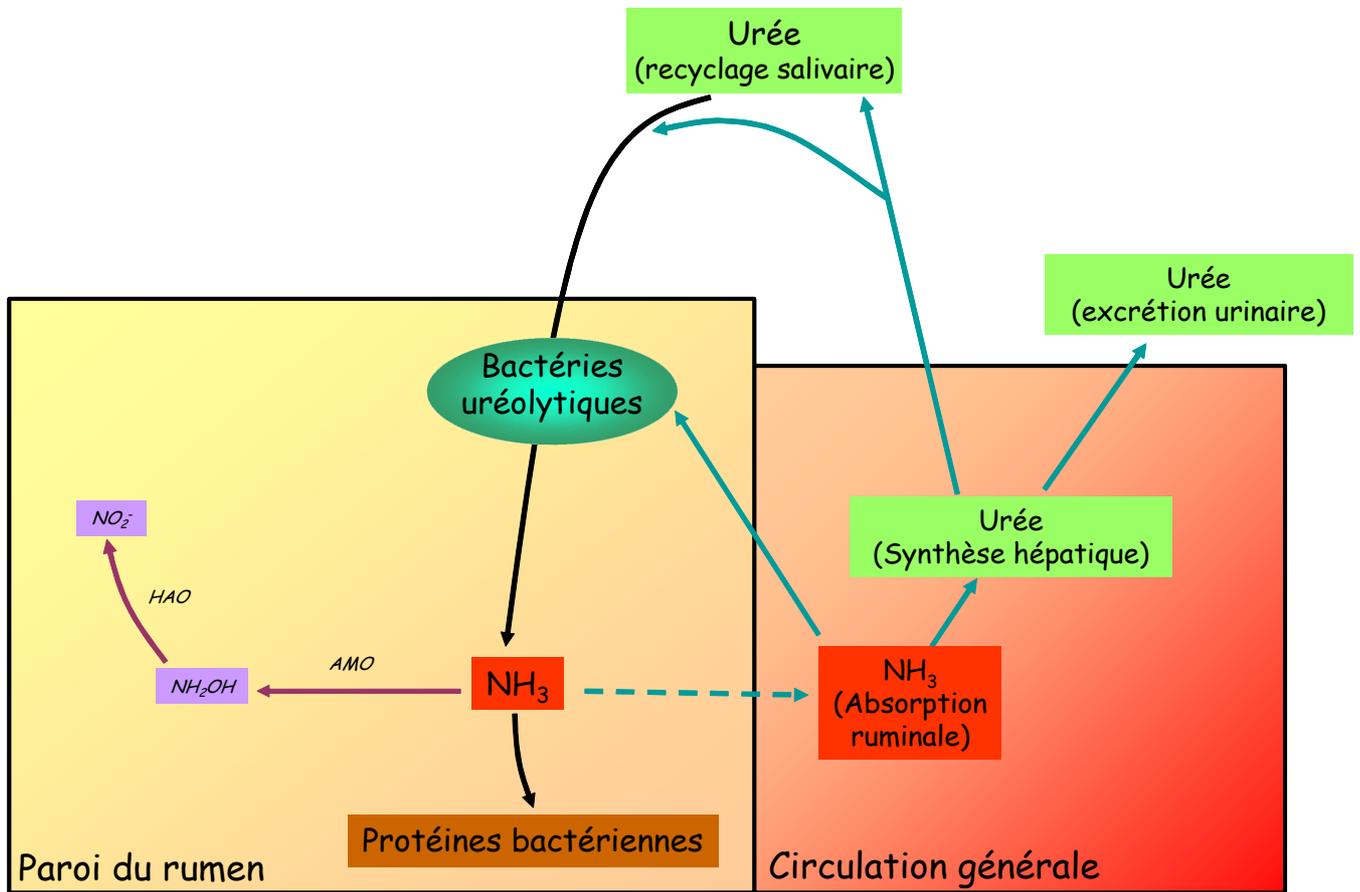


Figure 1. Recyclage de l'urée et possible oxydation de l'ammoniac au niveau de l'épithélium ruminal.

AMO : Ammonia monooxygénase ; HAO : hydroxylamine oxydoréductase

nouvelles fonctions au niveau du rumen, et plus particulièrement de la communauté épimurale, en utilisant des amorces PCR spécifiques, ciblant les gènes *amoA* et *pmoA* codant respectivement l'ammonia monooxygénase (AMO) et la méthane monooxygénase (pMMO). Afin d'évaluer l'éventuelle diversité de ces bactéries cibles, une PCR-DGGE a ensuite été réalisée.

Matériel et méthodes

Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé les échantillons issus de l'expérimentation présentée dans le chapitre 1 du travail expérimental de cette thèse, dont nous rappellerons ici les éléments principaux.

Animaux et régimes

Huit agneaux âgés de cinq mois, quatre mâles et quatre femelles, ont été répartis en deux lots homogènes en terme de poids et de sexe. Un groupe a été nourri avec une ration dite fourrage (**F**, 100% foin de luzerne), l'autre avec une ration riche en concentré (**HC**, 80% blé et 20% de foin de luzerne). Les animaux ont été abattus à poids moyen égaux : 38.8 ± 1.3 kg après 5 semaines d'alimentation par un régime F et 39.8 ± 1.3 kg après 4 semaines d'alimentation par un régime HC.

Prélèvements d'épithélium et de contenu ruminal

Des prélèvements de paroi de rumen ont été réalisés en 5 localisations différentes du réticulo-rumen représentatives de la diversité bactérienne présente (Mead & Jones, 1981). Ces sites étaient : le sac dorsal en position craniale (SD1), le sac dorsal en position caudale (SD2), le sac caudal (SC), le sac ventral (SV) et l'aire latérale (AL). Les échantillons ont été prélevés à l'aide d'un punch à biopsie (8mm de diamètre), puis lavés avec une solution de PBS 0.01 mol/l, pH 6,8. Après prélèvement, les échantillons ont été mis dans des tubes cryogéniques plongés directement dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à analyse. Des prélèvements de contenu ruminal ont également été réalisés afin d'obtenir, après filtration, des échantillons de phase liquide (PL) et de phase solide (PS). Leur conservation a également été réalisée à -80°C .

Extraction d'ADN et PCR

L'ADN des échantillons a été extrait selon le protocole prescrit par Yu et Morrison (2004). La présence et la diversité fonctionnelle des bactéries oxydant l'ammoniac et/ou le méthane dans

le rumen a été testée par les amorces A189 (5'- GGNGACTGGGACTTCTGG – 3') et A682 (5' – GAASGCNGAGAAGAASGC – 3'). Cette paire d'amorce cible une région conservée présente à la fois dans les gènes *amoA* et *pmoA* codant l'ammonia monooxygénase (AMO) et la méthane monooxygénase (pMMO), respectivement (Holmes *et al.*, 1995). Un BLAST, réalisé à partir de la base de données NCBI, a été effectué pour ces amorces confirmant qu'elles ciblaient bien les bactéries voulues. L'amorce A189 possédait un GC clamp à son extrémité 5' (Muyzer *et al.*, 1993). Le mix PCR (50 µl) contenait 1× de tampon PCR, 1,5 mmol/l de MgCl₂, 200 µmol/l de chaque dNTP, 0,25 µmol/l de chaque amorce et 2,5 U HotStartTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). Le programme PCR était le suivant: une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min, suivie de 30 cycles à 94°C pendant 1 min, 53°C pendant 1 min, et 72°C pendant 1 min; et d'une étape d'élongation finale de 72°C pendant 30 min. Une deuxième PCR, utilisant les premiers produits PCR comme échantillons, a été réalisée dans les mêmes conditions que la précédente.

Les produits PCR de deuxième génération ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium, ce afin de contrôler leur taille et d'estimer leur concentration en utilisant un Low DNA Mass Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA).

DGGE

Un gel de polyacrylamide à 8% a été préparé avec un gradient de dénaturation (urée formamide) compris entre 40% et 60%. Une solution d'acrylamide à 100% de dénaturation est définie par 7 mol/l d'urée et 40% (v/v) de formamide (Muyzer *et al.*, 1993). Environ 100 ng de produit PCR ont été déposés dans chaque puit. Le gel a ensuite été plongé dans une cuve DGGE-2001 (CBS Scientific Co, Solana Beach, USA) contenant du tampon TAE à 0.5 × (40 mmol/l Tris base, 40 mmol/l acide acétique glacial, 1 mmol/l EDTA). La migration a été effectuée pendant 5 h à 60°C en utilisant un voltage fixé à 200 mV. Le gel a ensuite été coloré à l'argent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). L'image représentative du gel de DGGE a ensuite été acquise en utilisant un scanner calibré en densité optique (ImageScanner, GE Healthcare, Piscataway, USA) avec une résolution de 400 dpi.

L'analyse du gel de DGGE a été réalisée par le logiciel GelCompar II version 4.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Ce logiciel a été utilisé pour normaliser et comparer les différents profils de DGGE. Le clustering a été utilisé pour regrouper les échantillons les plus proches (Fromin *et al.*, 2002). Les images de gels de DGGE ont été "matchées" en utilisant toujours un même échantillon comme standard interne. Les bandes ont été quantifiées après

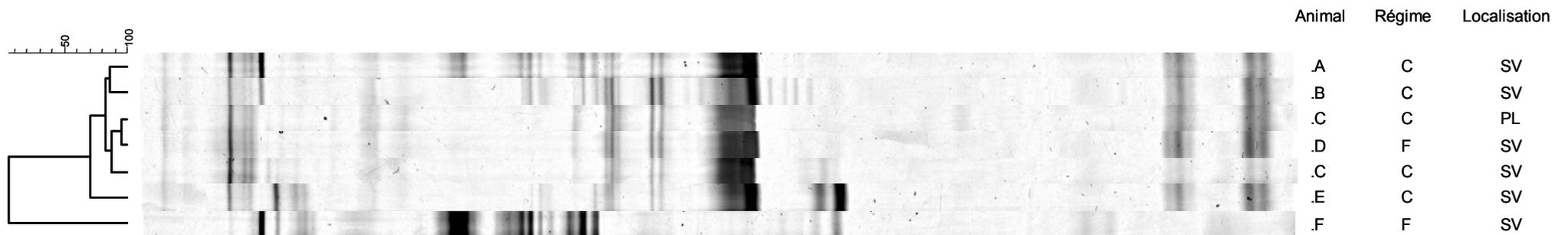


Figure 2. Dendrogramme réalisé selon la méthode des UPGMA (Unweighed pair-group method using arithmetic averages), à partir des profils bactériens obtenus en Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) grâce à des amorces PCR ciblant les bactéries oxydant l'ammoniac ou le méthane.

F= régime 100% fourrage ; C= régime riche en concentré ; SV= sac ventral (épithélium); PL= phase liquide (contenu ruminal).

suppression du bruit de fond. Une tolérance de 1% sur la position de la bande a été appliquée. La similarité entre profils a été calculée via le coefficient de corrélation de Pearson. Le clustering, lui, a été réalisé par la méthode unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA).

Résultats et Discussion

Les gènes codant l'ammonia monooxygénase (AMO) et la méthane monooxygénase (pMMO) n'ont pas été détectés dans le contenu ruminal, que ce soit au niveau de la phase liquide ou de la phase solide, sauf pour un seul animal où un signal positif a été observé au niveau de la phase liquide. En revanche, au niveau de la paroi du rumen, un signal PCR a été obtenu pour six agneaux sur huit, dont quatre étaient nourris avec le régime riche en concentré et deux nourris avec la ration fourrage, et ceci uniquement au niveau du sac ventral. L'absence de signal au niveau du sac dorsal est contraire aux résultats obtenus par Mitsumori *et al.*, (2002). Notons que dans leur étude, ces auteurs n'ont testé qu'un seul site épithélial : le sac dorsal. Ces divergences de résultats sont probablement dues aux différents jeux d'amorces utilisés entre les deux études. En effet, dans leur travail, Mitsumori *et al.*, (2002) ont utilisé des amorces ciblant spécifiquement les bactéries méthanotrophes, tandis que dans notre étude, nous avons utilisé d'autres amorces ciblant les gènes *amoA* et *pmoA* codant respectivement l'ammonia monooxygénase (AMO) et la méthane monooxygénase (pMMO).

Les profils de DGGE obtenus pour l'ensemble des échantillons (n=6) étaient similaires entre eux à 70%, sauf pour un animal dont le profil était très différent des autres (5%) (Figure 2). Ce résultat, montrant une variabilité des profils de DGGE entre individus, est comparable à ceux observés pour les profils de DGGE de l'ADNr 16S trouvés dans la bibliographie (Edwards *et al.*, 2005; Larue *et al.*, 2005) et nos travaux sur ruminants (chapitres 1 à 4 du travail expérimental de cette thèse) où les variations entre animaux sont de l'ordre de 30%.

Les amorces PCR utilisées pour amplifier les gènes *amoA* et *pmoA* sont principalement dessinées pour des milieux environnementaux comme l'eau (Erwin *et al.*, 2005). Dans notre étude, l'utilisation de ces amorces pour des échantillons ruminants n'a pas été simple. En effet, avec nos échantillons, les amorces A189 et A682 généraient, en gel d'agarose, 3 bandes dont une seule était à la taille attendue. Pour obtenir une seule bande contenant une quantité d'ADN suffisante à la réalisation d'une DGGE (100 ng), il a fallu faire une succession de réactions PCR. Cependant, la multiplication des cycles PCR peut conduire à la formation de potentielles chimères et à l'obtention de séquences ADN amplifiées contenant un nombre élevé d'erreurs. En DGGE, ce type de PCR peut également générer des bandes non

spécifiques (Green, 2005). Afin d'être sûr que les bandes obtenues en DGGE étaient caractéristiques de la population bactérienne cible, nous avons tenté un séquençage de ces dernières. Cependant, la réamplification de l'ADN bactérien à partir des bandes de DGGE n'a pu être réalisée. Nous supposons que la coloration à l'argent a empêché le bon fonctionnement de cette dernière étape (Green, 2005). Parallèlement, nous avons également tenté un clonage direct des produits PCR disponibles, mais aucun résultat n'a pu être obtenu faute d'une quantité suffisante d'ADN. En l'absence de séquençage, nous ne sommes donc pas en mesure d'affirmer que les bactéries, mises en évidence au niveau de la paroi du sac ventral du rumen, sont des bactéries oxydant l'ammoniac et/ou le méthane. Néanmoins, il est connu que : 1) la plupart des bactéries oxydant l'ammoniac sont capables d'utiliser l'urée comme substrat (Koper *et al.*, 2004), 2) la communauté épimurale dégrade l'urée provenant, notamment, du sang (Cook, 1976; Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979) et 3) l'irrigation sanguine est plus importante au niveau du sac ventral du rumen (Von Engelhardt & Hales, 1977). L'ensemble de ces informations laisse supposer la présence de bactéries oxydant l'ammoniac au niveau de l'épithélium ruminal, et plus particulièrement du sac ventral.

L'utilisation d'un autre jeu d'amorces plus adapté à nos échantillons, suivi d'un séquençage des produits PCR obtenus, est indispensable pour valider ou non l'existence de cette population bactérienne au niveau de l'épithélium rumen.

Discussion générale

Aujourd'hui, peu d'informations sont disponibles sur l'importance de la diversité de la communauté épimurale dans le fonctionnement du rumen. L'ensemble des expérimentations réalisées dans le cadre de ce travail de thèse nous a permis de réviser et d'approfondir grâce à l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, certaines connaissances acquises sur cette communauté par le biais des techniques culturales. Nous avons également étudié les bactéries du contenu ruminal, qui étant mieux connues, nous ont permis de valider ou non les résultats obtenus pour la communauté épimurale. L'ensemble des données obtenues a apporté des éléments de réponse aux questions suivantes :

- 1) La diversité de la communauté épimurale est-elle la même quel que soit le site de prélèvement épithélial ?
- 2) La diversité de la communauté épimurale est-elle différente de celle du contenu ruminal ?
- 3) La communauté épimurale aurait-elle d'autres rôles que ceux qui lui sont classiquement attribués ?
- 4) Quel est l'effet du régime alimentaire sur la diversité de la communauté épimurale ?
- 5) La diversité de la communauté bactérienne de la phase liquide du contenu ruminal est elle la même que celle de la phase solide ?
- 6) Quel est l'effet du régime sur la diversité de ces deux dernières communautés ?

Rappelons ici les différents termes utilisés pour parler de diversité. Il s'agit des indices de biodiversité, de la structure (pour les profils bactériens gérés en DGGE puis analysés par clustering et test de permutation), et de la composition (pour les banques de clones) d'une communauté bactérienne.

1. La diversité de la communauté épimurale

1.1 La diversité de la communauté épimurale est-elle la même quel que soit le site de prélèvement épithélial ?

Le rumen est principalement composé de deux sacs (dorsal et ventral) et de deux culs-de-sac (caudo-dorsal et caudo-ventral) séparés par des piliers (Figure 1). L'épithélium ruminal présente une grande hétérogénéité en terme de répartition et de morphologie des papilles. Elles sont denses et hautes dans le sac ventral et les culs-de-sac caudaux. A l'inverse, elles sont peu nombreuses et de petite taille sur les piliers et dans le sac dorsal (Brownlee, 1956).

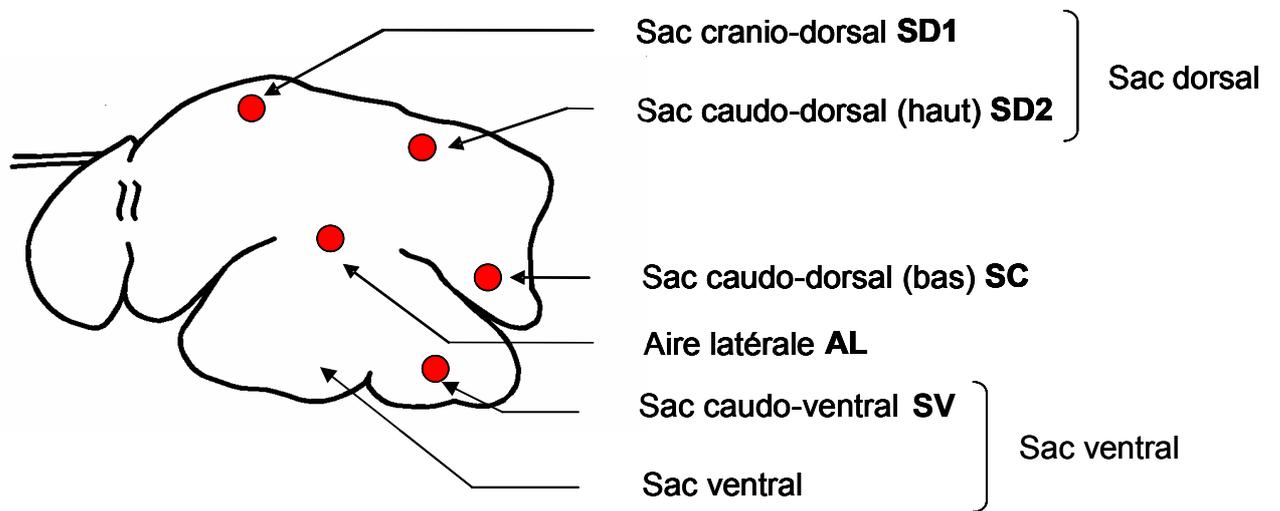


Figure 1. Représentation schématique du rumen et des principaux sacs le composant. Les points rouges indiquent les différents sites de prélèvements épithéliaux effectués dans le cadre des expérimentations 1 (sur agneaux) et 2 (sur taurillons).

Cette hétérogénéité, au niveau de l'épithélium ruminal, laisse supposer une variation dans la répartition des bactéries attachées à la paroi du rumen. Deux travaux anciens, l'un sur ovins (Bauchop *et al.*, 1975) et l'autre sur bovins (McCowan *et al.*, 1980), ont étudié via l'utilisation de la microscopie électronique, la distribution de la communauté épimurale en différents sites de prélèvements épithéliaux. Chez les ovins, il a été montré que les surfaces épithéliales des sacs dorsal, caudal et de l'aire latérale du rumen étaient plus **densément** peuplées que celles du sac ventral (Bauchop *et al.*, 1975). En revanche, chez les bovins, McCowan *et al.*, (1980) ont montré que les surfaces épithéliales les plus **densément** peuplées étaient celles des sacs dorsal et ventral. De façon générale, chez les ruminants, la densité de la communauté épimurale n'est donc pas la même selon la région épithéliale considérée. Qu'en est-il de la diversité ? Dans une première expérimentation sur agneaux abattus (expérimentation 1), nous avons comparé par PCR-DGGE, la diversité de la communauté épimurale entre cinq sites épithéliaux : le sac cranio-dorsal (SD1), le haut du sac caudo-dorsal (SD2), le bas du sac caudo-dorsal (SC), le sac ventral (SV), l'aire latérale (AL) (Figure 1). Les résultats de l'analyse des profils bactériens obtenus en DGGE n'ont montré aucun effet du site de prélèvement épithélial sur la **diversité** de la communauté épimurale en terme d'indice de biodiversité et de structure (cluster et test de permutation); si ce n'est que la communauté bactérienne du sac dorsal (SD1) tendait à être plus biodiverse que celle du sac ventral (SV), même si cette différence était non significative. La communauté épimurale dominante chez l'agneau serait donc la même quel que soit le site de prélèvement épithélial considéré. Mais qu'en est-il chez les bovins ? Partant du principe que les sacs ventral et dorsal étaient les moins proches en terme de diversité, nous avons effectué des prélèvements épithéliaux dans ces deux régions (SD1 et SV ; Figure 1) sur des taurillons abattus. Comme pour les ovins, les résultats des analyses des profils bactériens ont montré que la **diversité** de la communauté épimurale, en terme d'indice de biodiversité et de structure (cluster et test de permutation), était similaire entre les deux sites de prélèvements étudiés ($P > 0,05$).

En conclusion, la diversité bactérienne de la communauté épimurale dominante, mise en évidence par la DGGE, est comparable entre tous les sites de prélèvements épithéliaux, chez les ovins comme chez les bovins. L'étude de la diversité des bactéries attachées à l'épithélium ruminal peut donc se faire sur animaux vivants en prélevant un échantillon représentatif de la paroi n'importe où dans le rumen. C'est ce que nous avons réalisé dans l'expérimentation 3 en effectuant une biopsie dans l'aire latérale du rumen.

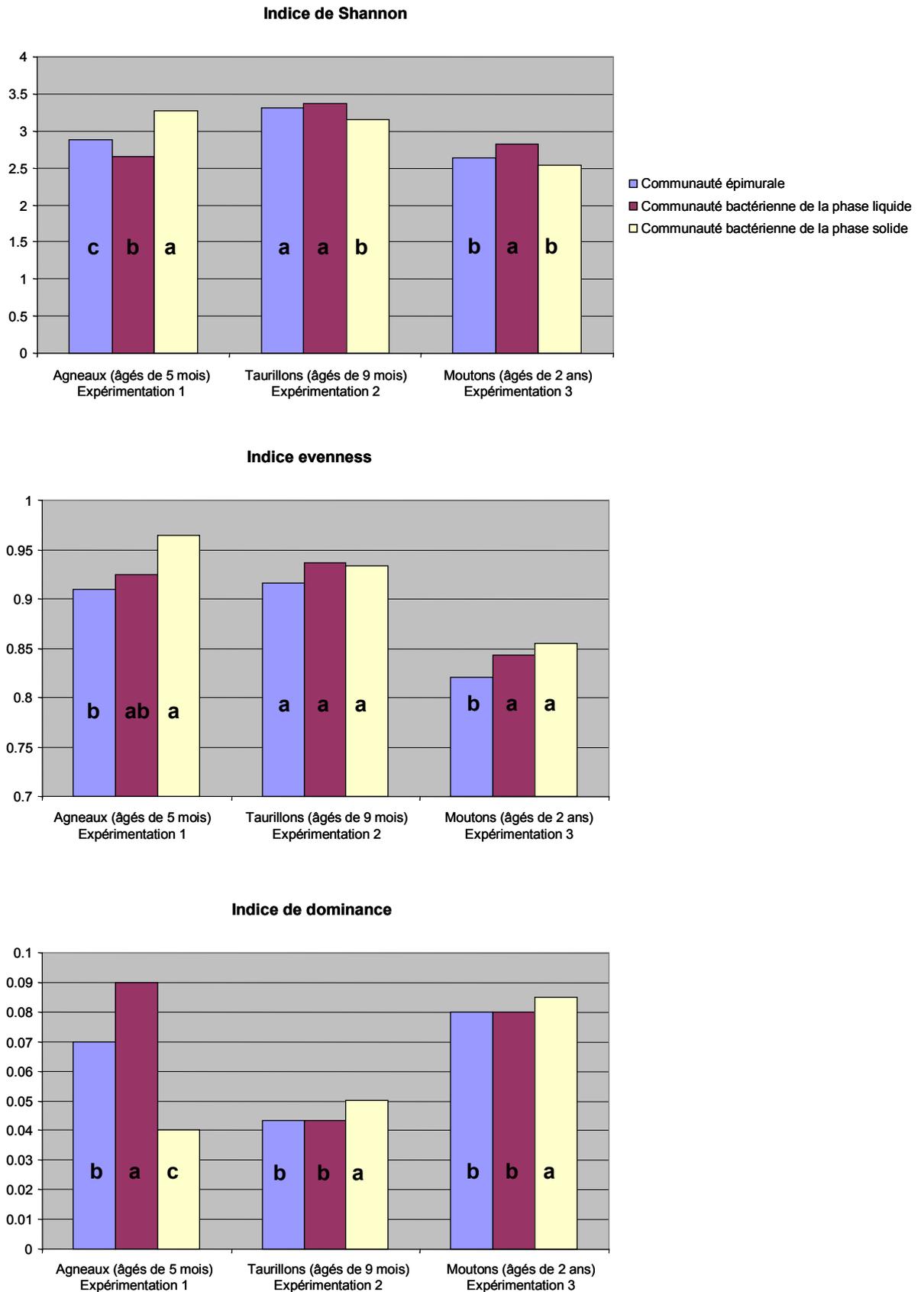


Figure 2. Valeur moyenne des trois indices de biodiversité, tous régimes confondus, pour les trois communautés bactériennes ruminales. a, b et c : $P < 0,05$.

1.2 La diversité de la communauté épimurale est-elle différente de celle du contenu ruminal ?

Afin de répondre à cette question, nous avons comparé par PCR-DGGE, la **diversité** des bactéries attachées à la paroi du rumen à celle des bactéries présentes dans le contenu ruminal en terme d'indices de biodiversité, de structure (cluster et test de permutation) et de composition (banques de clones).

Pour un même **indice de biodiversité** (H =Shannon¹, e =evenness² ou c =dominance³), le classement des trois communautés bactériennes est différent entre les essais (Figure 2). A titre d'exemple, pour l'indice de Shannon et selon les études, la diversité de la communauté épimurale est soit différente de celle des phases liquide ($P<0,05$) et solide ($P<0,001$) du contenu ruminal (expérimentation 1), soit similaire à celle de la phase liquide ($P>0,05$) (expérimentation 2), ou de la phase solide ($P>0,05$) (expérimentation 3) (Figure 2). On suppose que les divergences de résultats obtenus entre les essais sont dues aux différences entre les expérimentations en terme d'espèce animale, d'âge des animaux et/ou de régime (Tableau 1). Cependant, l'analyse de la **structure** des communautés bactériennes a montré que la communauté épimurale était distincte de celle du contenu ruminal, et ce, quelle que soit l'espèce animale (bovine ou ovine) ou le régime alimentaire considéré (0 à 80% de céréale) (Figure 3). En DGGE, les indices de biodiversité tiennent compte du nombre et de l'intensité relative de chaque bande (Fromin *et al.*, 2002), contrairement à l'analyse de la structure par clustering qui intègre en plus la position des bandes dans le gel. De ce fait, le clustering permet de distinguer des espèces différentes entre deux profils bactériens. Cette analyse serait donc plus précise que les indices dans la détermination de la diversité réelle d'une communauté bactérienne.

Nous avons voulu caractériser la **composition** de la communauté épimurale via l'utilisation de banques de clones, ciblant le gène de l'ADNr 16S en entier, chez un mouton adulte ayant reçu successivement un régime alimentaire composé de 100% de fourrage, puis de 35% de fourrage + 65% de céréale (expérimentation 3 ; publication 4). Pour des raisons de coût et de temps, seuls 120 clones ont été séquencés. On peut se demander si le nombre de clones séquencés est suffisant pour avoir une représentation réaliste de la diversité de la communauté épimurale. Cependant à la vue des résultats originaux obtenus, il nous a semblé important de

¹Indice de Shannon : exprime la diversité d'une communauté bactérienne.

²Evenness : exprime l'uniformité de distribution de différentes espèces bactériennes au sein d'une communauté.

³Dominance : exprime la présence d'espèces bactériennes dominantes au sein d'une communauté.

Tableau 1. Récapitulatif des différentes expérimentations réalisées

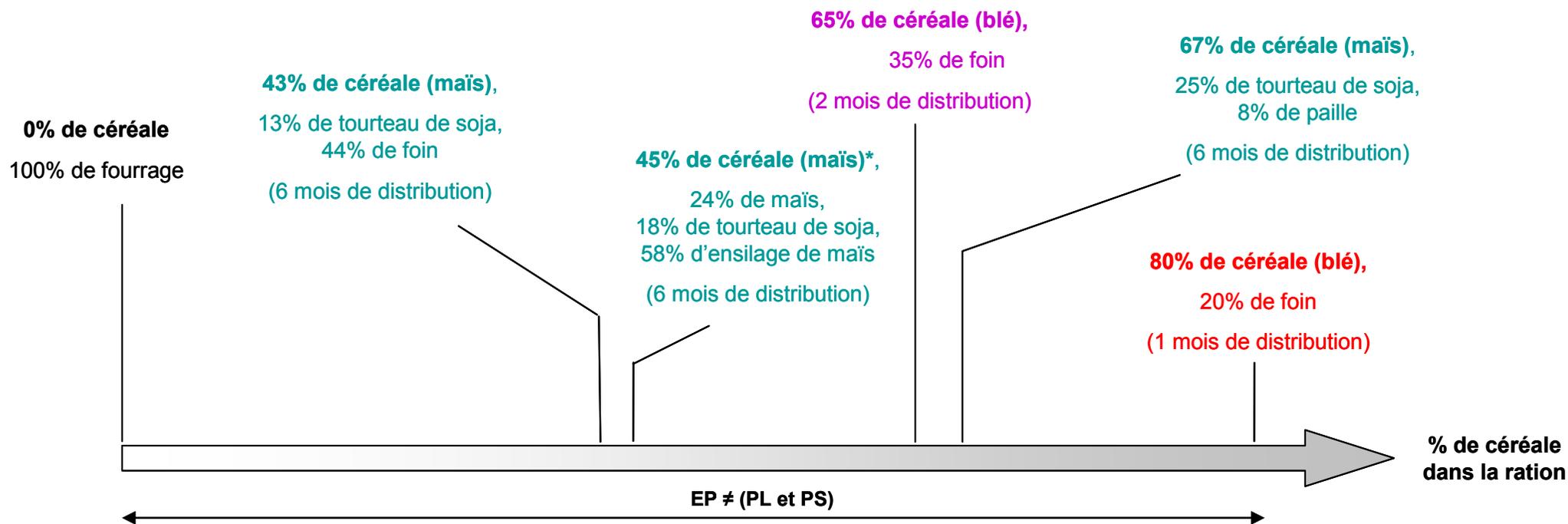
Expérimentations	Publications	Animaux	Régimes	Facteurs de variation étudiés	Mesures	Techniques
Expérimentation 1	Publication 1	Agneaux, n=8	100% foin	Régime alimentaire	Bactéries (IB*, structure)	PCR-DGGE
		en lot	20% foin / 80% blé	Site de prélèvement épithélial	Bactéries (fonction d'oxydation de l'ammoniac)	PCR/amorces spécifiques
Expérimentation 2	Publication 2	Taurillons, n=24	44% foin / 43% maïs / 13% tourteau de soja	Régime alimentaire	Bactéries (IB, structure)	PCR-DGGE
		en lot	58% ensilage de maïs / 24% maïs / 18% tourteau de soja	Site de prélèvement épithélial	Protozoaires (dénombrement)	Comptage sous loupe binoculaire
			7% paille / 67% maïs / 25% tourteau de soja		pH et Paramètres fermentaires (AGV, NH3, Lactate)	Chromatographie phase gazeuse, colorimétries, méthode enzymatique...
Expérimentation 3	Publication 3	Moutons, n=8	100% foin	Régime alimentaire	Bactéries (IB, structure, composition)	PCR-DGGE, banques de clones
	Publication 4	en lot	35% foin / 65% blé	Retour à l'état initial Evolution temporelle	Protozoaires (dénombrement) pH et Paramètres fermentaires (AGV, NH3, Lactate)	Comptage sous loupe binoculaire Chromatographie phase gazeuse, colorimétries, méthode enzymatique...
Expérimentation 4		Moutons, n=5	75% foin / 25% maïs	Avec ou sans protozoaires	Bactéries (IB, structure) pH et Paramètres fermentaires (AGV, Lactate)	PCR-DGGE Chromatographie phase gazeuse, méthode enzymatique...

*IB : Indices de Biodiversité

les discuter. Ainsi, nous avons mis en évidence deux phyla majoritaires au niveau de la communauté épimurale: les *Firmicutes* (46%) et les *Bacteroidetes* (39%). Les *Proteobacteria* étaient également présentes (13%), ainsi que les *Spirochaetes* (1%) et le phylum TM7 (1%) (Figure 4). Cho *et al.*, (2006) sont les seuls auteurs à avoir publié un travail similaire au nôtre sur une vache nourrie avec un régime composé de 75% de fourrage et de 25% de céréale. Si l'on compare les deux études, les résultats sont similaires en terme de phylum mais différents en terme de proportion des phyla observés. En effet, d'après ces auteurs, les bactéries attachées à la paroi du rumen seraient essentiellement composées par le phylum des *Bacteroidetes* (94%). Les *Firmicutes* et les *Proteobacteria* ne représenteraient respectivement que 6 et 3% de cette communauté (Figure 4). Les divergences de résultats entre ces deux études sont peut-être dues aux différences expérimentales, à savoir l'espèce animale (ovin vs bovin), le régime alimentaire (% de céréale dans la ration) ou encore les jeux d'amorces PCR utilisés (variable en séquences) pour la réalisation des banques de clones.

Dans notre travail de thèse, aucune banque de clone n'a été réalisée pour les communautés bactériennes du contenu ruminal. Ainsi, afin d'étudier la différence de composition entre la communauté épimurale et celles du contenu ruminal, nous avons comparé les résultats obtenus sur moutons dans l'expérimentation 3 (publication 4), avec ceux de la bibliographie. Pour ceci, nous avons considéré uniquement les études portant sur ovins, sachant que comme vu précédemment, il est possible que l'espèce animale induise un biais dans la comparaison de banques de clones. Nous avons ainsi observé que les deux phyla majoritaires au niveau de la paroi (*Firmicutes* et les *Bacteroidetes*) le sont également au niveau du contenu (Larue *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2006). En revanche, la proportion de *Proteobacteria*, semble plus importante au niveau épithélial. Ceci pourrait être une caractéristique de la communauté épimurale des ovins. Cependant les régimes n'étant pas les mêmes entre les études comparées, on ne peut pas exclure que ce résultat soit lié à une différence d'alimentation.

La réalisation de banques de clones nous a également permis de mettre en évidence une autre caractéristique de la communauté épimurale : celle de **réservoir de pathogènes**. En effet, certains clones ont été identifiés à des espèces bactériennes potentiellement pathogènes pour l'Homme comme *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*. D'autres clones, avec un pourcentage de similarité moindre, ont été trouvés proches des microorganismes suivants : *Eubacterium sulci* (anciennement connu sous le nom de *Fusobacterium sulci* (Jalava & Eerola, 1999), *Solobacterium moorei*, *Mogibacterium pumilum*, *Eikenella corrodens* et *Clostridia lactatifermentans*, *xylanovorans*, et *paraputrificum*. La mise en évidence de l'existence de pathogènes potentiels au niveau de la paroi ruminale n'est pas nouvelle. En



Expérimentation 1 (agneaux)

Expérimentation 2 (taurillons)

Expérimentation 3 (mouton adultes)

Figure 3. Différence de structure entre la communauté épimurale et celle du contenu ruminal en fonction de la composition et de la durée de distribution de la ration. Les régimes sont classés en fonction de leur % en céréale.

EP= communauté épimurale ; PL= communauté bactérienne de la phase liquide et PS= communauté bactérienne de la phase solide.

*En considérant qu'il y a 50% de grain issu de l'ensilage.

effet, *Fusobacterium necrophorum* est connue pour être une bactérie caractéristique du tractus digestif des animaux et de l'Homme. Mais dans certaines conditions, cette bactérie peut devenir pathogène. Par exemple, une alimentation riche en céréale peut favoriser le développement de cette bactérie chez le ruminant et ainsi conduire à l'apparition d'abcès au niveau du foie (Nagaraja *et al.*, 2005).

L'ensemble des résultats, obtenus via l'utilisation de techniques de biologie moléculaire, montre que la communauté épimurale serait différente de celle du contenu ruminal à la fois en terme de **structure** et de **composition**. Ceci confirme certaines données obtenues via l'utilisation de techniques culturales et de la microscopie électronique (Cheng *et al.*, 1979), même si d'autres auteurs (Dehority & Grubb, 1981; Mead & Jones, 1981) ont observé avec les mêmes techniques que la communauté épimurale était taxonomiquement et physiologiquement semblable à celles du contenu ruminal. Les techniques culturales ne permettent pas de détecter les bactéries non cultivables et ne sont donc pas représentatives de la diversité réelle. Les techniques de biologie moléculaire permettent de palier ce problème en mettant en évidence une diversité beaucoup plus importante (Stahl *et al.*, 1988; Pace, 1997) et sont donc préférables pour l'étude de la diversité.

L'analyse de la structure des communautés bactériennes met en évidence une différence entre la communauté épimurale et celle du contenu ruminal. En revanche, les indices de biodiversité ne semblent pas être des outils suffisamment sensibles pour étudier les variations de la diversité bactérienne ruminale. Les différences de diversité observées entre les communautés bactériennes de la paroi et celle du contenu ruminal laissent supposer des fonctions et des rôles différents au sein du rumen.

1.3 La communauté épimurale aurait-elle d'autres rôles que ceux qui lui sont classiquement attribués ?

La communauté épimurale aurait des fonctions spécifiques impliquées dans le maintien des conditions physico-chimiques du rumen et l'absorption des nutriments (Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979). En effet, les bactéries attachées à la paroi du rumen seraient impliquées dans la dégradation de l'oxygène provenant du sang (Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979), et dans la dégradation des cellules desquamées de la paroi (McCowan *et al.*, 1978; Dinsdale *et al.*, 1980). Les deux derniers rôles évoqués n'ont pas encore été réellement démontrés à ce jour. En revanche, il est connu que cette communauté a un rôle dans

Cho *et al.* . 2008

Sadet *et al.* . soumis

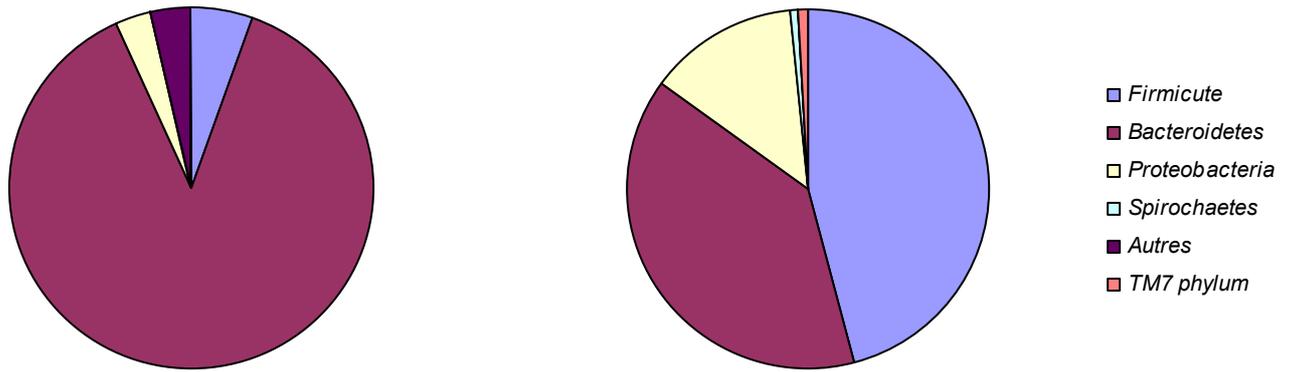


Figure 4. Comparaison des différents phyla présents au sein de la communauté épimurale entre deux études : l'une réalisée sur bovin nourri avec un régime composé de 75% de fourrage et de 25% de céréale (Cho *et al.*, 2006) et l'autre réalisée sur ovin nourri dans un premier temps avec un régime 100% fourrage, puis avec un régime composé de 65% de blé et de 35% de fourrage, et enfin de nouveau avec un régime 100% fourrage (Sadet *et al.*, soumis). Dans l'étude de Sadet *et al.*, (soumis), une banque de clone à été réalisée pour chaque régime. Les résultats présentés ici sont la moyenne des trois banques réalisées.

l'hydrolyse de l'urée sanguine diffusant de façon passive à travers la paroi ruminale (Cheng *et al.*, 1979; Wallace *et al.*, 1979; Cheng & Costerton, 1980). Nous avons entrepris, via l'utilisation d'amorces PCR spécifiques, de mettre en évidence d'autres rôles associés à la communauté épimurale. Certaines bactéries attachées à la paroi du rumen hydrolysant l'urée en ammoniac, nous avons étudié la capacité des bactéries de la communauté épimurale à oxyder l'ammoniac. Pour cela, nous avons testé des amorces PCR ciblant à la fois les gènes *amoA* et *pmoA* codant respectivement l'ammonia monooxygénase (AMO) et la méthane monooxygénase (pMMO) sur des échantillons de paroi (sac cranio-dorsal (SD1), sacs caudo-dorsal (SD1 et 2), sac ventral (SV) et l'aire latérale (AL) (Figure 1)) et de contenu ruminal (phases liquide et solide). Sur huit agneaux, un seul signal PCR a été obtenu au niveau de la phase liquide. En revanche au niveau épithélial, les gènes *amoA* et *pmoA* ont été détectés pour six échantillons sur huit, et ce, exclusivement au niveau du sac ventral du rumen. En raison de problèmes méthodologiques, principalement liés à une trop faible quantité de matériel génomique obtenu, le séquençage n'a pas pu aboutir. De ce fait, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que les bactéries attachées à la paroi du rumen sont capables d'oxyder l'ammoniac et potentiellement le méthane. Cependant, nos résultats coïncident avec ceux de Mitsumori *et al.*, (2002) qui ont mis en évidence au niveau de l'épithélium du sac dorsal du rumen, la présence d'une bactérie capable d'oxyder l'ammoniac : *Nitrosomonas* (Hollocher *et al.*, 1981; Wood, 1986). Des études complémentaires sont encore nécessaires, mais il est probable que la communauté épimurale possède les fonctions d'**oxydation de l'ammoniac et du méthane**.

En conclusion, la communauté épimurale aurait d'autres rôles que ceux liés à l'hydrolyse de l'urée, la dégradation de l'oxygène et des cellules desquamées de la paroi. En effet, les bactéries attachées à la paroi du rumen pourraient également être impliquées dans l'oxydation de l'ammoniac et/ou du méthane, même si ces deux derniers rôles restent encore à confirmer.

1.4 Effet du régime alimentaire sur la communauté épimurale

Comme nous l'avons vu précédemment, les indices de biodiversité ne sont pas des outils suffisamment sensibles pour mettre en évidence des changements de diversité au niveau des communautés bactériennes du rumen. Dans la suite de ce manuscrit, le terme de diversité sera

Tableau 2. Effet du régime alimentaire sur la structure des trois communautés bactériennes du rumen

Expérimentation	Régimes comparés	Durée de distribution du régime (mois)	Communauté bactérienne		
			Paroi ruminale	Contenu ruminal	
				phase liquide	phase solide
Expérimentation 1	100% foin vs 20% foin + 80% blé	1	Non	Oui	Oui
Expérimentation 3	100% foin vs 35% foin + 65% blé	2	Non	Oui	Non
Expérimentation 2	44% foin + 43% maïs + 13% tourteau soja vs 8% paille + 67% maïs + 25% tourteau soja	6	Oui	Non	Non
	58% ensilage de maïs + 24% maïs + 18% tourteau soja vs 8% paille + 67% maïs + 25% tourteau soja	6	Oui	Non	Oui
	44% foin + 43% maïs + 13% tourteau soja vs 58% ensilage de maïs + 24% maïs + 18% tourteau soja	6	Oui	Non	Non

donc relatif uniquement aux notions de **structure** et de **composition** des communautés bactériennes.

L'effet du régime alimentaire sur la diversité de la communauté épimurale a été étudié sur ovins dans les expérimentations 1 (100% fourrage vs 80% céréale) et 3 (100% fourrage vs 65% céréale), et sur taurillons dans l'expérimentation 2 (trois régimes riches en céréale 43% vs 45% vs 67%) (Tableau 2). L'analyse des profils DGGE par clustering et test de permutation n'a montré aucun effet du régime alimentaire sur la **structure** de la communauté épimurale, à l'exception de l'essai mené sur taurillons où les animaux ont été nourris pendant 6 mois avec un même régime. En effet, dans cette dernière étude il apparaît que la structure de la communauté épimurale est différente entre les trois régimes. Cependant cette observation n'a pas été mise en évidence entre des régimes contenant de fortes (>65%) ou de faibles (0%) proportions de céréale, et distribués pendant un à deux mois à des ovins (expérimentation 1 et 3; Tableau 2). Il est probable que la structure de la communauté épimurale des taurillons soit plus sensible aux variations de régimes alimentaires que celle des agneaux. Cependant il est également possible que la teneur en céréale de la ration ainsi que la durée de distribution du régime alimentaire soient des facteurs de variation importants de la diversité de la communauté épimurale ; ces modifications occasionnées par un changement de régime mettraient un certain temps à s'établir. On ne peut pas non plus exclure que la structure de cette communauté réagisse à plus court terme et/ou pour des régimes à teneur plus faible en céréale. Dans ce cas, une variabilité élevée entre individus masquerait cet effet. En effet, dans toutes nos expérimentations, les profils bactériens provenant de la paroi ruminale étaient différents entre individus à plus de 40% (Figure 5). Chez l'humain, cet effet « individu », de l'ordre de 66%, a également été montré par DGGE pour la communauté bactérienne de la muqueuse intestinale (Green *et al.*, 2006). D'après ces auteurs, ceci pourrait s'expliquer par les caractéristiques immunologiques ou encore les récepteurs spécifiques aux bactéries, présents sur les parois du tractus digestif et codés par le matériel génétique de l'hôte (Zoetendal *et al.*, 2001).

La caractérisation de la **composition** de la communauté épimurale pour différents régimes (100% fourrage ou 35% fourrage + 65% de céréale) a été réalisée par des banques de clones (publication 4) ciblant le gène de l'ADNr 16S en entier. Il a été observé que le nombre de bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* était plus important sous un régime riche en concentré (51% des clones), que sous un régime 100% fourrage (33% des clones) où le phylum de *Firmicutes* était dominant (50% des clones) (Figure 6). L'importance des

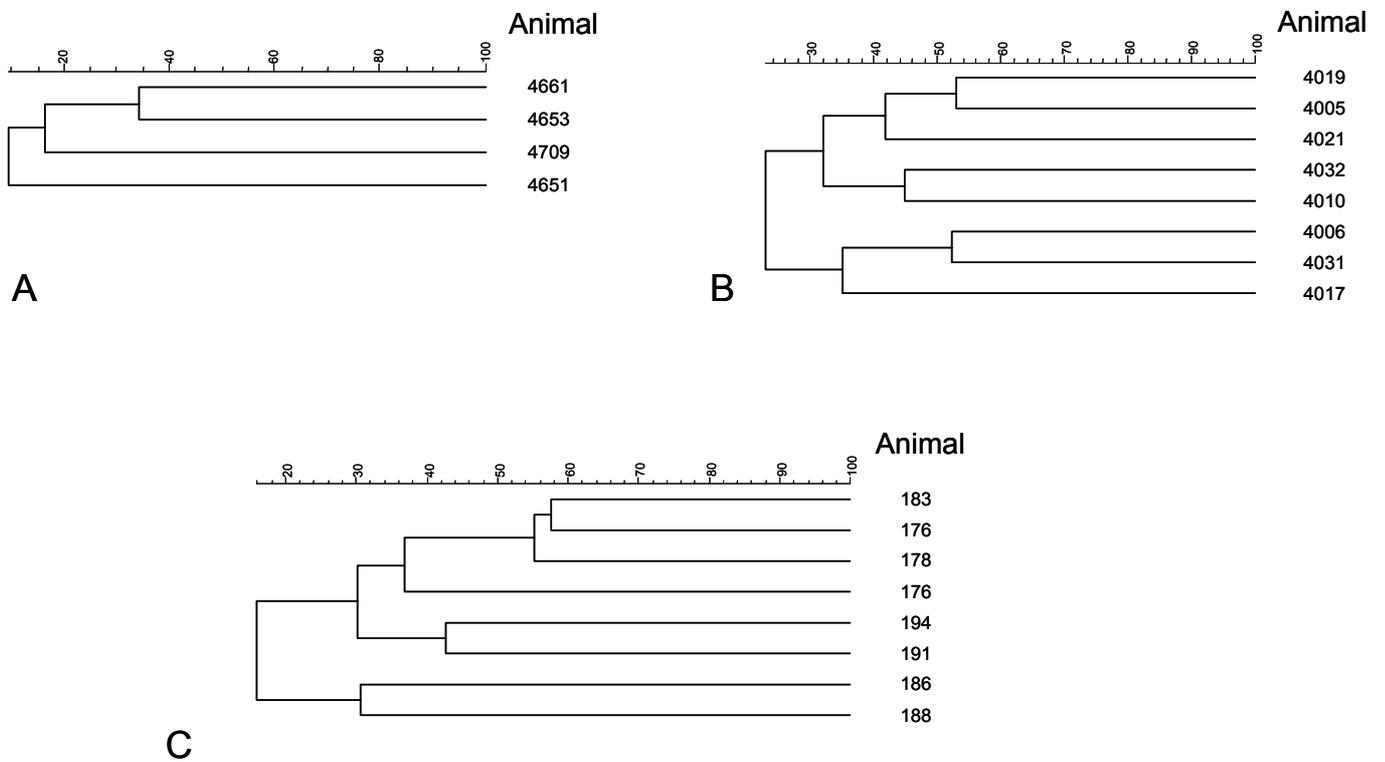


Figure 5. Dendrogrammes réalisés par la méthode des UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages) à partir des profils générés en DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Chaque dendrogramme à été réalisé à partir d'échantillons de paroi (aire latérale) du rumen d'animaux ayant reçu un même régime. **A**, échantillons de l'expérimentation 1. **B**, échantillons de l'expérimentation 3. **C**, échantillons de l'expérimentation 2.

Bacteroidetes, pour des régimes contenant de fortes proportions de céréale, est surtout du à une augmentation du nombre de bactéries appartenant au genre *Prevotella*. Ces résultats laissent supposer un effet du régime alimentaire sur la composition de la communauté épimurale. Lorsque l'on redistribue aux animaux des rations 100% fourrages, après avoir donné pendant deux mois des rations riches en céréale, les *Firmicutes* (49% des clones) redeviennent majoritaires par rapport aux *Bacteroidetes* (25% des clones). Au niveau de sa composition bactérienne, la communauté épimurale serait donc capable de revenir à son état initial, après perturbation (Figure 6). Ces résultats sont prometteurs, mais le séquençage d'un plus grand nombre de clones permettrait de valider ou non cet effet du régime sur la diversité de la communauté épimurale, et sa capacité de retour à l'état initial.

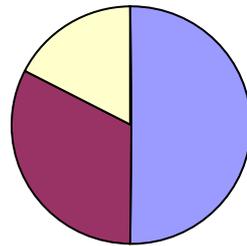
Au niveau de la communauté épimurale, l'effet du régime alimentaire est difficile à mettre en évidence si ce n'est avec des régimes riches en céréale et distribués sur une longue période (> 2mois). Le changement occasionné ne serait pas immédiat et mettrait du temps à s'établir. Nous supposons également un effet des régimes contenant des proportions moindres en céréale sur la structure de cette communauté, mais de trop faible amplitude pour être détecté par les techniques d'analyses classiques de « fingerprint » comme le clustering. La réalisation de banques de clones serait plus sensible pour la détection de tels effets. Cependant la capacité de cette approche dépend du nombre de clones sélectionnés et semble difficilement adaptable à des expérimentations contenant un grand nombre d'échantillons, comme c'est le cas pour des études de digestion chez le ruminant.

2. La diversité des communautés bactériennes du contenu ruminal

2.1 La diversité de la communauté bactérienne de la phase liquide est-elle différente de celle de la phase solide?

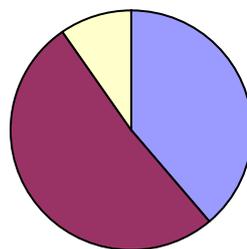
En comparant l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons pu observer que la structure des communautés bactériennes des phases liquide et solide étaient significativement différentes entre elles pour des rations dont la teneur en céréale était inférieure ou égale à 45% (Figure 7). En revanche, pour des régimes riches en céréale (allant de 65 à 80%), aucune différence de structure entre ces deux communautés n'a été observée. Ceci confirme de précédents résultats obtenus sur ovins via la PCR-DGGE (Larue *et al.*,

Période fourrage 1



- *Firmicutes*
- *Bacteroidetes*
- *Proteobacteria*
- *Spirochaetes*
- *TM7*

Période concentré



Période fourrage 2

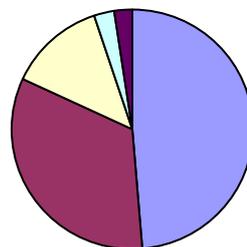


Figure 6. Comparaison, via l'utilisation de banques de clones, de la composition de la communauté épimurale aux différentes périodes de prélèvements pour l'expérimentation 3. Dans cette expérimentation, les moutons ont été nourris dans un premier temps avec un régime 100% fourrage pendant un mois (période fourrage 1), puis avec un régime composé de 65% de blé et de 35% de fourrage pendant deux mois (période concentré), et enfin de nouveau avec un régime 100% fourrage pendant les deux derniers mois de l'expérimentation (période fourrage 2).

2005), ou sur bovins via les banques de clones (Tajima *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 2006), montrant des différences de structure entre les communautés bactériennes des phases liquide et solide du contenu ruminal pour des régimes contenant moins de 30% de céréale (Figure 7). Il y aurait donc un pourcentage de céréale seuil, que nous situons à environ 50%, qui déterminerait la différence de structure bactérienne entre les deux phases du contenu ruminal. Ceci serait à relier à l'aspect physique des phases liquide et solide, plus homogène dans des régimes riches en céréale qu'avec des régimes riches en fourrage.

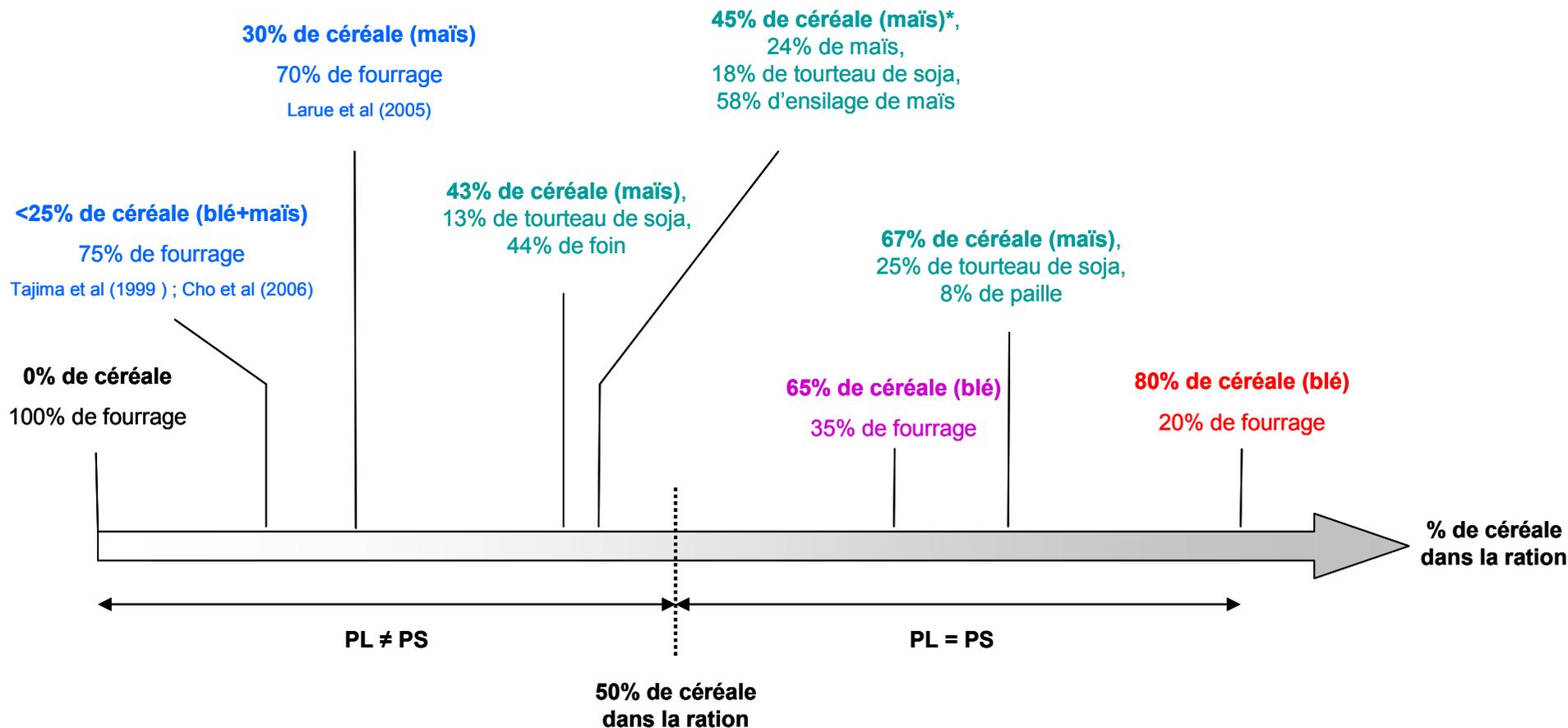
2.2 Effet du régime alimentaire sur les communautés bactériennes des phases liquide et solide

Dans l'ensemble de ce travail de thèse, nous avons étudié l'effet du régime alimentaire sur le contenu ruminal en distinguant systématiquement la phase liquide de la phase solide. Comme pour la communauté épimurale, l'effet du régime sur la structure des deux communautés bactériennes du contenu ruminal a été étudié sur ovins, dans l'expérimentation 1 (100% fourrage vs 80% céréale) et dans l'expérimentation 3 (100% fourrage vs 65% céréale), et sur taurillons dans l'expérimentation 2 (trois régimes riches en céréale 43% vs 45% vs 67%) (Tableau 2).

Nous avons observé que la structure de la communauté bactérienne de la phase liquide était différente entre des régimes pauvres (0%) et riches en céréale (>65% ; expérimentations 1 et 2 ; Tableau 2). Kocherginskaya *et al.*, (2001) et Tajima *et al.*, (2000) ont trouvé des résultats comparables sur bovins alimentés avec des régimes très différents en terme de teneur en céréale (0 vs >80%). Cet effet a également été rapporté sur ovins nourris avec des régimes de composition proche (0% vs 30% de céréale) (Larue *et al.*, 2005).

Pour la communauté bactérienne de la phase solide, l'effet du régime n'était pas aussi évident que pour la phase liquide, puisqu'un changement de diversité a été observé à la fois entre des régimes dont la teneur en céréale était différente (0 vs 80%) ou proche (45 vs 67%). Dans la littérature, une différence de composition et de structure des bactéries de la phase solide a été observée uniquement pour des régimes de composition proche en céréales (0 vs 20 ou 30%) (Koike *et al.*, 2003; Larue *et al.*, 2005).

Nos résultats confirment que la communauté bactérienne de la phase solide du contenu ruminal est différente de celle de la phase liquide. Nous supposons que cette différence existe en de ça d'un pourcentage seuil de céréale dans la ration (50%). Cette hypothèse reste à valider. Par ailleurs, la structure des communautés bactériennes du



Expérimentation 1 (agneaux)

Expérimentation 2 (taurillons)

Expérimentation 3 (mouton adultes)

Données bibliographiques

Figure 7. Différence de structure entre les communautés bactériennes des phases liquide et solide du contenu ruminal en fonction de la composition de la ration. Les régimes sont classés en fonction de leur % en céréale.

PL= communauté bactérienne de la phase liquide et PS= communauté bactérienne de la phase solide.

*En considérant qu'il y a 50% de grain issu de l'ensilage.

contenu ruminal varie entre des régimes de composition différente en terme de teneur en céréale.

Conclusions et perspectives

Dans ce travail de thèse, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire a permis d'approfondir les connaissances sur les communautés bactériennes du rumen, obtenues jusque là par les techniques culturales ne prenant pas en compte les bactéries non cultivables.

Nous avons ainsi pu montrer, via l'utilisation de la PCR DGGE, que **la diversité de la communauté épimurale était comparable entre les différentes régions de l'épithélium ruminal analysées, et les espèces animales considérées**. D'autre part, cette diversité était variable entre individus et donc caractéristique de l'hôte. Ceci laisse supposer que dans de futurs travaux, des prélèvements de paroi ruminale pourront être fait via des biopsies en passant au travers de la canule. L'absence d'abattage permettra de tester successivement différents traitements sur un même animal limitant ainsi l'effet individu et le coût expérimental.

La diversité de cette communauté **était différente de celle du contenu ruminal, lui suggérant** des fonctions qui lui sont propres. Selon des premiers résultats, obtenus au cours de nos travaux, il serait possible que les bactéries attachées à la paroi du rumen aient des fonctions dans **l'oxydation de l'ammoniac et du méthane**. L'existence de telles activités au niveau de la paroi du rumen reste encore à prouver par des travaux supplémentaires. Pour ceci, nous proposons l'utilisation d'amorces plus spécifiques et mieux adaptées aux échantillons ruminiaux. Il serait également pertinent de tester différentes situations alimentaires pour lesquelles les conditions d'oxydation varient (ex : régimes \pm riches en azote pour l'étude de l'oxydation de l'ammoniac). Si ces phénomènes existent et s'avèrent quantitativement importants, l'identification des bactéries responsables pourrait être une voie à explorer pour réduire, en partie, les pertes azotées et les rejets de méthane des ruminants. La diminution de rejets d'ammoniac et de méthane est en adéquation avec les nouvelles contraintes environnementales imposées pour l'élevage.

L'utilisation de banques de clones a permis de mettre en évidence la présence, plus importante qu'attendue, d'espèces bactériennes potentiellement pathogènes au niveau de la communauté épimurale. Il serait intéressant de continuer cette identification en réalisant des banques de clones sur plusieurs animaux afin de mieux connaître les espèces bactériennes présentes au niveau de l'épithélium ruminal, quelles soient pathogènes ou non, ainsi que leurs

proportions. Les conséquences de la présence de pathogènes, au niveau de la paroi ruminale, sur la santé de l'animal et de l'Homme seraient également à observer.

Aucun changement de diversité de la communauté épimurale n'a été mis en évidence sauf pour des régimes riches en céréale et distribués sur une longue période. Ceci nous amène à émettre les hypothèses suivantes :

1) les modifications de la diversité épimurale se mettent en place de façon lente et progressive. Ceci pourrait expliquer pourquoi aucun changement de la diversité de la communauté épimurale n'a été observé entre des régimes à faible et forte teneur en céréale et distribués sur une plus courte période.

2) les variations de la diversité de la communauté épimurale sont difficiles à mettre en évidence. Elles pourraient être masquées par une variabilité individuelle forte, dans ce cas, il serait intéressant, sur des groupes d'animaux homozygotes ayant reçu des régimes identiques ou différents, d'évaluer la part génétique de cet effet individu. Il est également possible que les variations de diversité de la communauté épimurale, dûes aux changements de régimes alimentaires, ne soient pas suffisamment marquées pour être mises en évidence par la DGGE. En effet, cette technique présente des limites en terme de reproductibilité (effet gel), et ne permet pas la détection de populations bactériennes minoritaires (inférieures à 1%) qui pourraient être sensibles aux facteurs de variation étudiés. Pour mettre en évidence des changements de la diversité de faible amplitude, nous proposons l'utilisation de techniques de « fingerprint » autres que la DGGE, plus reproductibles et plus fines, comme par exemple l'ARISA (pour Automated Ribosomal Intergenic spacer Analysis) et la T-RFLP (pour Terminal-Restriction Length Polymorphism). Cependant la DGGE a permis de mettre en évidence des changements de diversité au niveau des communautés bactériennes du contenu ruminal. Cette technique reste donc valable pour l'étude de variations plus importantes de diversité.

Notons enfin que dans nos travaux, nous n'avons testé que des régimes contenant différentes proportions de céréales. Ces régimes n'ont pas eu d'effets majeurs sur la diversité de la communauté épimurale. La distribution d'autres types de régimes, par exemple \pm riches azote, pourrait être réalisée. Si il s'avère que la diversité de la communauté épimurale est différente entre ces régimes, l'identification des bactéries caractéristiques d'une ration serait intéressante. De même l'observation de cet effet régime sur certaines fonctions bactériennes pourrait être réalisée (ex : dégradation de l'urée dans le cas de régimes \pm riches en azote). Pour cela, on peut envisager, sous différents régimes, une analyse de l'expression du

transcriptôme bactérien, via l'utilisation d'amorces PCR spécifiques d'une fonction bactérienne donnée, ou encore via la réalisation des puces à ADN.

Notre travail a donc permis de compléter et d'élargir les connaissances sur la communauté épimurale en terme de diversité spécifique. Cependant, comme nous venons de le voir, l'analyse de la diversité fonctionnelle des bactéries attachées à la paroi du rumen semble être indispensable afin de mieux déterminer le rôle de cette communauté, notamment dans la nutrition et sur la santé de l'animal.

Annexes

Influence du régime et du lieu de prélèvement sur la diversité des bactéries attachées à l'épithélium ruminal de l'agneau

SADET S., MARTIN C., MEUNIER B. et MORGAVI D.P.

INRA THEIX 63122 Saint-Genès Champanelle

Communication orale : 3^{ème} rencontre des microbiologistes du pôle clermontois, Mars 2006, Clermont-Ferrand

Les bactéries attachées à l'épithélium ruminal (communauté épimurale, CE) représentent une population particulière de l'écosystème microbien du rumen, cependant leur diversité et leur rôle biologique ne sont pas bien connus. Ainsi, la diversité de la CE en fonction de sa localisation sur l'épithélium ruminal (ER) et du régime alimentaire a été étudiée par PCR-DGGE en utilisant des amorces universelles (ADNr 16s). Huit agneaux, répartis en deux groupes, ont été nourris avec un régime foin (100%) ou céréale (80%). Après abattage, des prélèvements de paroi ont été réalisés dans 5 sites du rumen : les sacs dorsaux 1 et 2 (SD1 et SD2), ventral (SV), caudal (SC) et l'aire latérale (AL). Des échantillons de phase liquide (PL) et solide (PS) du contenu ruminal ont aussi été prélevés. A partir des profils de DGGE, des comparaisons ont été réalisées (corrélations de Pearson) et trois indices de biodiversité ont été calculés. Les comparaisons de profils ont montré que le régime alimentaire et le lieu de prélèvement au niveau de l'ER n'influençaient pas la structure de la CE. Notons que l'absence d'effet régime au niveau des échantillons de l'ER est probablement dû au schéma expérimental qui ne permet pas de s'affranchir d'un effet animal. En revanche, pour les échantillons de PS et de PL, deux clusters bien définis ont été obtenus pour chaque régime. Les indices de biodiversité n'ont montré aucune différence entre régimes, ou sites de prélèvements (pour les échantillons de paroi, de PS et de PL), excepté pour le SV qui a tendance à être plus biodiverse que le SD1 ($P=0.1$). De façon générale, ces résultats suggèrent que la structure de la CE est la même sur l'ensemble de la surface de l'ER. Elle semble être plus influencée par l'hôte que par le régime alimentaire. En revanche, les bactéries du contenu ruminal, elles, sont fortement influencées par le régime.

Mots clé : communauté épimurale, rumen, régime alimentaire, lieu de prélèvement, DGGE.

Influence of diet and sampling site on the diversity of the bacterial community attached to the rumen epithelium in lambs

SADET S., MARTIN C., MEUNIER B. et MORGAVI D.P.

INRA THEIX 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Poster : 5th joint INRA-RRI gastrointestinal Tract Microbiology Symposium, Juin 2006, Aberdeen

The bacteria attached to the rumen epithelium (bacterial epimural community, BEC) are a ubiquitous component of the rumen microbial ecosystem, still their biological role is not well known. In order to better understand the functions of BEC, the effect of diet and sampling site on its diversity was studied using PCR-DGGE with universal eubacterial 16S rDNA primers. Eight lambs were allocated into two groups fed forage or a concentrate-rich diet. After slaughter, 5 different sites of the rumen epithelium (dorsal (D1, D2), ventral (V), caudal (C) and lateral (LA) area) were sampled, as well as rumen content samples of the liquid (LP) and solid (SP) phases. Clustering analysis of DGGE profiles showed that neither diet type nor sampling site had any influence on BEC structure. For diet type, a confounding animal effect cannot be discarded due to the experimental design. However, for both LP and SP samples separate clusters were obtained for each diet. This result suggests that the bacterial population from the rumen contents was more affected by diet than BEC. Furthermore, diversity indexes based on DGGE operational taxonomic units showed no differences between diets or among sampling sites, except for V that tended to be more diverse than D1 ($P=0.1$) for the Shannon index (H). BEC diversity was, irrespective of sampling site, equally distributed within the rumen of individual lambs. However, BEC structure differed among animals and seems to be influenced by host.

Future work will look at assessing the diversity of BEC functional groups and link them up with their physiological activity under different feeding conditions.



S. SADET

Influence of diet and sampling site on the diversity of the bacterial community attached to the rumen epithelium in lambs

S. Sadet, C. Martin, B. Meunier, D.P. Morgavi

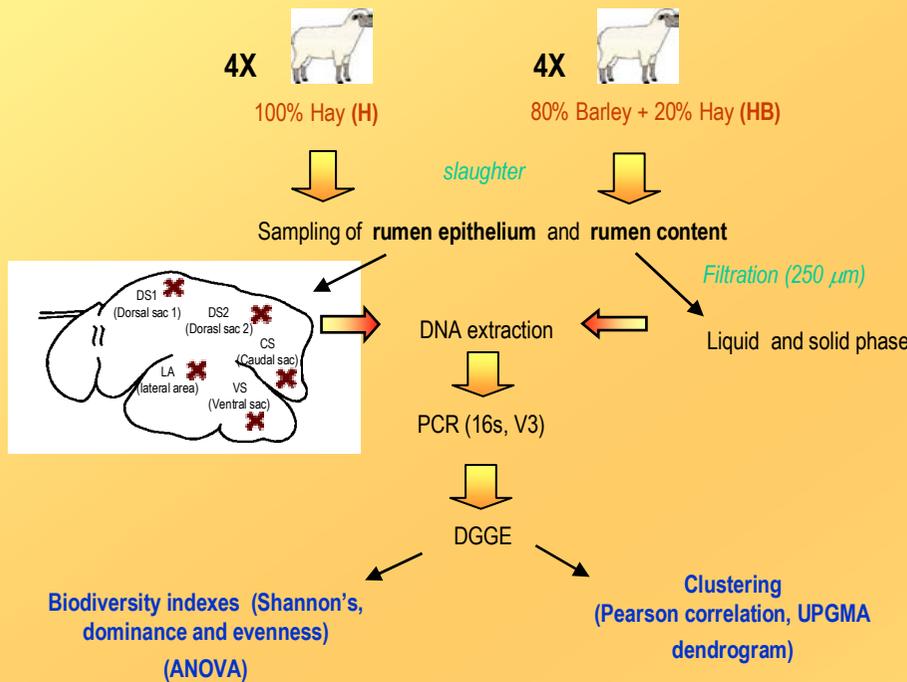
INRA Theix, 63122 Saint-Genès Champanelle, France



Introduction

The bacteria attached to the rumen epithelium (Bacterial Epimural Community, BEC) are an ubiquitous component of the rumen microbial ecosystem, still their biological role is not well known. In order to better understand the functions of BEC, the effect of diet and sampling site on its diversity was studied using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) with universal eubacterial 16s rDNA primers and compared to the bacterial community obtained from rumen contents.

Methods



Results

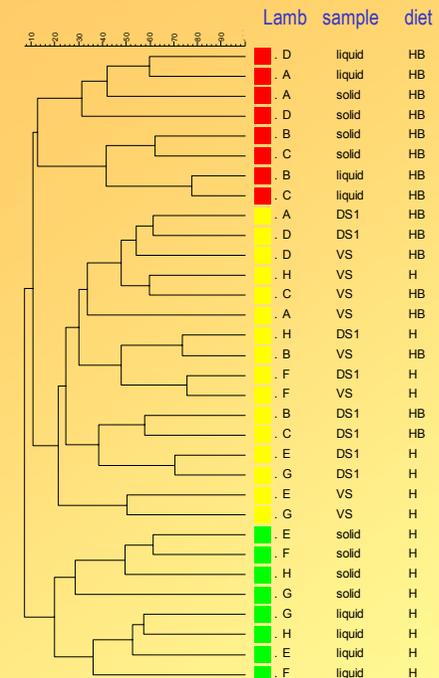
Biodiversity indexes

✓ Diet and sampling site had no effect on BEC biodiversity indexes, although VS tended to be more diverse, for Shannon's index, than DS1 in both diets (P=0.1).

✓ The clustering analysis produced two main clusters. The **first cluster** grouped rumen content samples from animals fed the hay diet. These hay diet samples were further separated into two sub-clusters for the solid and liquid phases, respectively. The **second cluster** grouped all rumen epithelium (VS and DS1) samples and rumen content samples from animals fed the high concentrate diet. Within this cluster; however, the epithelium and rumen content samples were well separated into two sub-clusters.

Diet affected the profiles, as evaluated by PCR-DGGE, of the bacterial community present in rumen contents of lambs. In contrast, the epimural community (BEC) was not affected by diet and, although it did not separate into an independent cluster, it appears to be a distinct community and different from that of rumen content.

Clustering



Conclusions

✗ BEC diversity was equally distributed within the rumen of individual lambs and it was not affected by diet. Additionally, BEC structure differed from that of rumen contents. In contrast, the rumen content microbial community structure was different in high or low concentrate diets. Future work will look at assessing, within a same animal, the diversity of BEC functional groups and link them up with their physiological activity under different feeding conditions.

Temporal stability and effect of preceding diet on the rumen bacterial population structure in sheep

SADET S., MARTIN C., MEUNIER B. et MORGAVI D.P.

INRA THEIX 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Poster : Conference on GastroIntestinal Function , Avril 2007, Chicago

The importance of the structure of the microbiota on rumen function and ruminant nutrition is well recognized. However, the temporal stability and capacity of the microbial population to return to its initial state following a challenge, e.g., diet change or additive treatment, is not known. In this work the composition of the rumen bacterial population was qualitatively characterized in vivo during a 5-month period. Two groups of four 2-year old rumen-cannulated wethers without previous exposure to a concentrate-rich diet were used. One group was fed alfalfa hay throughout the experimental period while the second group started with the same diet, switched to a wheat/alfalfa hay diet (65:35 ratio) during month 2 and 3, and changed back to the original alfalfa diet until the end of the study. Samples from the liquid and solid rumen phase as well as the rumen epithelium were taken each month and analyzed by PCR-DGGE. A correlation between sampling times was established using a moving window analysis. The bacterial populations in the alfalfa-fed group were highly similar from month to month. The percentage of similarity was about 60 to 65% for the populations attached to the epithelium or associated to the liquid phase. Although the structure of the bacterial populations were highly correlated from consecutive sampling times, comparisons of bacterial profiles at the start and end of the 5-month experimental period decreased by as much as 20% in this group of animals indicating a variability over time. For the concentrate-fed group the similarity dropped following the change in diet; from month 1 to 2 and from 3 to 4 to an average of 30% for all three bacterial populations. However, the percentage of similarity between month 2 and 3 was also low (35 to 50%) suggesting that the populations were not stable after 4 or 8 weeks after feeding the cereal-rich diet. Known differences induced by diet on the rumen populations were confirmed by hierarchical clustering analysis and biodiversity indexes. This study shows that rumen bacterial communities evolve over time in young adult sheep and that variations caused by a change in diet may take longer than previously thought to stabilize.

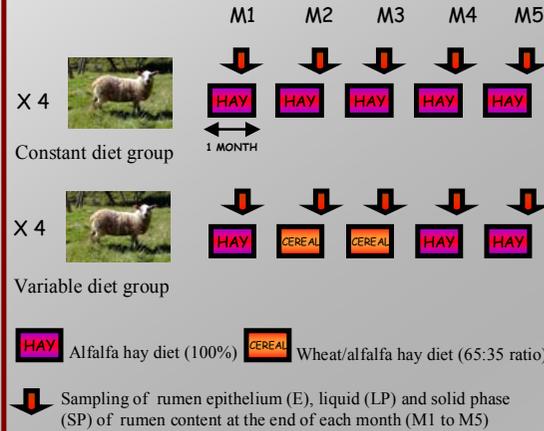


S. Sadet, C. Martin, B. Meunier and D.P. Morgavi, INRA, UR1213 herbivores, Saint Genès Champanelle, France

Abstract

The importance of the structure of the microbiota on rumen function and ruminant nutrition is well recognized. However, the temporal stability and capacity of the microbial population to return to its initial state following a challenge, e.g., diet change or additive treatment, is not known. In this work the composition of the rumen bacterial population was qualitatively characterized in vivo during a 5-month period. Two groups of four 2-year old rumen-cannulated wethers without previous exposure to a concentrate-rich diet were used. One group was fed alfalfa hay throughout the experimental period while the second group started with the same diet, switched to a wheat/alfalfa hay diet (65:35 ratio) during month 2 and 3, and changed back to the original alfalfa diet until the end of the study. Samples from the liquid and solid rumen phase as well as the rumen epithelium were taken each month and analyzed by PCR-DGGE. A correlation between sampling times was established using a moving window analysis. The bacterial populations in the alfalfa-fed group were highly similar from month to month. The percentage of similarity was about 60 to 65% for the populations attached to the epithelium or associated to the liquid phase. Although the structure of the bacterial populations were highly correlated with consecutive sampling times, comparisons of bacterial profiles at the start and end of the 5-month experimental period decreased by as much as 20% in this group of animals indicating a variability over time. For the concentrate-fed group the similarity dropped following the change in diet; from month 1 to 2 and from 3 to 4 to an average of 30% for all three bacterial populations. However, the percentage of similarity between month 2 and 3 was also low (35 to 50%) suggesting that the populations were not stable after 4 or 8 weeks after feeding the cereal-rich diet. Known differences induced by diet on the rumen populations were confirmed by hierarchical clustering analysis and biodiversity indexes. This study shows that rumen bacterial communities evolve over time in young adult sheep and that variations caused by a change in diet may take longer than previously thought to stabilize.

Methods



Sampling of rumen epithelium and rumen content



- ✓ Clustering
- ✓ Moving window analysis

Introduction

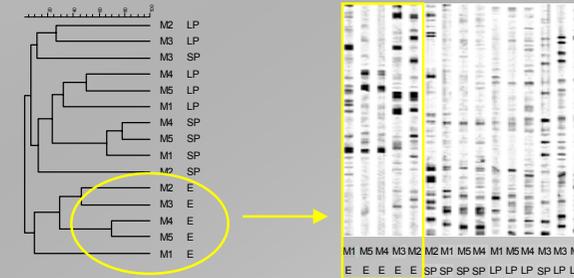
The rumen microbial ecosystem plays a central role in ruminants' nutrition. The stability of this ecosystem, which is important for its function, is influenced by the nature of the diet. Ruminants are subjected to repeated changes of diet during their production cycle—changes that induce an adjustment of microbial populations. However, the time needed for the ecosystem to stabilize and whether it returns to its initial state when there is a change back in diet is not known. The objective of this study was to monitor the stability, throughout a 5-month period, of bacterial communities associated to rumen contents and to the rumen epithelium following diet changes.

Conclusion

- Under a constant diet, rumen bacterial communities seems to evolve over time in sheep.
- Diet changes induced a variation of these communities. Bacterial populations in the cereal-rich diet were less stable than in the forage diet even after a 8-week feeding period.
- Work is in progress to assess the relationship between the bacterial population structure and the rumen fermentation characteristics of these animals.

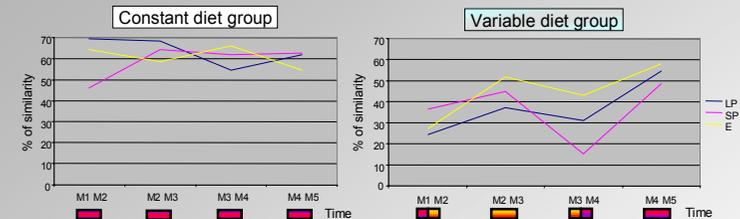
Results

No differences were observed in the bacterial population structure between groups at the start of the trial (M1).



Cluster dendrogram and DGGE profiles from one sheep (variable diet group) taken as example

■ The E community was different from that of LP and SP, irrespective of diet and sampling period.



Constant diet group:

■ Bacterial populations were highly similar (60 to 65%) from month to month. However, the percentage of similarity between the start and the end of the 5-month experimental period was ~40%, indicating a variability over longer time periods.

Variable diet group:

■ Change of diet decreased drastically the similarity of the bacterial populations studied (mean 30%) for the comparisons M1 to M2 and M3 to M4.

■ The percentages of similarity between M2 and M3 were lower (<50%) than those observed for the same period for the constant diet group (~65%). This suggests that the populations were not stable at 4 or 8 weeks after feeding the cereal-rich diet.

Réponse des bactéries du rumen à un changement de régime

SADET S., MARTIN C., MEUNIER B. et MORGAVI D.P.

INRA THEIX 63122 Saint-Genès Champanelle, France

Communication orale : 2^{ème} Journées du département PHASE, Octobre 2007, Tours

Les microorganismes du rumen, et plus particulièrement les bactéries, jouent un rôle important dans le maintien d'un bon fonctionnement du rumen. Au sein de cet organe, on compte trois populations bactériennes distinctes. Les bactéries attachées à la paroi ruminale (communauté épimurale), et les bactéries présentes dans les phases liquide et solide du contenu ruminal. Il est connu qu'un changement de régime a une incidence sur la structure des communautés bactériennes et sur le fonctionnement du rumen. Cependant, lors d'un retour au régime initial, l'évolution de ces communautés n'est pas connue. L'objectif de notre étude est double : 1) étudier la stabilité dans le temps des communautés bactériennes du rumen pour un régime constant et 2) observer leur réponse lors de changements successifs de régimes, ceci en interaction avec les paramètres physico-chimiques du rumen. Huit moutons canulés au niveau du rumen, et n'ayant jamais reçu de régime riche en concentré, ont été répartis en deux lots. L'expérimentation a duré 5 mois (M1 à M5). Le lot 1 a reçu une ration composée exclusivement de foin pendant toute la durée de l'expérimentation (lot régime constant: RC). Le lot 2 a été nourri pendant 1 mois avec une ration foin (100%) (M1), puis pendant 2 mois avec une ration composée de foin (35%) et de blé (65%) (M2 et M3), avant d'être réalimenté avec le régime initial (100% foin) pendant deux mois (lot régime variable : RV) (M4 et M5). Des prélèvements au niveau du rumen ont été réalisés la dernière semaine de chaque mois (n=5 ; M1 à M5). Après filtration du contenu ruminal, les phases solide et liquide ont été obtenues. Sur la phase liquide, des mesures de pH et de paramètres fermentaires (AGV et lactate) ont été réalisées. Des prélèvements de papilles, dans l'aire latérale du rumen, ont été effectués par biopsie (Sadet et al., 2006). La dégradabilité en sachet du foin a également été mesurée. Les communautés bactériennes du rumen (phase liquide, solide et paroi) ont été mises en évidence par PCR-DGGE (amplification de la région V3 de l'ADNr 16S). A partir des profils obtenus, trois indices de biodiversité ont été calculés : l'indice de Shannon (H), l'indice de régularité (e) et l'indice de dominance (c). Des analyses de variances en mesures répétées ont été réalisées sur les indices de biodiversité et les autres paramètres mesurés en utilisant la procédure MIXED du logiciel SAS. Les effets lot, temps et l'interaction lot*temps ont été testés contre l'effet animal dans lot comme erreur.

Les valeurs étaient considérées comme significatives à $P < 0.05$. Pour le lot RC, aucun effet du temps sur les trois communautés bactériennes du rumen n'a été observé. En revanche, le pH, la concentration en AGV totaux et la dégradabilité varient au cours du temps. Un retour à l'état initial est noté pour l'ensemble de ces paramètres, sauf pour le pH qui est plus élevé en M5 qu'en M1 (\neq de 0.3 unité pH). Pour le lot RV, le passage d'un régime 100% foin à un régime 65% blé diminue uniquement l'homogénéité (e) de la communauté bactérienne de la phase solide. Comme attendu, le passage à un régime riche en céréale entraîne une chute significative du pH, de la dégradabilité et de la concentration en acétate. L'ensemble de ces perturbations, occasionnées par un changement de régime, est de courte durée, puisque tous les paramètres, y compris les bactéries de la phase solide reviennent à leur état initial dès un retour à un régime 100% foin (M4). Pour la dégradabilité et le pH, les valeurs mesurées en M5, sont supérieures à celles en M1. Pour ces deux derniers paramètres, aucune différence entre les lots n'a été observée en M5, la stimulation observée précédemment serait donc probablement due à un effet combiné du régime et du temps.

Les communautés bactériennes du rumen, et plus précisément celle de la phase solide, sont sensibles aux variations de régime alimentaire. Lors du retour à la ration de départ, ces bactéries retrouvent rapidement leur état initial.

L'écosystème bactérien ruminal semble donc s'adapter facilement aux changements de régimes étudiés.

Références bibliographiques

- Abe M, Iriki T, Tobe N & Shibui H (1981) Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 758-765.
- Abou Akkada AR & El-Shazly K (1964) Effect of absence of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. *Applied Microbiology* **12**, 381-390.
- Ahmadian A, Ehn M & Hober S (2006) Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **363**, 83-94.
- Akin DE (1976) Ultrastructure of rumen bacterial attachment to forage cell walls. *Applied and Environmental Microbiology* **31**, 562-568.
- Akin DE (1979) Microscopic evaluation of forage digestion by rumen microorganisms--a review. *Journal of Animal Science* **48**, 701-710.
- Altekruse SF & Swerdlow DL (2002) *Campylobacter jejuni* and related organisms. In *Foodborne diseases*, pp. 103-112 [HP Riemann, editor]. London, UK: Academic Press.
- An D, Dong X & Dong Z (2005) Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* **11**, 207-215.
- Anderson K, Nagaraja T, Morrill J, Avery T, Galitzer S & Boyer J (1987) Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *Journal of Animal Science* **64** (4), 1215-1226.
- Anonymous (1988) Arrêté du 19 avril 1988 fixant les conditions d'attribution de l'autorisation d'expérimenter. *Journal Officiel de la République Française*, 5608-5610.
- Arakaki C, Mitsumori M, Itabashi H, Shirasaka S & Minato H (1994) Influence of the Presence of Protozoa on the Rumen Microbial-Population of Cattle. *Journal of General and Applied Microbiology* **40**, 215-226.
- Balogh K, Patocs A, Majnik J, Racz K & Hunyady L (2004) Genetic screening methods for the detection of mutations responsible for multiple endocrine neoplasia type 1. *Molecular genetics and metabolism* **83**, 74-81.
- Bauchop T, Clarke RT & Newhook JC (1975) Scanning electron microscope study of bacteria associated with the rumen epithelium of sheep. *Applied Microbiology* **30**, 668-675.
- Bauchop T & Mountfort DO (1981) Cellulose Fermentation by a Rumen Anaerobic Fungus in Both the Absence and the Presence of Rumen Methanogens. *Applied of Environmental Microbiology* **42**, 1103-1110.

- Beauchemin KA, Yang WZ, Morgavi DP, Ghorbani GR, Kautz W & Leedle JA (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.
- Bell T, Newman JA, Silverman BW, Turner SL & Lilley AK (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**, 1157-1160.
- Bonhomme A (1990) Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Animal feed science and technology* **30**, 203-266.
- Bonnemoy F, Fonty G, Michel V & Gouet P (1993) Effect of anaerobic fungi on the ruminal proteolysis in gnotobiotic lambs. *Reproduction Nutrition Development* **33**, 551-555.
- Brailsford MD & Hartman PA (1968) Characterization of *Streptococcus durans* bacteriophages. *Canadian journal of microbiology* **14**, 397-402.
- Brossard L, Martin C & Michalet-Doreau B (2003) Ruminal fermentative parameters and blood acido-basic balance changes during the onset and recovery of induced latent acidosis in sheep. *Animal research* **52** (6), 513-530.
- Brownlee A (1956) The developpement of the rumen papillae in cattle fed on different diets. *British Veterinary Journal* **112**, 369-375.
- Bryant MP (1959) Bacterial species of the rumen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **23**, 125-153.
- Bryant MP & Burkey LA (1953) Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. *Journal of Dairy Science* **13**, 205-217.
- Bryant MP, Small N, Bouma C & Robinson IM (1958) Studies of the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *Journal of dairy science* **41**, 1747-1767.
- Burrin DG & Britton RA (1986) Response to monensin in cattle during subacute acidosis. *Journal of Animal Science* **63**, 888-893.
- Call DR, Brockman FJ & Chandler DP (2001) Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *International journal of food microbiology* **67**, 71-80.
- Cardinale BJ, Palmer MA & Collins SL (2002) Species diversity enhances ecosystem functioning through interspecific facilitation. *Nature* **415**, 426-429.
- Casamayor EO, Schafer H, Baneras L, Pedros-Alio C & Muyzer G (2000) Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring

- sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 499-508.
- Case RJ, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle WF & Kjelleberg S (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 278-288.
- Cheng KJ & Costerton CE (1980) Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. In *Digestive physiology and metabolism in ruminants*, pp. 227-250.
- Cheng KJ & Costerton JW (1986) Microbial adhesion and colonization within the digestive tract. *Society for Applied Bacteriology symposium series* **13**, 239-261.
- Cheng KJ & McAllister TA (1997) Compartmentation in the rumen. In *The rumen microbial ecosystem*, pp. 492-522 [Hobson and CS Stewart, editors]. London: Blackie Academic and Professional.
- Cheng KJ, McCowan RP & Costerton JW (1979) Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *American Journal of Clinical Nutrition* **32**, 139-148.
- Cheng KJ & Wallace RJ (1979) The mechanism of passage of endogenous urea through the rumen wall and the role of ureolytic epithelial bacteria in the urea flux. *British Journal of Nutrition* **42**, 553-557.
- Cho SJ, Cho KM, Shin EC, Lim WJ, Hong SY, Choi BR, Kang JM, Lee SM, Kim YH, Kim H & Yun HD (2006) 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **16**, 92-101.
- Collado MC & Sanz Y (2007) Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by the use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques. *Veterinary microbiology* **121**, 299-306.
- Cook AR (1976) Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. *J Gen Microbiol* **92**, 32-48.
- Costabile M, Quach A & Ferrante A (2006) Molecular approaches in the diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Human mutation* **27**, 1163-1173.
- Cotta MA & Hespell RB (1986) Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. In *Control of digestion and metabolism in ruminants*, pp. 122-136 [LP Milligan, WL Grovum and A Dobson, editors]. New Jersey: Prentice-Hall, Englewood Cliffs.

- Cotta MA, Whitehead TR & Zeltwanger RL (2003) Isolation, characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. *Environmental Microbiology* **5**, 737-745.
- Culhane AC, Perriere G & Higgins DG (2003) Cross-platform comparison and visualisation of gene expression data using co-inertia analysis. *BMC Bioinformatics* **4**, 59.
- Czerkawski DE (1986a) Degradation of solid feeds in the rumen: spatial distribution of microbial activity and its consequences. In *Control of digestion and metabolism in ruminants*, pp. 158-172 [A Dobson, editor]. Englewood Cliffs NJ: Prentice-Hall.
- Czerkawski JW (1986b) Compartmentation in the rumen. In *An introduction to rumen studies*, pp. 65-84 [JW Czerkawski, editor]. Oxford: Pergamon Press.
- Dahllof I (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 213-217.
- Dahllof I, Baillie H & Kjelleberg S (2000) rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 3376-3380.
- Daly K, Stewart CS, Flint HJ & Shirazi-Beechey SP (2001) Bacterial diversity within the equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. *FEMS microbiology ecology* **38**, 141-151.
- Davies AW & Taylor K (1965) Application of the autoanalyser in a river authority laboratory. *Symposium Technicon*, 294-300.
- Dehority BA (1975) Characterization studies on rumen bacteria isolated from Alaskan reindeer (*Rangifer tarandus* L.). *1st international Reindeer and Caribou Symposium* **1**, 228-240.
- Dehority BA (1986) Microbes in the foregut of arctic ruminants. *Control of digestion and metabolism in ruminants. Proceedings of the Sixth International Symposium on Ruminant Physiology held.*
- Dehority BA & Grubb JA (1976) Basal medium for the selective enumeration of rumen bacteria utilizing specific energy sources. *Applied and Environmental Microbiology* **32**, 703-710.
- Dehority BA & Grubb JA (1977) Characterization of the predominant bacteria occurring in the rumen of goats (*Capra hircus*). *Applied and Environmental Microbiology* **33**.
- Dehority BA & Grubb JA (1981) Bacterial population adherent to the epithelium on the roof of the dorsal rumen of sheep. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 1424-1427.

- Dehority BA & Orpin CG (1997) Development of, and natural fluctuation in, rumen microbial population. In *The rumen microbial ecosystem*, pp. 192-245. London: Chapman and Hall.
- Dinsdale D, Cheng KJ, Wallace RJ & Goodlad RA (1980) Digestion of epithelial tissue of the rumen wall by adherent bacteria in infused and conventionally fed sheep. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 1059-1066.
- Downes J, Munson MA, Spratt DA, Kononen E, Tarkka E, Jousimies-Somer H & Wade WG (2001) Characterisation of *Eubacterium*-like strains isolated from oral infections. *Journal of Medical Microbiology* **50**, 947-951.
- Eadie JM & Gill JC (1971) The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a roughage-concentrate diet. *British Journal of Nutrition* **26**, 155-167.
- Eadie JM & Hobson PN (1962) Effect of the presence or absence of rumen ciliate protozoa on the total rumen bacterial count in lambs. *Nature* **193**, 503-505.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE & Relman DA (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638.
- Edwards JE, Bequette BJ, McKain N, McEwan NR & Wallace RJ (2005) Influence of flavomycin on microbial numbers, microbial metabolism and gut tissue protein turnover in the digestive tract of sheep. *British Journal of Nutrition* **94**, 64-70.
- Edwards JE, McEwan NR, Travis AJ & Wallace RJ (2004) 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **86**, 263-281.
- Erwin DP, Erickson IK, Delwiche ME, Colwell FS, Strap JL & Crawford RL (2005) Diversity of oxygenase genes from methane- and ammonia-oxidizing bacteria in the Eastern Snake River Plain aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 2016-2025.
- Eugène M, Archimède H, Michalet-Doreau B & Fonty G (2004) Effects of defaunation on microbial activities in the rumen of rams consuming a mixed diet (fresh *Digitaria decumbens* grass and concentrate). *Animal Research* **53**, 187-200.
- Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM & Akkermans AD (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 219-226.
- Fonty G & Gouet P (1989) Establishment of microbial population in the rumen. Utilization of an animal model to study the role of the different cellulolytic microorganisms *in vivo*.

- In *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, pp. 39-49 [JV Nolan, RA Leng and D Demeyer, editors]. Armidale, Australia: Penambule Books.
- Fonty G, Gouet P, Jouany JP & Senaud J (1987) Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *Journal of General Microbiology* **133**, 1835-1846.
- Ford CW, Elliott R & Maynard PJ (1987) The effect of chlorite delignification on digestibility of some grass forages and on intake and rumen microbial activity in sheep fed barley straw. *Journal of Agricultural Sciences* **108**, 129-136.
- Forsberg CW & Lam K (1977) Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology* **33**, 528-537.
- Friedrich MW (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 59-66.
- Friswell M, Gilbert P, Allison D, Stratford I, Telfer B & Mcbain A (2006) Murine gut microbiome: nature and nurture. *Reproduction Nutrition Développement* **46** S1-S138, S6.
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teyssier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M & Rossi P (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**, 634-643.
- Garcia-Martinez J, Acinas SG, Anton AI & Rodriguez-Valera F (1999) Use of the 16S--23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of microbiological methods* **36**, 55-64.
- Gebhart CJ, Ward GE, Chang K & Kurtz HJ (1983) *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *American journal of veterinary research* **44**, 361-367.
- Goad DW, Goad CL & Nagaraja TG (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *Journal of Animal Science* **76**, 234-241.
- Grau FH (1988) *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter hyointestinalis* in the intestinal tract and on the carcasses of calves and cattle. *Journal of Food Protection* **51**, 857-861.

- Green GL, Brostoff J, Hudspith B, Michael M, Mylonaki M, Rayment N, Staines N, Sanderson J, Rampton DS & Bruce KD (2006) Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 460-469.
- Green SJ (2005) Don't panic: a guide to denaturing gradient gel electrophoresis.
- Grenet E, Breton A, Barry P & Fonty G (1989a) Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonisation as affected by diet composition. *Animal Feed Science and Technology* **26**, 55-70.
- Grenet E, Fonty G, Jamot J & Bonnemoy F (1989b) Influence of diet and monensin on development of anaerobic fungi in the rumen, duodenum, cecum, and feces of cows. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2360-2364.
- Gutell RR, Larsen N & Woese CR (1994) Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiological reviews* **58**, 10-26.
- Hebenbrock K, Williams PM & Karger BL (1995) Single strand conformational polymorphism using capillary electrophoresis with two-dye laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **16**, 1429-1436.
- Hespell RB, Aiken DE & Dehority BA (1997) Bacteria, fungi, and protozoa in the rumen. In *Gastrointestinal microbiology*, pp. 59-141 [RI Mackie and BA White, editors]. New York: Chapman et Hall.
- Hill BD, Thomas RJ & Mackenzie AR (1987) *Campylobacter hyointestinalis*-associated enteritis in Moluccan rusa deer (*Cervus timorensis subsp. Moluccensis*). *Journal of Comparative Pathology* **97**, 687-694.
- Hobson PN, Mann SO & Summers R (1976) Rumen micro-organisms in red deer, hill sheep and reindeer in the scottish highlands. *Proceedings - Royal Society of Edinburgh. Section B: Natural environment* **75**, 171-180.
- Hollocher TC, Tate ME & Nicholas DJ (1981) Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. Definite ¹⁸O-tracer evidence that hydroxylamine formation involves a monooxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* **256**, 10834-10836.
- Holmes AJ, Costello A, Lidstrom ME & Murrell JC (1995) Evidence that particulate methane monooxygenase and ammonia monooxygenase may be evolutionarily related. *FEMS microbiology letters* **132**, 203-208.
- Horner-Devine MC, Lage M, Hughes JB & Bohannon BJ (2004) A taxa-area relationship for bacteria. *Nature* **432**, 750-753.

- Horz HP, Yimiga MT & Liesack W (2001) Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxoF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4177-4185.
- Hungate (1966) The rumen and its microbes. *Academic Press*.
- Hyman MR & Wood PM (1983) Methane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Biochemical Journal* **212**, 31-37.
- Inglis GD, Kalischuk LD & Busz HW (2004) Chronic shedding of *Campylobacter* species in beef cattle. *J Appl Microbiol* **97**, 410-420.
- Jalava J & Eerola E (1999) Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49 Pt 4**, 1375-1379.
- Janse I, Bok J & Zwart G (2004) A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 279-281.
- Jayne-Williams DJ (1979) The bacterial flora of the rumen of healthy and bloating calves. *The Journal of Applied Bacteriology* **47**, 271-284.
- Jiang QQ & Bakken LR (1999) Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 2679-2684.
- Jouany JP & Senaud J (1979) Defaunation of the sheep rumen. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* **19**, 619-624.
- Jouany JP & Senaud J (1982) [Effect of rumen ciliates on the digestion of different carbohydrates in sheep. I.--Utilization of cell wall carbohydrates (cellulose and hemicellulose) and of starch]. *Reproduction Nutrition Development* **22**, 735-752.
- Kajikawa H, Valdes C, Hillman K, Wallace RJ & Newbold JC (2003) Methane oxidation and its coupled electron-sink reactions in ruminal fluid. *Letter of Applied Microbiology* **36**, 354-357.
- Karnati SK, Yu Z, Sylvester JT, Dehority BA, Morrison M & Firkins JL (2003) Technical note: Specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. *Journal of Animal Science* **81**, 812-815.

- Kinoshita M, Imai S, Ishii T & Ogimoto K (1984) Functional morphology of the utilization of starch grain by rumen Entoniid ciliates in vitro. *Japanese journal of Zootechnology Sciences* **55**, 846-876.
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H & Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* **58**, 169-188.
- Klamer M, Roberts MS, Levine LH, Drake BG & Garland JL (2002) Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4370-4376.
- Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR & Schmidt TM (2001) rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic acids research* **29**, 181-184.
- Klieve AV, Bain PA, Yokoyama MT, Ouwkerk D, Forster RJ & Turner AF (2004) Bacteriophages that infect the cellulolytic ruminal bacterium *Ruminococcus albus* AR67. *Letter of Applied Microbiology* **38**, 333-338.
- Klieve AV & Bauchop T (1988) Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1637-1641.
- Klieve AV & Swain RA (1993) Estimation of ruminal bacteriophage numbers by pulsed-field gel electrophoresis and laser densitometry. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 2299-2303.
- Kocherginskaya SA, Aminov RI & White BA (2001) Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe* **7**, 119-134.
- Koike S, Yoshitani S, Kobayashi Y & Tanaka K (2003) Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. *FEMS Microbiological letters* **229**, 23-30.
- Koper TE, El-Sheikh AF, Norton JM & Klotz MG (2004) Urease-encoding genes in ammonia-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 2342-2348.
- Kropf S, Heuer H, Gruning M & Smalla K (2004) Significance test for comparing complex microbial community fingerprints using pairwise similarity measures. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 187-195.

- Kurata S, Kanagawa T, Kamagata Y, Yamada K, Yokumako T, Torimura M & Kurane R (2001) T-RFLP analysis using a new real-time quantitative PCR method with a quenching primer (QP-PCR). *Ninth International Symposium on Microbial Ecology (ISME-9)*.
- Kurihara Y, Takechi T & Shibata F (1978) Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the rumen of sheep fed on a purified diet. *Journal of Agricultural Science, UK* **90**.
- Kysela DT, Palacios C & Sogin ML (2005) Serial analysis of V6 ribosomal sequence tags (SARST-V6): a method for efficient, high-throughput analysis of microbial community composition. *Environmental Microbiology* **7**, 356-364.
- Larsen N, Olsen GJ, Maidak BL, McCaughey MJ, Overbeek R, Macke TJ, Marsh TL & Woese CR (1993) The ribosomal database project. *Nucleic Acids Research* **21**, 3021-3023.
- Larue R, Yu ZT, Parisi VA, Egan AR & Morrison M (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environmental Microbiology* **7**, 530-543.
- Lau SK, Teng JL, Leung KW, Li NK, Ng KH, Chau KY, Que TL, Woo PC & Yuen KY (2006) Bacteremia caused by *Solobacterium moorei* in a patient with acute proctitis and carcinoma of the cervix. *J Clin Microbiol* **44**, 3031-3034.
- Leedle JA & Hespell RB (1980) Differential carbohydrate media and anaerobic replica plating techniques in delineating carbohydrate-utilizing subgroups in rumen bacterial populations. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 709-719.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindcrona RH, Boye M & Møller K (2002) Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 673-690.
- Lévêque C & Mounolou JC (2001) *Biodiversité, Dynamique biologique et conservation*. Paris.
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD & Gordon JI (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *PNAS* **102**, 11070-11075.
- Liu Q, Feng J & Sommer SS (1996) Bi-directional dideoxy fingerprinting (Bi-ddF): a rapid method for quantitative detection of mutations in genomic regions of 300-600 bp. *Human Molecular Genetics* **5**, 107-114.
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenes JP & Godon JJ (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation

- polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environmental Microbiology* **8**, 720-731.
- Long SS & Swenson RM (1977) Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *The Journal of pediatrics* **91**, 298-301.
- Lueders T, Wagner B, Claus P & Friedrich MW (2004) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology* **6**, 60-72.
- Mackie RI, Aminov RI, White BA & McSweeney CS (2000) Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. In *Ruminant physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*, pp. 61-72 [PB Cronjé, editor].
- Mackie RI & Gilchrist FM (1979) Changes in Lactate-Producing and Lactate-Utilizing Bacteria in Relation to pH in the Rumen of Sheep During Stepwise Adaptation to a High-Concentrate Diet. *Applied and Environmental Microbiology* **38**, 422-430.
- Mackie RI, Sghir A & Gaskins HR (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition* **69**, 1035S-1045S.
- Manefield M, Whiteley AS, Griffiths RI & Bailey MJ (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5367-5373.
- Marsh TL (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 323-327.
- Martin C, Brossard L & Doreau M (2006) Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Productions Animales* **19**, 93-107.
- Martin C, Fonty G & Michalet-Doreau B (2002) Factors affecting the fibrolytic activity of the digestive microbial ecosystems in ruminants. *Gastrointestinal Microbiology in Animals*, 1-17.
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M & Jouany JP (2007) Comment réduire la production de méthane chez les ruminants? *Fourrages* **187**, 283-300.
- Martin-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G & Catroux G (2001) DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2354-2359.
- McAllister TA, Bae HD, Jones GA & Cheng KJ (1994) Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science* **72**, 3004-3018.

- McAllister TA & Cheng KJ (1996) Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Animal Feed Science and Technology* **62** (1), 29-36.
- McCowan RP, Cheng KJ, Bailey CB & Costerton JW (1978) Adhesion of bacteria to epithelial cell surfaces within the reticulo-rumen of cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **35**, 149-155.
- McCowan RP, Cheng KJ & Costerton JW (1980) Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **39**, 233-241.
- McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD & Morgan CA (1995) *Animal Nutrition*.
- McEwan N, Abecia L, Regensbogenova M, Adam C, Findlay P & Newbold C (2005) Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Letter of Applied Microbiology* **41** (1), 97-101.
- Mead LJ & Jones GA (1981) Isolation and presumptive identification of adherent epithelial bacteria ("epimural" bacteria) from the ovine rumen wall. *Applied and Environmental Microbiology* **41**, 1020-1028.
- Mertens DR & Loften JR (1980) The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. *Journal of Dairy Science* **63**, 1437-1446.
- Michalet-Doreau B, Fernandez I, Peyron C, Millet L & Fonty G (2001) Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development* **41**, 187-194.
- Mitsumori M, Ajisaka N, Tajima K, Kajikawa H & Kurihara M (2002) Detection of Proteobacteria from the rumen by PCR using methanotroph-specific primers. *Letter in Applied Microbiology* **35**, 251-255.
- Mogensen J, Bahl A, Kubo T, Elanko N, Taylor R & McKenna WJ (2003) Comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC analysis with direct sequencing for mutation screening in hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of medical genetics* **40**, e59.
- Momol EA, Burr TJ, Reid CL, Momol MT, Hseu SH & Otten L (1998) Genetic diversity of *Agrobacterium vitis* as determined by DNA fingerprints of the 5'-end of the 23S rRNA gene and random Amplified Polymorphic DNA. *Journal of Applied microbiology* **85**, 685-692.
- Morgavi DP, Boudra H, Jouany JP & Graviou D (2003) Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6906-6910.

- Mueller RE, Asplund JM & Iannotti EL (1984a) Successive changes in the epimural bacterial community of young lambs as revealed by scanning electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 715-723.
- Mueller RE, Iannotti EL & Asplund JM (1984b) Isolation and identification of adherent epimural bacteria during succession in young lambs. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 724-730.
- Murray AE, Hollibaugh JT & Orrego C (1996) Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2676-2680.
- Muyzer G, De Waal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
- Nagaraja TG, Narayanan SK, Stewart GC & Chengappa MM (2005) Fusobacterium necrophorum infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe* **11**, 239-246.
- Nagpal ML, Fox KF & Fox A (1998) Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *Journal of Microbiology Methods* **33**, 211-219.
- Nelson KE, Zinder SH, Hance I, Burr P, Odongo D, Wasawo D, Odenyo A & Bishop R (2003) Phylogenetic analysis of the microbial populations in the wild herbivore gastrointestinal tract: insights into an unexplored niche. *Environmental Microbiology* **5**, 1212-1220.
- Neufeld JD, Yu Z, Lam W & Mohn WW (2004) Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities. *Environmental Microbiology* **6**, 131-144.
- Newbold CJ (1985) Ruminal metabolism of lactic acid in sheep receiving a diet of sugar beet pulp and hay. *Proc. Nutr. Soc* **44**, 85A.
- Nocker A, Burr M & Camper AK (2007) Genotypic Microbial Community Profiling: a critical technical review. *Microbial ecology* **54**, 276-289.
- Normand P, Ponsonnet C, Nesme X, Neyra M & Simonet P (1996) ITS analysis of prokaryotes. In *Molecular microbial ecology manual*, pp. 1-12.

- Nozière P & Hoch T (2007) Modelling fluxes of volatile fatty acids from rumen to portal blood. In *Nutrient Digestion and Utilisation in Farm Animals: Modeling Approaches* [JD E Kebreab, A Bannink, WJJ Gerints and J France, editor]. Wallingford: CAB International.
- Odum EP (1971) *Fundamentals of ecology*. Philadelphia, USA: W.B. Saunders Company.
- Ogimoto K & Imai S (1981) *Atlas of rumen microbiology*. Tokyo.
- Orpin CG (1977) On the induction of zoosporogenesis in the rumen phycomycetes *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*. *Journal of General Microbiology* **101**, 181-189.
- Orpin CG (1981) Fungi in ruminant degradation. *Agricultural Science Seminar: Degradation of plant cell wall material*.
- Orpin CG, Mathiesen SD, Greenwood Y & Blix AS (1985) Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). *Applied and Environmental Microbiology* **50**, 144-151.
- Orpin CG & Munn EA (1974) The occurrence of bacteriophages in the rumen and their influence on rumen bacterial populations. *Experientia* **30**, 1018-1020.
- Orskov ER & McDonald J (1979) The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agriculture Science* **92**, 499-503.
- Otten L & De Ruffray P (1996) Major differences between the *rrnA* operons of two strains of *Agrobacterium vitis*. *Archives of Microbiology* **166**, 68-70.
- Otten L, De Ruffray P, de Lajudie P & Michot B (1996) Sequence and characterisation of a ribosomal RNA operon from *Agrobacterium vitis*. *Molecular & General Genetics* **251**, 99-107.
- Ozutsumi Y, Tajima K, Takenaka A & Itabashi H (2005) The effect of protozoa on the composition of rumen bacteria in cattle using 16S rRNA gene clone libraries. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **69 (3)**, 499-506.
- Ozutsumi Y, Tajima K, Takenaka A & Itabashi H (2006) Real-time PCR detection of the effects of protozoa on rumen bacteria in cattle. *Current Microbiology* **52 (2)**, 158-162.
- Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* **276**, 734-740.
- Pearson HA (1967) Rumen Microorganisms in Buffalo from Southern Utah. *Applied Microbiology* **15**, 1450-1451.
- Pearson HA (1969) Rumen microbial ecology in mule deer. *Applied Microbiology* **17**.

- Pedros-Alio C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends in Microbiology* **14**, 257-263.
- Qi Y, Patra G, Liang X, Williams LE, Rose S, Redkar RJ & DelVecchio VG (2001) Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 3720-3727.
- Radajewski S, Ineson P, Parekh NR & Murrell JC (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**, 646-649.
- Ramsak A, Peterka M, Tajima K, Martin JC, Wood J, Johnston ME, Aminov RI & Avgustin G (2000) Unravelling the genetic diversity of ruminal bacteria belonging to the CFB phylum. *FEMS Microbiology Ecology* **33**, 69-79.
- Rieu F, Fonty G, Gaillard B & Gouet P (1990) Electron microscopy study of the bacteria adherent to the rumen wall in young conventional lambs. *Canadian Journal of Microbiology* **36**, 140-144.
- Rieu F, Fonty G & Gouet P (1989) Colony counts and characterization of bacteria adherent to the rumen wall and desquamated epithelial cells in conventional young lambs. *Canadian Journal of Microbiology* **35**, 698-705.
- Rodriguez C, Gonzalez J, Alvir M, Redondo R & Cajarville C (2003) Effects of feed intake on composition of sheep rumen contents and their microbial population size. *British Journal of Nutrition* **89** (1), 97-103.
- Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* **11**, 3-11.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M & Nyren P (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytical Biochemistry* **242**, 84-89.
- Ronaghi M, Uhlen M & Nyren P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**, 363, 365.
- Roussel Y, Wilks M, Harris A, Mein C & Tabaqchali S (2005) Evaluation of DNA extraction methods from mouse stomachs for the quantification of *H. pylori* by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **62**, 71-81.
- Sadet S, Martin C, Meunier B & Morgavi DP (2007a) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1**, 939-944.

- Sadet S, Martin C, Meunier B & Morgavi DP (2007b) Temporal stability and effect of diet changes on bacterial communities and rumen physico-chemical parameters in the rumen of sheep. *FEMS Microbiology Letters* (soumis).
- Savelkoul P, Aarts H, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker J, Schouls L & Lenstra J (1999) Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3083-3091.
- Schwartz E (2007) Characterization of growing microorganisms in soil by stable isotope probing with H₂¹⁸O. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2541-2546.
- Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T & Uchiyama H (2001) A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology letters* **23**, 1205-1208.
- Semrau JD, Chistoserdov A, Lebron J, Costello A, Davagnino J, Kenna E, Holmes AJ, Finch R, Murrell JC & Lidstrom ME (1995) Particulate methane monooxygenase genes in methanotrophs. *Journal of Bacteriology* **177**, 3071-3079.
- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS & Myers RM (1989) Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 232-236.
- Sheng WS, Hsueh PR, Hung CC, Teng LJ, Chen YC & Luh KT (2001) Clinical features of patients with invasive *Eikenella corrodens* infections and microbiological characteristics of the causative isolates. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **20**, 231-236.
- Shimizu T, Ohshima S, Ohtani K, Hoshino K, Honjo K & Hayashi H (2001) Sequence heterogeneity of the ten rRNA operons in *Clostridium perfringens*. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 149-156.
- Shin EC, Cho KM, Lim WJ, Hong SY, An CL, Kim EJ, Kim YK, Choi BR, An JM, Kang JM, Kim H & Yun HD (2004) Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 378-383.
- Stach JEM, Bathe S, Clapp JP & Burns RG (2001) PCR-SSCP comparison of 16S rDNA sequence diversity in soil DNA obtained using different isolation and purification methods. *Fems Microbiology Ecology* **36**, 139-151.

- Stahl DA, Flesher B, Mansfield HR & Montgomery L (1988) Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1079-1084.
- Stanton TB & Canale-Parola E (1980) *Treponema bryantii* sp. nov., a rumen spirochete that interacts with cellulolytic bacteria. *Archives of Microbiology* **127**, 145-156.
- Stevenson DM & Weimer PJ (2007) Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology and Biotechnology* **75**, 165-174.
- Stewart CS, Flint HJ & Bryant MP (1997) The rumen bacteria. In *the rumen microbial ecosystem*, pp. 10-72 [PN Hobson and CS Stewart, editors]. London: Blackie academic and professional publishers.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD & Dore J (1999) Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4799-4807.
- Sultan S, Gupta PK, Kundu SS, Hari S & Lodhi GN (2006) Relative digestion, metabolism and microbial activity in sheep and goat on grass-concentrate diet. *Range Management and Agroforestry* **27**.
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M & Benno Y (2001) Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2766-2774.
- Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Ogata K, Nakamura M, Matsui H & Benno Y (1999) Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiology Ecology* **29**, 159-169.
- Tajima K, Arai S, Ogata K, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M, Aminov RI & Benno Y (2000) Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* **6**, 273-284.
- Tajima K, Nonaka I, Higuchi K, Takusari N, Kurihara M, Takenaka A, Mitsumori M, Kajikawa H & Aminov RI (2007) Influence of high temperature and humidity on rumen bacterial diversity in Holstein heifers. *Anaerobe* **13**, 57-64.
- Takayama Y, Kanoe M, Maeda K, Okada Y & Kai K (2000) Adherence of *Fusobacterium necrophorum* subsp. *necrophorum* to ruminal cells derived from bovine rumenitis. *Lett Appl Microbiol* **30**, 308-311.

- Tamate H, Kikuchi T, Onodera A & Nagatani T (1971) Scanning electron microscopic observation on the surface structure of the bovine rumen mucosa. *Arch Histol Jpn* **33**, 273-282.
- Tarakanov BV (1971) [Bacteriophages in the contents of cattle rumen]. *Mikrobiologiya* **40**, 544-550.
- Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S & Olivier JL (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistics and computing* **7**, 75-83.
- Van der Linden Y, Van gylswyk NO & Schwartz HM (1984) Influence of supplementtation of corn stover with corn grain on the fibrolytic bacteria in the rumen of sheep and their relation to the intake and digestion of fiber. *Journal of Animal Science* **59**, 772-783.
- Van Gylswyk NO & Van der Toorn JJTK (1986) Enumeration of *Bacteroides succinogenes* in the rumen of sheep fed maize straws. *FEMS Microbiology Ecology* **38**, 205-209.
- Varel VH & Dehority BA (1989) Cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 148-153.
- Vérité R, Chapoutot P, Michalet-Doreau B, Peyraud JL & Poncet C (1988) Révision du système des protéines digestibles dans l'intestin (PDI). *Bulletin technique C.R.V.Z. Theix* **70**, 19-34.
- Von Engelhardt W & Hales JR (1977) Partition of capillary blood flow in rumen, reticulum, and omasum of sheep. *American Journal of Physiology* **232**.
- Wallace (1979) An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. *Nature* **279**, 424-426.
- Wallace RJ, Cheng KJ, Dinsdale D & Oerskov ER (1979) An independent microbial flora of the epithelium and its role in the ecomicrobiology of the rumen. *Nature, UK* **279**, 424-426.
- Wallace RJ & Joblin KN (1985) Proteolytic activity of a rumen anaerobic fungus. *FEMS Microbiological Letters* **29**, 19-25.
- Wallace RJ & Munro CA (1986) Influence of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* on the proteolytic activity of a defined mixture of rumen bacteria growing on a solid substrate. *Letter of Applied Microbiology* **3**, 23-26.
- Weatherburn MW (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* **39**, 971-974.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**, 697-703.

- Whitelaw FG, Eadie JM, Mann SO & Reid RS (1972) Some effects of rumen ciliate protozoa in cattle given restricted amounts of a barley diet. *British Journal of Nutrition* **27**, 425-437.
- Whitford MF, Forster RJ, Beard CE, Gong JH & Teather RM (1998) Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe* **4**, 153-163.
- Williams AG & Coleman GS (1997) The rumen protozoa. In *The rumen microbial ecosystem*, pp. 73-139 [HPNaS C.S., editor]. London: Blackie Academic and Professionnal.
- Williams AG & Strachan NH (1984) Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fraction of bovine rumen digesta. *Canadian Journal of Animal Science* **64**, 58-59.
- Williams AG & Withers SE (1991) Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fibre breakdown in the rumen ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology* **70**, 144-155.
- Wilson KH & Blichington RB (1996) Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2273-2278.
- Wood PM (1986) Nitrification as a bacterial energy source. In *Nitrification*, pp. 39-62 [JI Prosser, editor]. Oxford, UK: IRL press.
- Yu Z & Morrison M (2004) Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques* **36**, 808-812.
- Yu Z, Yu M & Morrison M (2006) Improved serial analysis of V1 ribosomal sequence tags (SARST-V1) provides a rapid, comprehensive, sequence-based characterization of bacterial diversity and community composition. *Environmental Microbiology* **8**, 603-611.
- Zitnan R, Bomba A, Sommer A & Kolodzieyski L (1993) Development of rumen metabolism and ruminal epithelium in lambs. *Archiv für Tierernährung* **44** (3), 227-233.
- Zoetendal EG, Akkermans AD & De Vos WM (1998) Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 3854-3859.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, deVisser JAGM & de Vos WM (2001) The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial ecology in health and disease* **13**, 129-134.

Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI & Gaskins HR (2004) Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *The Journal of nutrition* **134**, 465-472.

Etude de la diversité spécifique des bactéries attachées à la paroi du rumen : effet du régime alimentaire

Les bactéries attachées à la paroi du rumen, également appelées communauté épimurale, ne représentent que 1% de la biomasse microbienne totale du rumen. Cette communauté a été très peu étudiée jusqu'à présent, mais elle pourrait néanmoins jouer un rôle important dans le fonctionnement du rumen. L'objectif de notre travail a été de mieux connaître ces bactéries attachées à la paroi du rumen en étudiant leur diversité par PCR-DGGE. Nous avons ainsi montré que, quels que soient le régime et l'espèce animale étudiés, la diversité de cette communauté bactérienne était 1) similaire entre tous les sites de prélèvements épithéliaux, 2) variable entre individus et 3) différente de la diversité des communautés bactériennes du contenu ruminal lui suggérant des rôles spécifiques. Contrairement aux bactéries du contenu ruminal dont la diversité change avec la composition du régime alimentaire, celle des bactéries épithéliales semble stable à moyen terme (2 mois).

Mots clés : rumen, épithélium, communautés bactériennes, régime alimentaire, DGGE.

Diversity of the bacterial community attached to the rumen epithelium: effect of the diet.

Bacteria attached to the rumen epithelium (epimural community) represent only 1% of the total rumen microbial biomass. Information on this community is scarce. However, it could play an important role in rumen function. The purpose of this thesis was to improve our knowledge of this community by studying its diversity by PCR-DGGE. We have shown that, irrespective of diet and animal species, this community was 1) homogeneous between different epithelial sampling sites for the same animal but 2) variable between animals, and 3) different from the bacterial communities present in rumen contents, suggesting specific roles for these epithelial bacteria. Contrary to the rumen content bacterial communities, epithelial bacteria were not affected by diet in up to two months trials.

Keywords: rumen, epithelium, bacterial communities, diet, DGGE.