



Structure et activité de la communauté des Archaea méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants

Milka Popova

► To cite this version:

Milka Popova. Structure et activité de la communauté des Archaea méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22116 . tel-00741981v2

HAL Id: tel-00741981

<https://theses.hal.science/tel-00741981v2>

Submitted on 15 Oct 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.

***ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE,
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre 545

T h e s e

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(SPÉCIALITÉ :NUTRITION ET SCIENCE DES ALIMENTS)

soutenue le 12 Avril 2011

MILKA POPOVA

**Structure et activité de la communauté des *Archaea*
méthanogènes du rumen en relation avec la production de
méthane par les ruminants**

Président : Mme Véronique Julliand
Membres : M. Pierre Peyret
M. Diego Morgavi
Rapporteurs : M. François Enjalbert
M. Lionel Ranjard

Equipe DIMA, Unité de Recherche sur les Herbivores, INRA centre Clermont-Ferrand
/ Theix / Lyon

Résumé

Le méthane (CH₄) est un des principaux gaz à effet de serre. L'élevage est à l'origine d'un tiers du CH₄ produit par l'activité humaine en Europe. En plus, la production de CH₄ représente une perte de 2% à 12 % de l'énergie consommée par l'animal. La méthanogenèse est le résultat de l'activité d'un groupe de microorganismes particuliers - les *Archaea* méthanogènes. La production de CH₄ permet de d'éliminer du milieu ruminal l'hydrogène produit au cours de la fermentation des aliments par les autres microorganismes (bactéries, protozoaires, champignons). En effet, l'accumulation d'hydrogène affecte le fonctionnement optimal du rumen. La réduction des émissions de CH₄ par les ruminants présente donc un intérêt économique et environnemental non négligeable et passe inévitablement par une modification de l'écosystème microbien du rumen.

L'objectif de ce travail de thèse était de relier la production de CH₄ avec la structure et l'activité de la communauté méthanogène du rumen. Différents modèles de manipulation de l'écosystème microbien ruminal comme la défaunation (élimination des protozoaires) et l'utilisation d'aliments connus pour modifier la méthanogenèse ont été utilisés. Le rumen étant un écosystème complexe, les interactions fonctionnelles entre les *Archaea* méthanogènes et les autres microorganismes présents (bactéries et protozoaires) ont également été étudiées. Dans cette optique, des outils de biologie moléculaire, permettant de cibler les principales communautés microbiennes, ont été optimisés.

Nos travaux permettent de conclure sur l'absence de relation claire entre le nombre (et/ou la concentration) des *Archaea* méthanogènes et la méthanogenèse dans le rumen. Cependant les réductions des émissions de CH₄ ont été attribuées aux changements dans la diversité de la communauté méthanogène et la disponibilité en hydrogène. Ce travail de thèse a mis en évidence que les modifications de la composition et/ou de l'activité métabolique de la communauté des *Archaea* méthanogènes seraient à l'origine des réductions des émissions de CH₄ par les ruminants.

Une meilleure connaissance des mécanismes microbiens impliqués dans la production de méthane permettra d'envisager de nouvelles pistes pour diminuer les émissions chez les ruminants.

Abstract

Methane (CH₄) is a major greenhouse gas. Livestock contributes to one third of CH₄ produced by human activity in Europe. Methanogenesis is the result of the activity of a specific group of microorganisms, the methanogenic *Archaea*. This natural process prevents hydrogen accumulation in the rumen, which may affect the optimal feed degradation, but it represents a loss of 2% to 12% of energy consumed by the animal. Reduction of CH₄ emissions from ruminants presents therefore economic and environmental benefits and inevitably involves a change in rumen microbial ecosystem. However microbial mechanisms of CH₄ production in the rumen are still poorly understood.

The objective of this thesis was to relate the production of CH₄ with the structure and/or the activity of the methanogenic rumen community. Different models of manipulation of the rumen microbiota such as defaunation (removal of protozoa) and the use of feed known to affect methanogenesis were used. Interactions between methanogenic *Archaea* and other microorganisms (bacteria and protozoa) were also studied in the complex rumen ecosystem. In this context, tools of molecular biology, to identify key microbial communities, were optimized.

Our work allows to conclude that there is no clear relationship between the number of methanogenic *Archaea* and methanogenesis rate in the rumen. However, reduction in CH₄ emissions could be attributed to changes in the diversity of the methanogenic community and the availability of hydrogen. This thesis has shown that changes in the composition and / or metabolic activity of methanogenic *Archaea* community were associated to the reductions in CH₄ emissions observed in our animal trials.

A better understanding of microbial mechanisms involved in the production of methane will consider new ways to reduce emissions in ruminants

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements à Diego Morgavi et Cécile Martin, qui ont su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Nos échanges continuels, si riches, ont sûrement été la clé de réussite de ce travail. Je n'aurais pas pu espérer avoir de meilleurs encadrants.

Merci à Mr Lionel Ranjard (Directeur de Recherches à l'INRA de Dijon) et Mr. Francis Enjalbert (Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je voudrais également remercier Mme Véronique Julliand qui a accepté de présider mon jury de thèse.

Mes remerciements vont également à Pascale Mosoni, Valérie Monteils et Pierre Peyret tous membres de mon comité d'encadrement, pour la gentillesse et la patience qu'ils ont manifestées à mon égard durant cette thèse, pour tous les conseils.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'équipe DIMA de l'URH et je remercie ici TOUS les membres. Je ne citerai pas tout le monde, par peur d'en oublier, mais je tiens à vous dire un grand Merci pour votre soutien scientifique mais aussi et surtout pour avoir réussi à créer une super ambiance au sein et en dehors du labo. Je souhaite exprimer ici ma reconnaissance à Yvanne Rochette et Dominique Graviou qui m'ont transmis leurs compétences « méthane » et « DGGE » respectivement. Merci également à Stéphane, Christelle, Hanh, Hajer, Vincent, Mathieu pour nos soirées entre « jeunes » et à Audrey pour les vendredis aux « Beaux Arts ». Une très spéciale dédicace au grand maître Abder pour nos discussions pas tout à fait scientifiques, pour ton amitié et pour tous les moments de détente et fous rires inoubliables passés ensemble. Last but not least, Maguy, merci d'avoir partagé ta passion pour la recherche avec moi ; merci pour tous tes conseils, remarques, suggestions ; merci pour nos longues conversations même si souvent elles tournaient « hors sujet » ; merci pour ta compagnie ainsi que de m'avoir donné ton amitié.

Je ne saurais clore cette page sans remercier, pour leur contribution à des degrés divers dans la réalisation de ce travail : Maryse Theyssedre (pour les points administratifs), Marie-Madeleine Mialon, Geneviève Gentes, Ourdia Bouzid, Corinne Petit, Pauline Savajols. Merci pour votre patience, gentillesse et efficacité. Merci à tout le personnel de l'« Annexe Ovins » et tout particulièrement à Michel Fabre et Sébastien Alcouffe pour votre bonne humeur et d'avoir toujours répondu présents quand j'avais besoin d'aide. Merci à Mickaël Bernard, Cédric Rougheol et Pascal Payard de l'Installation expérimentale « Intrabois » pour votre disponibilité et votre sérieux. Enfin, merci au personnel de l'abattoir de Theix, d'avoir toujours été attentifs à mes demandes ; merci à Cédric et Julien d'avoir fait des prélèvements des moments très agréables ; merci à Simon d'en avoir fait plus !

Merci à ma famille d'avoir su me reconforter dans les moments difficiles malgré la distance. Надя, Илиан, мамо, тати, без Вас нямаше да стигна до тук. Благодаря за всичко ! Merci à Claude et Farida, mes « parents français », pour leur soutien.

Enfin merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées ici et qui se reconnaîtront dans ces quelques lignes !

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA THESE

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES DANS DES REVUES A COMITE DE LECTURE

Popova M., Martin C., Morgavi D.P., 2010 **Improved protocol for high-quality coextraction of DNA and RNA from rumen digesta**. Folia Microbiologica **55** (4), 368–372

Popova M., Martin C., Eugene M., Mialon MM., Doreau M., Morgavi D.P., 2011 **Diet compositionn influences methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls**. Animal Feed Science and Technology (sous presse)

Popova M., Martin C., Bouzid O., Peyret P., Petit C., Morgavi D.P., **Defaunation decreases methane production by inhibiting the metabolic activity of methanogenic *Archaea* in the rumen of sheep**. ISME (en préparation)

Popova M., Morgavi D.P., Doreau M., Martin C., **Production de méthane et interactions microbiennes dans le rumen**. INRA Production Animales (synthèse bibliographique, en préparation)

Popova M., Martin C., Morgavi D.P., **Methanogenic *Archaea* community structure and activity in the rumen and cecum of lambs fed corn or wheat high concentrate diets**. Animal (en preparation)

COMMUNICATIONS EN CONGRÈS ET JOURNÉES D'ANIMATIONS

Popova M., Martin C., Graviou D., Rochette Y., Morgavi D.P. “**Archaeal community structure and methanogenesis kinetics in the rumen of sheep**” International Symposium on Anaerobic Microbiology, 18 – 20 June 2009, Liblice, Czech Republic (communication orale)

Popova M., Martin C., Graviou D., Rochette Y., Morgavi D.P. « **Cinétiques postprandiales de la production de méthane et de la communauté microbienne méthanogène du rumen chez le mouton fauné et défauné** », 3^{ème} Journée d'Animation Scientifique du département de physiologie animale et système d'élevage de l'INRA, 7-8 Octobre 2009, Tours, France (communication orale)

Popova M., Martin C., Graviou D., Rochette Y., Morgavi D.P. “**Methanogenesis and fermentation kinetics in the rumen of sheep with or without protozoa**” International Symposium on Ruminant Physiology, 6 – 9 Sept 2009, Clermont-Ferrand, France (poster)

Popova M., Martin C., Morgavi D.P. « **Structure et activité de la communauté méthanogène du rumen en relation avec la production de méthane chez les ruminants** » Journées de l'école doctorale 2010, Clermont-Ferrand, France

Popova M., Martin C., Graviou D., Rochette Y., Morgavi D.P. “**Methane emissions and rumen methanogens in sheep harboring or not protozoa**” Rowett – INRA 2010 Symposium Gut Microbiology : new insights into gut microbial ecosystems, 23-25 Juin 2010 Aberdeen, Scotland (UK) (communication orale)

Popova M., Martin C., Eugène M., Mialon M.M., Doreau M., Morgavi D. P. “**Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls**” Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference 2010 3-8 Octobre 2010 Banff, Canada (communication orale)

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
I. INTRODUCTION GENERALE	3
II. PRODUCTION ET ÉMISSION DE MÉTHANE PAR LES RUMINANTS	5
II.1. L'effet de serre et le méthane	5
II.2. Les ruminants et le méthane	7
III. DIGESTION CHEZ LE RUMINANT	9
III.1. Anatomie du tube digestif	9
III.2. Les conditions physico-chimiques du milieu ruminal	10
III.3. Les conditions physico-chimiques du cæcum-colon	11
III.4. L'alimentation des ruminants	11
III.5. La dégradation des aliments dans le tube digestif	13
III.5.1. La dégradation des aliments dans le rumen	13
III.5.2. La dégradation des aliments dans le cæcum-colon	15
III.6. Relations stœchiométriques	15
ETAT DE L'ART	17
IV. LES MICROORGANISMES PRODUCTEURS DE MÉTHANE	19
IV.1. Rappels sur le domaine des Archaea	19
IV.2. Le groupe des Archaea méthanogènes	21
IV.2.1. Le génome des méthanogènes	23
IV.2.2. Métabolisme méthanogène	25
IV.3. Population méthanogène du rumen	28
V. AUTRES POPULATIONS MICROBIENNES DANS LE TUBE DIGESTIF	33
V.1. Les bactéries du rumen	33
V.2. Les protozoaires	40
V.3. Les champignons	41
VI. POURQUOI LA PRODUCTION DE METHANE VARIE ?	42
PRODUCTION DE METHANE ET INTERACTIONS MICROBIENNES DANS LE RUMEN	43

MATÉRIELS & MÉTHODES _____72

VII.	MESURER LA PRODUCTION DE METHANE	74
VII.1.	Principe de la technique du gaz traceur SF6	74
VII.2.	Analyse des gaz	76
VIII.	METHODES MOLECULAIRES POUR L'ETUDE DE L'ECOSYSTEME MICROBIEN DU RUMEN	77
VIII.1	La notion d'écosystème microbien	77
VIII.2	La notion de marqueur moléculaire	78
VIII.3	Le gène fonctionnel <i>mcrA</i>	80
VIII.3.1.	<i>Marqueur phylogénétique</i>	80
VIII.3.2.	<i>Marqueur fonctionnel</i>	84
VIII.4	La « démarche » moléculaire pour caractériser les méthanogènes du rumen	85
VIII.4.1	<i>Prélèvement et stockage des échantillons</i>	85
VIII.4.2	<i>Extraction des acides nucléiques</i>	85

IMPROVED PROTOCOL FOR HIGH-QUALITY CO-EXTRACTION OF DNA AND RNA FROM RUMEN DIGESTA. _____88

VIII.4.3	<i>Analyse des ARN</i>	96
VIII.4.4	<i>La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</i>	96

IX.	AVANTAGES ET INCOVENIENTS DE DEUX TECHNIQUES MOLECULAIRES UTILISEES POUR CARACTERISER LES ARCHAEA METHANOGENES DU RUMEN	101
IX.1.	L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant	101
XI.1.1.	<i>Principe</i>	101
XI.1.2.	<i>Les avantages</i>	102
XI.1.3.	<i>Les inconvénients</i>	104
XI.1.4.	<i>La technique au laboratoire</i>	106
IX.2.	La PCR quantitative en temps réel	107
IX.2.1.	<i>Principe</i>	107
IX.2.2.	<i>Les différentes stratégies de quantification</i>	111
IX.2.3.	<i>Les inconvénients de la qPCR</i>	113

EXPÉRIMENTATIONS _____116

X.	STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE	118
----	-------------------------	-----

X.1. Première expérimentation	119
“RUMINAL PROTOZOA INCREASE SHEEP METHANE EMISSIONS BY STIMULATING METHANOGENS METABOLIC ACTIVITY”	122
X.2. Deuxième expérimentation	155
“METHANOGENIC ARCHAEA COMMUNITY STRUCTURE AND ACTIVITY IN THE RUMEN AND CÆCUM OF LAMBS FED CORN OR WHEAT BASED HIGH CONCENTRATE DIETS”	159
X.3. Troisième expérimentation	189
EFFECT OF FIBRE- AND STARCH-RICH FINISHING DIETS ON METHANOGENIC ARCHAEA DIVERSITY AND ACTIVITY IN THE RUMEN OF FEEDLOT BULLS”	191
DISCUSSION & PERSPECTIVES	203
XI. DISCUSSION GENERALE	204
XI.1. Rôle de la structure de la communauté méthanogène dans la méthanogénèse	205
XI.1.1. <i>Changements dans la taille de la population méthanogène</i>	205
XI.1.2. <i>Changements dans la composition de la population méthanogène</i>	210
XI.2. Activité métabolique des méthanogènes	213
XII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	219
ANNEXES	223
ANNEXE 1 : Variations dans la production de méthane entérique	224
ANNEXE 2 : Informations minimum requises pour la publication des résultats qPCR	234
ANNEXE 3 : Calcul de l’efficacité de la qPCR	235
ANNEXE 4 : Protocole d’extraction d’acides nucléiques (ADN et ARN) à partir d’échantillons de contenu ruminal	236
ANNEXE 5 : Technique URH de la mesure de la production de méthane par les ruminants	240
BIBLIOGRAPHIE	241

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : SUBSTRATS ET HABITATS TYPQUES DES ARCHAEA METHANOGENES	22
TABLEAU 2 : DISTRIBUTION DES GENES CODANT POUR DES ENZYMES DE LA VOIE METHANOGENE CHEZ DIFFERENTS PROCARYOTES	24
TABLEAU 3 : CARACTERISTIQUES THERMODYNAMIQUES DES PROCESSUS REDUCTIFS EN ANAEROBIOSE	25
TABLEAU 4 : PRINCIPALES ESPECES BACTERIENNES DU RUMEN, LEURS SUBSTRATS ET PRODUITS DE FERMENTATION.	34
TABLEAU 5 : ABONDANCE RELATIVE DES PROTOZOAIRE DU RUMEN CHEZ DES VACHES RECEVANT DEUX RATIONS DIFFERENTES	41
TABLEAU 6 : COUPLES D'AMORCES POUR L'AMPLIFICATION DE FRAGMENTS DES GENES MCRA ET MRTA	98
TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES DES GELS ET DES CONDITIONS DU MIGRATION EN FONCTION DU GENE ETUDIE.	107
TABLEAU 8 : RECAPITULATIF DES RESULTATS DES TROIS EXPERIMENTATIONS RELIANT LES VARIATIONS DE LA PRODUCTION DE METHANE A LA STRUCTURE DE LA COMMUNAUTE METHANOGENE.	208
TABLEAU 9 : ACTIVITE METABOLIQUE DES METHANOGENES, ET PRODUCTION ET UTILISATION D'HYDROGENE DANS LES TROIS EXPERIMENTATIONS.	210
TABLEAU 10 : STRATEGIES ACTUELLEMENT ETUDIEES POUR REDUIRE LES EMISSIONS DE CH ₄ PAR LES RUMINANTS, LEUR MECANISMES ET LIMITE	226
TABLEAU 11 : AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA PRESENCE DES PROTOZOAIRE SUR LES FONCTIONS DU RUMEN ET LES PERFORMANCES ANIMALES	229

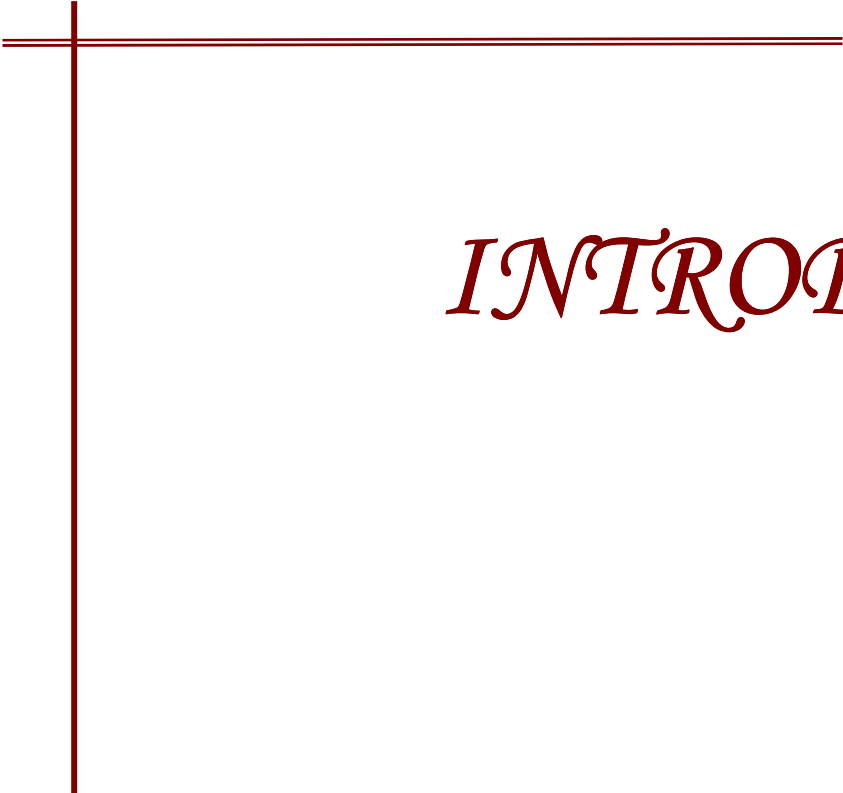
LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : PRINCIPE DE L’EFFET DE SERRE.....	4
FIGURE 2 : EMISSIONS ATMOSPHERIQUES DE CH ₄ PAR SECTEUR EN FRANCE MÉTROPOLITAINE EN KT (HORS UTCF).....	6
FIGURE 3 : TUBE DIGESTIF DES RUMINANTS.....	9
FIGURE 4 : VOIES DU METABOLISME DES GLUCIDES DANS LE RUMEN	14
FIGURE 5 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES TROIS DOMAINES DU MONDE VIVANT.....	18
FIGURE 6 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES ARCHAEA METHANOGENES	20
FIGURE 7 : VOIES METABOLIQUES DE LA METHANOGENESE	26
FIGURE 8 : ARBRE PHYLOGENIQUE DES ARCHAEA DU RUMEN.....	30
FIGURE 9 : DENDROGRAMME CONSTRUIT EN UTILISANT LA METHODE UPGMA SUR LES PROFILS DE MIGRATION EN PCR-DGGE DES SEQUENCES RRS ISOLEES DE BACTERIES DU RUMEN.....	36
FIGURE 10 : STRUCTURE D’UNE CAPSULE EN LAITON.....	73
FIGURE 11 : LES DIFFERENTS COMPOSANTS DU SYSTEME DE COLLECTE DES GAZ.....	73
FIGURE 12 : LES DIFFERENTES PARTIE D’UNE CANULE A GAZ	75
FIGURE 13 : STRUCTURE SECONDAIRE DE LA MOLECULE DE L’ARNR 16S.....	79
FIGURE 14 : REGULATION PAR L’HYDROGENE DE LA TRANSCRIPTION DE GENES IMPLIQUES DANS LA METHANOGENESE CHEZ M. THERMOAUTOTROPHICUM	81
FIGURE 15 : ALIGNEMENTS DES SEQUENCES PROTEIQUES PARTIELLES DU GENE MCRA DE CINQ ESPECES DE METHANOGENES	82
FIGURE 16 : ARBRES PHYLOGENETIQUES CONSTRUIES EN UTILISANT LES SEQUENCES DES GENES ARCHAEALS RRS (A) ET MCRA (B)	83
FIGURE 17 : PRINCIPE DE LA PCR	97
FIGURE 18 : SITES D’HYBRIDATION DES DIFFERENTS COUPLES D’AMORCES DESIGNEES POUR L’AMPLIFICATION DU GENE MCRA.....	99
FIGURE 19 : EXEMPLES DE BIAIS INTRODUIES DANS L’ANALYSE DE LA POPULATION METHANOGENE EN FONCTION DES AMORCES UTILISEES.....	100
FIGURE 20 : SCHEMA ILLUSTRANT LE PRINCIPE DE LA DGGE.....	102
FIGURE 21 : PROFILS RRS PCR DGGE DE LA COMMUNAUTE METHANOGENE..	103

FIGURE 22 : PROFIL DÉFORMÉ SUITE À LA RÉALISATION D'UN GRADIENT NON LINÉAIRE	106
FIGURE 23 : PRINCIPE DE LA QPCR UTILISANT LE SYBR GREEN I.....	108
FIGURE 24 : SUIVI DE L'AMPLIFICATION EN TEMPS REEL	109
FIGURE 25 : EXEMPLES DE RESULTATS D'AMPLIFICATION EN QPCR.....	109
FIGURE 26 : CONCENTRATION (A) ET NOMBRE TOTAL (B) DES COPIES DU GENE MCRA OBTENUS DANS LES TROIS EXPERIMENTATIONS.	206
FIGURE 27 : DIAGRAMME DE VENN CONSTRUIT SOUS MOTHUR AVEC LES SEQUENCES DES 4 BANQUES DE CLONES ; LA SIMILARITE DES SEQUENCES AU SEIN D'UNE MEME ESPECE EST FIXEE A 97%.	210
FIGURE 28 : CINETIQUES FERMENTAIRE ET MICROBIENNE DANS LE RUMEN DE MOUTONS ALIMENTES AVEC UN REPAS PAR JOUR.....	210
FIGURE 29 : COMPARAISON DES PROFILS MCRA OBTENUS AVEC DES SEQUENCES ADN OU ADNC D'UN MEME ECHANTILLON.....	216
FIGURE 30 : RELATION ENTRE LA PRODUCTION DE CH ₄ , MESUREE DANS DES CHAMBRES RESPIRATOIRES, ET LE NIVEAU D'INGESTION.....	225
FIGURE 31 : INFLUENCE DES VARIATIONS DU NIVEAU ALIMENTAIRE SUR LA PERTE D'ÉNERGIE SOUS FORME DE CH ₄	227
FIGURE 32 : EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN LIN SUR LA METHANOGENESE CHEZ LA VACHE LAITIERE	228

LISTE DES ABBREVIATIONS

<i>ADF</i>	<i>Acid Detergent Fibre</i>
<i>ADL</i>	<i>Acid Detergent Lignin</i>
ADN (<i>DNA</i>)	Acide Désoxyribonucléique
ADNc (<i>cDNA</i>)	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
AGV (<i>VFA</i>)	Acides Gras Volatiles
ARNm (<i>mRNA</i>)	Acide Ribonucléique messager
ARNr (<i>rRNA</i>)	Acide Ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine Triphosphate
CITEPA	Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
<i>CP</i>	<i>Crude Protein</i>
<i>DGGE</i>	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>
EB (<i>GE</i>)	Energie Brute
EBI (<i>GEI</i>)	Energie Brute Ingérée
GES (<i>GHG</i>)	Gaz à Effet de Serre
<i>LCFA</i>	<i>Long-Chain Fatty Acids</i>
<i>MCFA</i>	<i>Medium-Chain Fatty Acids</i>
MCR	Méthyle Coenzyme-M réductase
MO (<i>OM</i>)	Matière Organique
MS (<i>DM</i>)	Matière Sèche
MSI (<i>DMI</i>)	Matière Sèche Ingérée
<i>NDF</i>	<i>Neutral Detergent Fibre</i>
<i>OTU</i>	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRG	Pouvoir de Réchauffement Global
<i>qPCR</i>	<i>Quantitative (real time) PCR</i>
<i>RFI</i>	<i>Residual Feed Intake</i>
<i>SSCP</i>	<i>Single Strand Conformation Polymorphisme</i>
<i>UPGMA</i>	<i>Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages</i>
UTCf	Utilisation des Terres, leur Changement et la Forêt



INTRODUCTION



I. INTRODUCTION GENERALE

Le réchauffement climatique est désormais reconnu par l'ensemble de la communauté scientifique et politique. Il est lié aux émissions de gaz à effet de serre (GES) : gaz carbonique, protoxyde d'azote et méthane essentiellement. En ce qui concerne l'élevage, sa contribution aux émissions anthropiques de GES est comprise, selon les modes de calcul, entre 9% et 18%. A l'échelle de l'exploitation, le méthane (exprimé en équivalent carbone) est en première position puisqu'il représente à lui seul plus de 60% du pouvoir de réchauffement global des émissions de GES liées à l'élevage, contre 25% pour le protoxyde d'azote (issu principalement de la fertilisation azotée et des effluents d'élevage) et 15% pour le gaz carbonique (issu principalement de la consommation de fuel pour le fonctionnement de la ferme et la production d'intrants) (Veysset *et al.*, 2010). La contribution de l'élevage au réchauffement climatique n'est donc pas négligeable. Aussi est-il important, à l'instar des autres secteurs d'activité, que le monde de l'élevage se mobilise pour apporter des solutions permettant de réduire ses émissions de GES tout en maintenant l'efficacité des productions animales afin d'assurer la nutrition humaine. Outre l'aspect environnemental, réduire la méthanogenèse présente un intérêt nutritionnel pour le ruminant puisqu'elle constitue une perte en énergie sous forme gazeuse estimée à environ 8-12% de l'énergie brute ingérée vs. 2% -3% pour les équins et 0,5% -2% pour les porcins (Vermorel *et al.*, 2008).

Compte tenu de son volume, de sa localisation dans le tube digestif et de sa contribution à la digestion totale des aliments ingérés par les animaux, le rumen est de loin le compartiment digestif qui a le rôle le plus important dans la production de méthane. Ce gaz est formé naturellement pendant le processus de fermentation microbienne des aliments dans le rumen. En milieu anaérobie comme dans le rumen, les réactions d'oxydation qui génèrent l'énergie (ATP¹) nécessaire à la croissance des microorganismes conduisent à la production d'hydrogène. La présence d'hydrogène « en excès » dans les gaz de fermentation inhibe l'action des déshydrogénases et conduit à un arrêt des fermentations lorsque sa pression partielle devient trop élevée. L'utilisation continue de l'hydrogène dans le rumen est assurée principalement par les *Archaea* méthanogènes pour réduire le gaz carbonique en méthane, alors que d'autres microorganismes comme les bactéries acétogènes sont davantage impliqués dans le métabolisme de l'hydrogène au niveau du gros intestin. L'hydrogène et la

¹ ATP : Adénosine Triphosphate

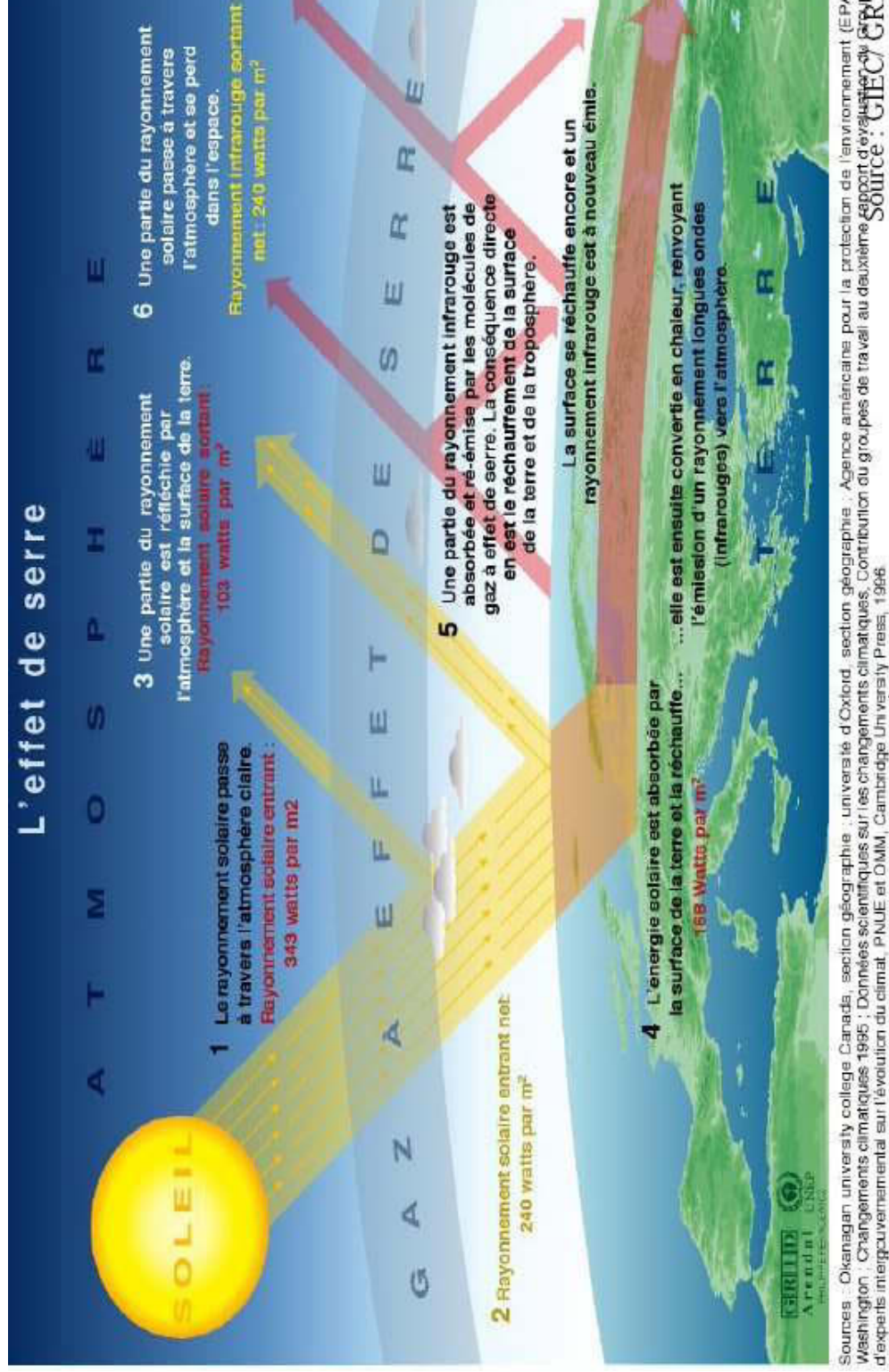


Figure 1 : Principe de l'effet de serre

communauté méthanogène sont donc les deux facteurs déterminants de la méthanogenèse ruminale.

Les stratégies étudiées actuellement pour réduire les émissions de CH₄ entérique (voir Annexe 1), impliquent inévitablement des changements dans l'écosystème microbien. Il peut s'agir d'une : i) **réorganisation complexe de l'écosystème microbien** et en particulier des méthanogènes, avec des espèces minoritaires dans certaines conditions qui deviennent majoritaires dans d'autres ; ii) simple **réorientation du métabolisme**, régulée par la disponibilité du substrat hydrogène, sans pour autant affecter la composition de la communauté microbienne. Très peu d'auteurs se sont proposés cependant de décrire au sein d'une seule étude les variations dans la production de CH₄ et les mécanismes microbiens impliqués. Pourtant, les relations nutritionnelles que les méthanogènes peuvent avoir avec d'autres microorganismes dans le rumen sont particulièrement importantes à explorer pour développer des moyens efficaces de réduction du CH₄. De telles études permettront de mieux comprendre le mode d'action et d'évaluer l'efficacité des différentes stratégies actuellement mises en place pour réduire des émissions de CH₄ par les ruminants. Une meilleure connaissance des paramètres microbiens impliqués dans la méthanogenèse pourra également identifier des nouvelles pistes de recherche pour diminuer la production de CH₄ par les ruminants.

II. PRODUCTION ET ÉMISSION DE MÉTHANE PAR LES RUMINANTS

II.1. L'effet de serre et le méthane

L'effet de serre est un phénomène thermique (Figure 1) où l'atmosphère laisse passer une partie du rayonnement du soleil qui vient frapper le sol. Réchauffé, celui-ci émet un rayonnement infrarouge qui est en partie ou totalement piégé par l'atmosphère rendue "imperméable" par la présence de gaz à effet de serre. Ce sont principalement la vapeur d'eau sur Terre, le dioxyde de carbone (CO₂), le méthane (CH₄), l'oxyde de diazote (N₂O), l'ozone (O₃), les chlorofluorocarbures. L'effet de serre est un phénomène naturel et sans cet effet la température à la surface de la Terre serait de -18°C. Actuellement ce phénomène naturel se renforce à cause de l'accumulation de GES au cours des dernières années. Les émissions de GES dues aux activités humaines n'ont pas cessé de croître depuis l'ère préindustrielle avec

une augmentation de 70% entre 1970 et 2004 (IPCC, 2007). Les différents gaz ne contribuent pas tous à la même hauteur à l'effet de serre. En effet, certains ont un pouvoir de réchauffement plus important que d'autres et/ou une durée de vie dans l'atmosphère plus longue. La contribution à l'effet de serre de chaque gaz se mesure grâce au pouvoir de réchauffement global (PRG). Le PRG d'un gaz se définit comme le forçage radiatif (c'est à dire la puissance radiative que le gaz à effet de serre renvoie vers le sol), cumulé sur une durée de vie donnée dans l'atmosphère. Cette valeur se mesure relativement au CO₂ dont le pouvoir réchauffant équivaut à 1.

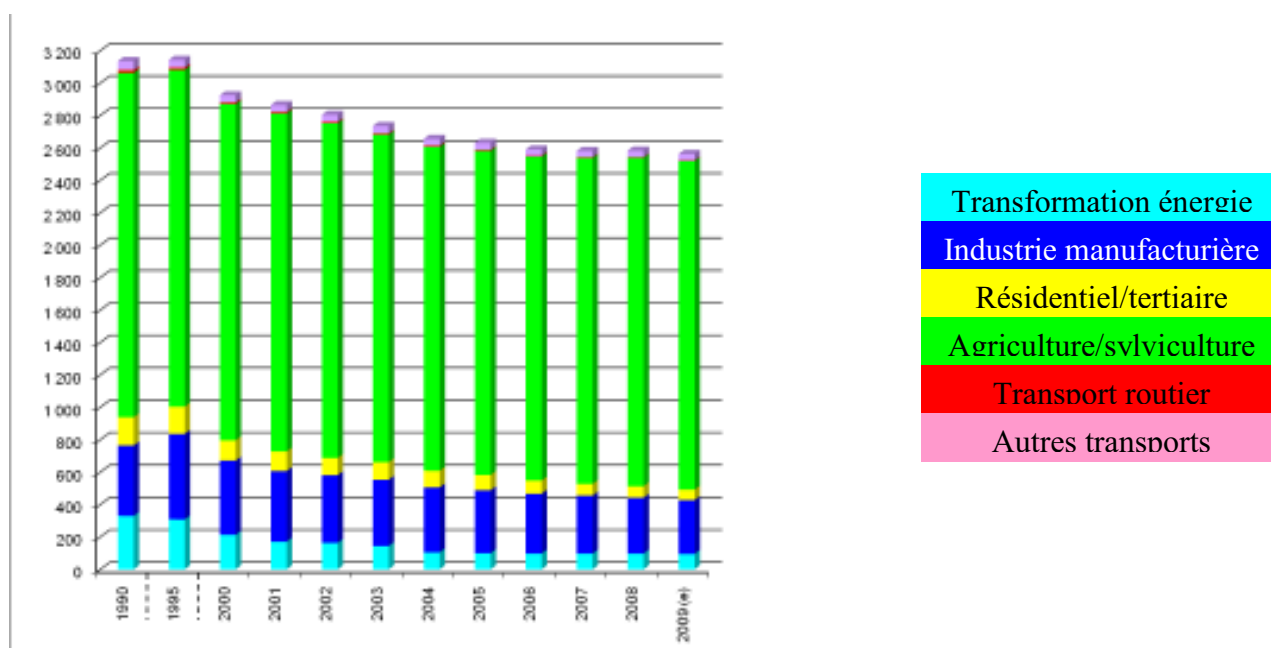


Figure 2 : Emissions atmosphériques de CH₄ par secteur en France métropolitaine en kT (hors UTCF²)

Source : CITEPA, Mai 2010

Une tonne de CH₄ provoque en effet 100 fois plus ou presque de réchauffement durant les cinq premières années de sa durée de vie dans l'atmosphère qu'une tonne de CO₂. Le CH₄ disparaît de l'atmosphère beaucoup plus rapidement que le CO₂ puisqu'il a une demi-vie de 8,5 ans contre plusieurs dizaines d'années pour le CO₂, mais une tonne de CH₄ produit au final 2,75 tonnes de CO₂ en plus dans l'atmosphère.

² UFCT, Utilisation des Terres, leur Changement et la Forêt

Autre aspect important : l'impact sur la santé des hommes. De tous les gaz à effet de serre, le CO₂ est l'un des moins nocifs, tandis que le CH₄, en revanche, est un précurseur de l'ozone troposphérique qui est un polluant atmosphérique toxique.

Afin de réduire de manière significative et rapide les émissions de GES, il est important de mettre l'accent sur la réduction des émissions de CH₄. En ce qui concerne les émissions de CH₄ en France métropolitaine, en 2008 elles étaient de 2 584 kT, ce qui correspond à une baisse de 18% comparativement au niveau de 1990 (source CITEPA 2010).

L'évolution des contributions relatives des différents secteurs depuis 1990 est représentée dans la Figure 2. L'agriculture/sylviculture tient en 2008 la première place avec une baisse de 79.7% des émissions totales de CH₄ (hors UFCT, Utilisation des Terres, leur Changement et la Forêt), suivie de très loin par l'industrie (13.5%).

II.2. Les ruminants et le méthane

L'agriculture ne subit pas seulement les effets du réchauffement global, puisqu'elle est elle-même responsable de 14% des émissions mondiales de GES (FAO-Newsroom, 2009). L'impact du CH₄ entérique sur l'effet de serre n'a été pris en considération qu'au cours des 15 dernières années, mais aujourd'hui il est devenu une préoccupation du monde politique et scientifique. Environ 1,3 milliards de personnes dépendent de l'élevage qui contribue à environ 40% à la production agricole globale (Steinfeld *et al.*, 2006).

Cette activité est, pour de nombreux agriculteurs pauvres des pays en voie de développement, «aussi une source d'énergie renouvelable pour la traction animale et une source essentielle d'engrais organiques pour leurs cultures», selon le rapport de la FAO (FAO, 2007). L'élevage est au niveau mondial l'activité agricole qui se développe le plus rapidement.

Ce secteur fournit 15% de l'énergie et 25% des protéines dans l'alimentation humaine. Dans son rapport de 2009, la FAO a attiré l'attention sur les changements des habitudes alimentaires au niveau mondial depuis 1960 : la consommation de lait par habitant dans les pays en voie de développement a doublé et la consommation de viande a plus que triplé ; les changements ont été moins brusques pour les pays développés et plus accélérés en Chine (la consommation de viande a été multipliée par 4 et celle du lait par 3) (FAO, 2009). La demande accrue de viande et de produits animaux dans beaucoup de pays en voie de développement est la conséquence de la croissance rapide des revenus et de l'urbanisation pendant les trois dernières décennies, en parallèle avec la croissance démographique. En effet, la population mondiale devrait doubler en 2050 (9.15 milliards d'humains attendus) par

rapport à 1900 (4.5 milliards), contre les 7 milliards actuellement (chiffres : Programme des Nations Unies pour le Développement). Selon les estimations de 2008 sur le site de FAOSTATS, la consommation humaine annuelle s'élève à environ 56 milliards d'animaux (élevés et abattus) et les prévisions indiquent que les inventaires de bétail vont doubler avant 2050 (Steinfeld *et al.*, 2006). Comme le nombre des animaux de ferme élevés pour la viande, les œufs et la production laitière ne cesse pas d'augmenter, il en va de même pour leurs émissions de GES.

A l'échelle mondiale l'élevage contribue pour 9% aux émissions de CO₂, pour 37% aux émissions de CH₄, et pour 65% aux émissions de N₂O, mais également pour 64% de l'ammoniac produit par l'activité humaine et qui est à l'origine des pluies acides (Steinfeld *et al.*, 2006).

En France, bien que les émissions de CH₄ liées au secteur de l'agriculture/sylviculture aient diminué de 4,6% sur la période 1990-2008 (-98 kT, Figure 2), du fait de l'intensification de la production laitière (diminution du cheptel laitier compensée par un meilleur rendement par vache), la part relative de ce secteur par rapport au total national était plus élevée en 2008 qu'en 1990, où il représentait 69% des émissions de CH₄ totales hors puits (CITEPA 2010). La part relative du secteur de l'agriculture dans les émissions de CH₄ s'accroît parce que celle du secteur industriel diminue.

Les émissions totales annuelles de CH₄ entérique par les animaux d'élevage en France en 2007 s'élevaient à 1.41 millions de tonnes avec une contribution des bovins de 90% (Vermorel *et al.*, 2008). Les vaches (laitières et allaitantes) et les mâles reproducteurs représentent à eux seuls 58% des émissions totales annuelles, suivis par les bovins à l'engraissement (32.5%), la part des ovins caprins, équins et porcins étant mineure (Vermorel *et al.*, 2008).

La production de CH₄ entérique est le résultat de la dégradation anaérobie de la biomasse végétale ingérée, et ce, par les microorganismes présents dans le tube digestif. Le CH₄ produit dans le rumen représente 87% de la quantité totale et est majoritairement relâché dans l'atmosphère par éructations régulières (95%) ; 89% du CH₄ produit dans le reste du tube digestif est éliminé par la respiration et uniquement 11% sous forme de flatulences (Murray *et al.*, 1976). On estime qu'entre 2 et 12 % de l'énergie contenue dans les aliments ingérés par le ruminant est perdue sous forme de CH₄, ce qui représente une perte d'énergie substantielle pour l'animal (Johnson & Johnson, 1995). Si ces pertes étaient réduites, on

pourrait s'attendre à une amélioration de la productivité de l'animal car une plus grande part de l'énergie pourrait être utilisée pour la production de lait ou de viande.

Par conséquent, la réduction de la production de CH_4 par les ruminants représente un intérêt économique à court terme et un intérêt environnemental à long terme.

III. DIGESTION CHEZ LE RUMINANT

III.1. Anatomie du tube digestif

L'estomac des ruminants occupe les 2/3 de la cavité abdominale, en dehors de la gestation. Il présente un proventricule très développé, divisé en trois compartiments (Figure 3): le **rumen (ou panse)**, le **réticulum (bonnet ou réseau)** et l'**omasum (feuillet)** et une portion, équivalente à l'estomac des monogastriques : l'**abomasum (caillette)**.

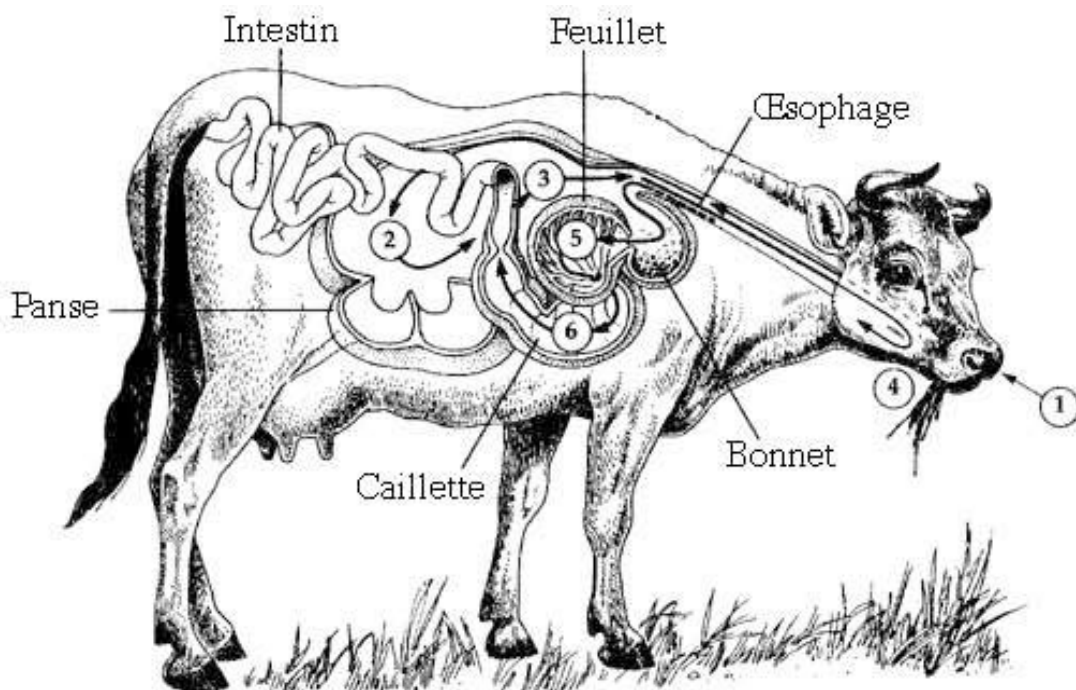


Figure 3 : Tube digestif des ruminants

Le rumen est de loin le plus volumineux des réservoirs gastriques des ruminants. Il a un volume de 150 litres chez un bovin adulte, pour un poids vide proche de 7 kg. C'est le compartiment où s'effectue la plus grande partie de la dégradation des aliments ingérés par l'animal, grâce à la population microbienne qu'il abrite. La continuité des fermentations ruminales est assurée par le réticulum qui sert également de tamis, retenant les particules trop

longues dans le rumen, tout en permettant aux petites de poursuivre leur route vers l'omasum. Dans le réticulo-rumen sont absorbés la majeure partie des acides gras volatils (AGV) résultants de la dégradation des glucides et une partie de l'ammoniac. L'omasum exerce une fermentation additionnelle et retient une partie de l'eau qui imprègne les aliments dans les premiers compartiments, en augmentant la teneur en matière sèche du contenu. C'est dans l'abomasum que la digestion proprement dite commence, sous l'effet des enzymes digestives de l'hôte (Drogoul *et al.*, 2007; Jarrige *et al.*, 1995; Thivend *et al.*, 1985).

Finalement, les nutriments sont acheminés au niveau de l'intestin, qui chez les ruminants est caractérisé par sa grande longueur (50 m environ chez le bœuf) et par l'existence d'un côlon spiralé. Dans les intestins, la digestion est complétée et les éléments nutritifs (acides aminés d'origines microbienne et alimentaire, oses, acides gras etc.) qui en résultent sont absorbés. Cæcum et côlon, constituent, après le rumino-réticulum, un deuxième compartiment où a lieu la fermentation microbienne. Au niveau du gros intestin sont absorbés de l'eau, des sels minéraux, mais aussi les AGV synthétisés au niveau du cæcum (Drogoul *et al.*, 2007 ; Jarrige *et al.*, 1995 ; Thivend *et al.*, 1985).

III.2. Les conditions physico-chimiques du milieu ruminal

Le développement des microorganismes du rumen est directement dépendant des conditions physicochimiques du milieu (Jarrige *et al.*, 1995; Thivend *et al.*, 1985)

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions **d'anaérobiose vraie**. Les apports d'oxygène sont faibles (déglutition, diffusion à partir des vaisseaux des parois ruminales). Des souches de bactéries aérobies facultatives le font disparaître. La teneur en CO₂ est toujours élevée (60% de la poche des gaz), celles en CH₄ de 27%, 7% en N₂, et 0.2% en hydrogène (H₂). La majeure partie de ces gaz est éliminée par éructation. Une partie est incorporée dans divers métabolismes bactériens (Jarrige *et al.*, 1995).

Le milieu ruminal est très réducteur et le métabolisme des microorganismes qu'il héberge, de type fermentaire, permet la libération de composés organiques (acétate, lactate, butyrate, propionate essentiels pour l'animal hôte), et non pas de gaz carbonique et d'eau comme dans le cas de la respiration aérobie (Jarrige *et al.*, 1995).

Le **pH** a un rôle prédominant dans la sélection des microorganismes du rumen et dans l'orientation des fermentations. La valeur du pH du rumen est normalement comprise entre 5,5 et 7,3. Cette marge est cependant un peu large. Le pH normal ne correspond pas à la neutralité au sens physico-chimique (7,0). Dans le rumen en fonctionnement, il y a production

d'AGV, et il est normal que la réaction soit légèrement acide (par exemple de 6 à 6,8) (Thivend *et al.*, 1985). Autour de ces valeurs, le pH peut varier sans qu'il y ait parallèlement de troubles, mais cela n'est pas pour autant la normalité. Le pH baisse dans la période postprandiale et s'élève pendant le jeûne. Les éléments régulateurs du pH du rumen sont, pour les acides : les AGV et l'acide lactique produits par les fermentations, et pour les bases, les bicarbonates et les phosphates de la salive, ainsi que, le cas échéant, l'ammoniac venant de la protéolyse ou de l'uréolyse (Jarrige *et al.*, 1995 ; Thivend *et al.*, 1985).

La **température ruminale** est supérieure d'au moins un degré par rapport à la température centrale, c'est-à-dire comprise entre 39,5°C et 40°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide : de 5 à 10°C pour une à deux heures (Jarrige *et al.*, 1995).

Les pré-estomacs sont animés de mouvements dont l'allure et la fréquence varient avec les phases de repos, de repas ou de rumination et assurent ainsi le **brassage permanent** du contenu digestif.

III.3. Les conditions physico-chimiques du cæcum-colon

Le contenu du gros intestin constitue un milieu très favorable pour le développement d'une digestion microbienne. La température y est constante (autour des 39°C) et le pH, peu variable, reste voisin de la neutralité. Le cæcum se remplit par intermittence chez le mouton sans liaison directe avec les activités d'ingestion ou de rumination. Des contractions coordonnées péristaltiques et antipéristaltiques assurent le mélange du contenu du cæcum à la cadence de 3 à 7 par période de 10 mn (Tisserand & Demarquilly, 1995)

III.4. L'alimentation des ruminants

Un aliment unique est généralement insuffisant pour couvrir les besoins nutritifs de l'animal, d'où le besoin d'associer plusieurs aliments au sein d'une ration. Tous les aliments sont constitués d'eau, de matières minérales, de glucides, de lipides et de matières azotées. Les rations du bétail contiennent environ 70% à 80% de glucides (Hvelplund, 1991) surtout sous forme d'amidon, de cellulose et d'hémicellulose. Les glucides fournissent donc en moyenne près des trois quarts de l'énergie alimentaire des animaux de ferme. On distingue deux grandes catégories de glucides selon leur localisation dans la cellule végétale : cytoplasmiques (ou intracellulaires) et pariétaux.

Les glucides intracellulaires sont des sucres hydrosolubles, des fructosanes et des grains d'amidon. Les sucres hydrosolubles ne constituent que 10% de la matière sèche des aliments d'origine végétale (sauf pour la mélasse, les betteraves et quelques graminées). Les fructosanes s'accumulent dans la tige et à moindre degré dans les graines, la teneur maximale est retrouvée à la base des tiges avec un gradient décroissant jusqu'au sommet. La molécule d'amidon est un polymère de molécules de glucose reliées de façon linéaire (par des liaisons α (1→4) dans le cas de l'amylose) ou ramifiée (liaison α (1→4) et α (1→6) dans le cas de l'amylopectine). Dans les cellules végétales, l'amidon est disposé dans des granules (grains d'amidon) de forme et de taille variables (grains sphériques, lenticulaires ou polyédriques, de 1 à 100 μm). L'amidon est abondant dans les graines de céréales (30 à 80 % de la matière sèche), les graines de légumineuses (25 à 50 %) et les tubercules (60 à 90 %) (Hvelplund, 1991).

Les glucides pariétaux constituent les parois des cellules végétales ; ils comportent des glucides proprement dit (polyosides) et des constituants non glucidiques qui leurs sont associés (lignine). Parmi les polyosides on distingue : cellulose (longues chaînes de molécules de glucose, reliées par des liaisons β (1→4)), hémicellulose (molécules de pentoses, reliées par des liaisons β (1→4)), substances pectiques (polymère d' α (1→4)-galacturonane) et lignine (composé d'alcools et totalement indigestible).

Les enzymes digestives qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α (1→4) glucosidiques ne catalysent pas l'hydrolyse des liaisons β -glucosidiques. L'homme et les autres animaux, qui peuvent utiliser l'amidon, le glycogène, le lactose et le saccharose comme sources de carbone et d'énergie, ne peuvent pas eux-mêmes métaboliser la cellulose, car ils ne possèdent pas les enzymes nécessaires. Les ruminants, abritent dans le rumen des microorganismes qui produisent des β glucosyl - hydrolases (cellulases). Ils peuvent donc obtenir du glucose à partir de l'herbe et d'autres plantes qui sont riches en cellulose. Il en va de même pour des insectes xylophages (termites). Le taux de fermentation des glucides d'origine végétale est variable, étant donné la grande diversité du type de sucres simples et des liaisons chimiques. Les liaisons glycosidiques de type β (ex. cellulose) sont plus stables que celles de type α (ex. : amidon). Donc, l'hydrolyse enzymatique d'une liaison de type β représente un coût énergétique plus élevé que celle de type α . L'amidon est donc plus facilement fermentescible que la cellulose. Les glucides solubles peuvent être fermentés en quelques minutes tandis que les glucides de structure sont dégradés à un taux qui varie selon la source et la pureté du

substrat. En ordre décroissant de vitesse de fermentation, les glucides peuvent être classés de la façon suivante (Janssen, 2010; Johnson & Johnson, 1995; Leedle *et al.*, 1986) :

Sucres solubles>Fructosanes>Amidon>Pectines>Hémicelluloses>Cellulose

III.5. La dégradation des aliments dans le tube digestif

III.5.1. La dégradation des aliments dans le rumen

Chez les ruminants, la dégradation des glucides commence par l'adhésion des microorganismes du rumen sur les particules alimentaires et s'effectue en deux étapes (Jouany, 1994; Jouany *et al.*, 1995 ; Martin *et al.*, 2006 ; Moss *et al.*, 2000). Les osides (glucides complexes) sont d'abord dégradés en oses (glucides simples) par hydrolyse, puis les oses sont utilisés (fermentés) par les microorganismes (Figure 4). L'hydrolyse des osides produit principalement du glucose, du fructose, du xylose et des acides uroniques (provenant des pectines et des hémicelluloses) qui sont convertis en xylose. Durant l'hydrolyse extracellulaire, les microbes s'attachent au matériel végétal et sécrètent des enzymes qui attaquent les fragments, libérant ainsi des unités de glucides simples (Jouany *et al.*, 1995). Les oses libérés sont rapidement absorbés par les microorganismes, de sorte qu'ils sont rarement détectés dans le rumen, et sont vite métabolisés afin de produire de l'ATP nécessaire au métabolisme microbien (entretien, croissance et division) (Jouany, 1994). Le métabolisme des microorganismes étant anaérobie, le pyruvate ne peut pas emprunter le cycle de Krebs et les produits terminaux de la fermentation sont principalement les AGV (l'acétate, le propionate et le butyrate), les gaz (le CO₂, NH₃ et H₂) et l'eau (Figure 4). Le pyruvate est un intermédiaire important, mais n'est généralement pas retrouvé en concentration importante dans le fluide ruminal. Les AGV sont absorbés à travers l'épithélium ruminal et constituent la principale source d'énergie pour l'animal (Jouany *et al.*, 1995). Avec une ration de fourrage seul, l'acétate représente en moyenne 70% des AGV produits, le propionate près de 20% et le butyrate environ 10%. Avec une ration riche en amidon, la proportion molaire du propionate peut monter jusqu'au 30% ; l'addition de glucides solubles (saccharose, lactose) stimule la production de butyrate et à un moindre degré celle du propionate. Dans les deux cas, la proportion molaire de l'acétate diminue.

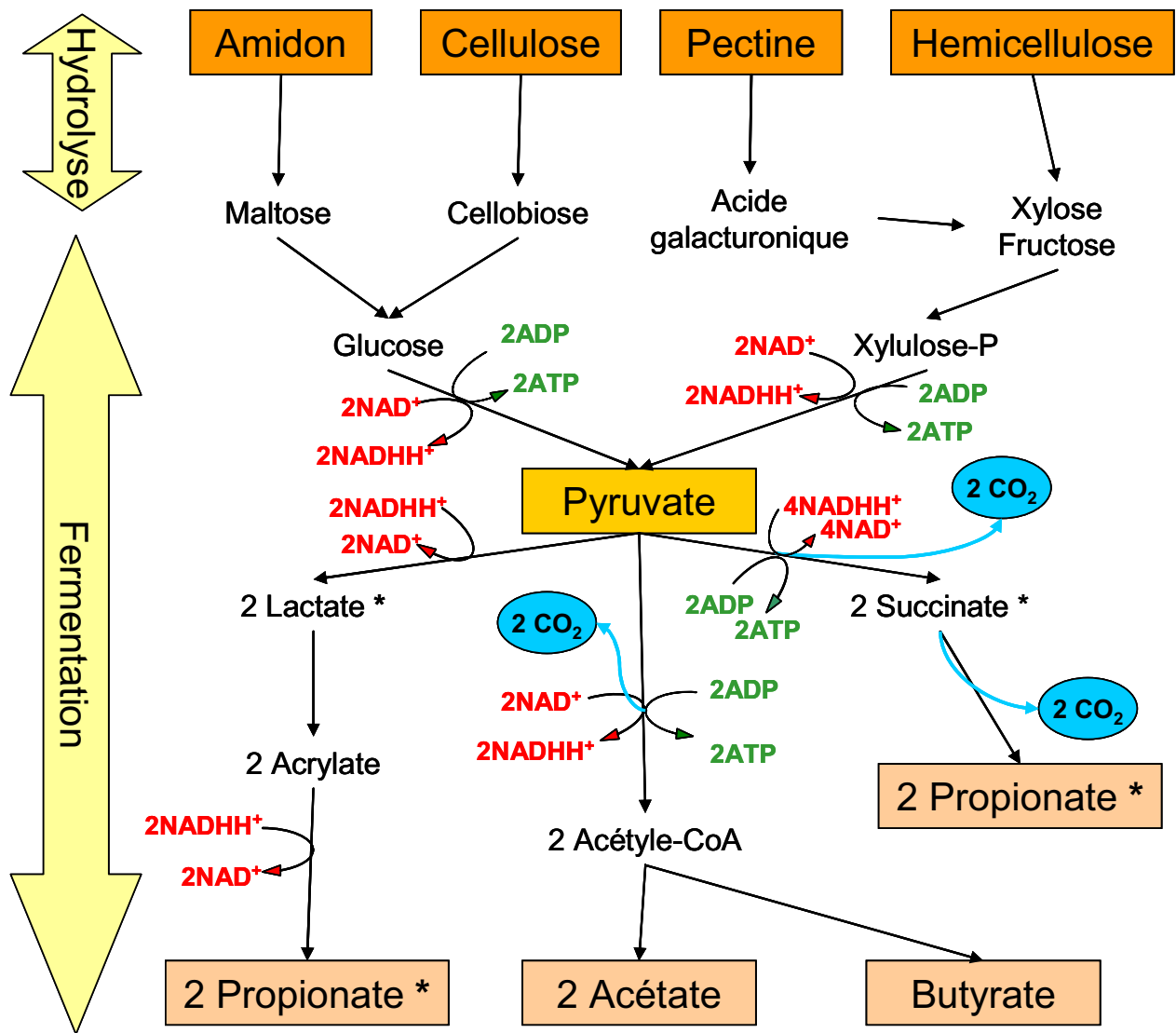


Figure 4 : Voies du métabolisme des glucides dans le rumen

(Jouany *et al.*, (1995) et Moss *et al.*, (2000)

Pour simplifier la présentation, les productions de NH_3 et d'eau ne sont pas représentées. Les voies puits à hydrogène sont signalées par « * »

La synthèse d'ATP est l'aboutissement des réactions oxydatives qui en absence d'oxygène se traduisent par le transfert de dihydrogène (ou hydrogène métabolique) des substrats ou métabolites vers les cofacteurs, tel NAD^+ , selon l'équation :



L'accumulation d'hydrogène oriente donc la réaction ci-dessus vers la droite. Lorsque la pression partielle en hydrogène devient supérieure à 1 kPa (Vermorel *et al.*, 2008), le cofacteur oxydé n'est plus produit (Jouany & Thivend, 2008) ce qui conduit à l'inhibition de l'action des déshydrogénases et à l'arrêt des fermentations

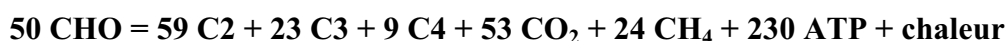
III.5.2. La dégradation des aliments dans le cæcum-colon

Chez les ruminants et en particulier chez des vaches laitières ingérant des quantités importantes de matière sèche, une partie non négligeable de la matière organique peut contourner le rumen et être digérée dans le cæcum-colon. Les rations composées de fourrage seul ou riches en amidon de maïs peuvent fournir de grandes quantités de matière organique digestible dans le cæcum-colon. Entre 18% et 27% et 2.5% et 46% respectivement de la cellulose et de l'hémicellulose de la ration sont digérés dans le gros intestin. L'amidon qui arrive dans le cæcum-colon y est digéré à hauteur de 70 % - 100% (Hoover, 1978).

En général, les profils en AGV produits dans le gros intestin sont semblables à ceux dans le rumen, l'acétate, le propionate et le butyrate étant les majoritaires. Tandis que les concentrations en AGV dans le contenu ruminal augmentent rapidement après le repas et ont tendance à diminuer avec le temps, les concentrations en AGV dans le cæcum restent plus constantes avec le temps. Les profils fermentaires changent avec le régime alimentaire de la même façon que dans le rumen (Hoover, 1978)

III.6. Relations stœchiométriques

Vermorel (1995) a présenté un exemple de relation stœchiométrique correspondant à la fermentation dans le réticulo-rumen d'une ration de 20 kg de matière sèche, soit environ 18 kg de matière organique, ingérée par une vache de 600 kg en lactation. De cette ration, 8,1 kg de matière organique seront dégradés dans le complexe réticulo-rumen, ce qui correspond à environ 50 moles d'équivalent de glucose anhydre (CHO). Le bilan de cette dégradation est le suivant :



Cette relation peut aussi être exprimée en terme d'énergie :

$$34,0 \text{ Mcal} = 12,3 \text{ Mcal} + 8,4 \text{ Mcal} + 4,7 \text{ Mcal} + 0 \text{ Mcal} + 5,1 \text{ Mcal} + 1,7 \text{ Mcal} + 1,7 \text{ Mcal}$$

La production de CO₂ ne représente donc pas une perte d'énergie pour l'animal. Par contre, les pertes sous forme de CH₄ représentent environ 15 % de l'énergie des équivalents CHO fermentés, soit 10,5 % de l'énergie digestible ou 6,7 % de l'énergie brute de la ration ingérée (Vermorel, 1995).

Le modèle stœchiométrique, développé par Demeyer (1991b) illustre les relations entre les quantités des produits terminaux des fermentations (AGV et CH₄) et permet de quantifier la récupération de hydrogène. En admettant une récupération moyenne de 90%, cette relation permet de relier les productions molaires de CH₄ à celles des AGV.

$$\text{CH}_4 = 0.45 \text{ C2} - 0.275 \text{ C3} + 0.400 \text{ C4}$$

Clairement, cette équation indique que le pourcentage molaire des AGV influence la production de CH₄ dans le rumen. Beever (1993), quant à lui, a comparé le bilan des fermentations d'une ration riche en fourrages à celui d'une ration riche en aliments concentrés. Les relations stœchiométriques pour ces deux régimes s'établissaient comme suit :

Fourrages :

$$1 \text{ mole CHO} = 1,34 \text{ C2} + 0,45 \text{ C3} + 0,11 \text{ C4} + 0,61 \text{ CH}_4 + 4,62 \text{ ATP}$$

Concentrés :

$$1 \text{ mole CHO} = 0,90 \text{ C2} + 0,70 \text{ C3} + 0,20 \text{ C4} + 0,38 \text{ CH}_4 + 4,38 \text{ ATP}$$

L'acétate et le butyrate promeuvent la production de CH₄ tandis que l'on peut considérer la formation de propionate comme une voie compétitrice pour l'utilisation d'hydrogène dans le rumen. Les productions de CH₄ et d'acétate ne sont pas corrélées ($R^2 = 0.029$), mais il existe des corrélations négatives entre la production de CH₄ et i) la production de propionate ($R^2 = 0.774$), ii) le ratio C2/C3 ($R^2 = 0.772$) et iii) le ratio (C2+C4)/C3 ($R^2 = 0.778$) (Moss *et al.*, 2000).



ETAT DE L'ART

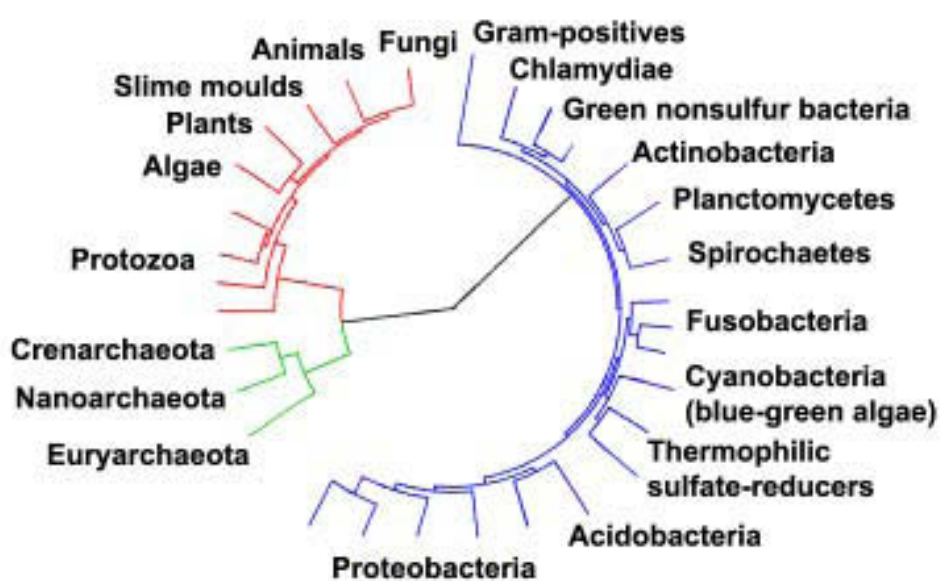


Figure 5 : Arbre phylogénétique des trois domaines du monde vivant
Les *Archaea* sont en vert, les *Bacteria* en bleu et les *Eucarya* en rouge

IV. LES MICROORGANISMES PRODUCTEURS DE METHANE

La complexité anatomique des réservoirs gastriques des ruminants est associée à la présence d'une flore et faune microbiennes denses qui vivent en symbiose avec l'animal hôte. La mise en place et le maintien de cette population microbienne sont dus aux conditions physico-chimiques propices à la croissance anaérobie, mais également à la présence d'une séparation physique entre la zone de sécrétion acide (abomasum) et le reste des pré-estomacs où la digestion microbienne peut avoir lieu en permanence.

La population microbienne du tube digestif des ruminants est très diverse et variée comptant des bactéries, des protozoaires, des champignons et des *Archaea*. Les *Archaea* méthanogènes étant dans le cœur de ce travail de thèse, ce chapitre leur est consacré.

IV.1. Rappels sur le domaine des *Archaea*

Au début du XX^e siècle, les procaryotes ont été considérés comme un seul groupe d'organismes et classifiés en fonction de leur biochimie, morphologie et métabolisme. Les *Archaea* ont été considérées comme des bactéries extrêmophiles qui n'existent que dans les habitats tels les sources chaudes et les lacs salés. À la fin du XX^e siècle, les microbiologistes se sont rendu compte que les *Archaea* étaient en fait un grand groupe diversifié d'organismes, très répandus dans la nature et communs dans une diversité d'habitats. Les développements de la biologie moléculaire et de la phylogénie ont montré que les *Archaea* étaient aussi différentes des bactéries que celles-ci l'étaient des eucaryotes. Ces travaux aboutirent à la classification du monde du vivant en trois domaines (Figure 5) : *Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya* (Woese *et al.*, 1990).

Les *Archaea* sont très diverses, tant dans leur morphologie que dans leur physiologie. Elles peuvent être sphériques, en forme de tige, en spirale, plates ou irrégulièrement formées ; elles peuvent exister comme des cellules isolées, en agrégats ou former des filaments ; elles se multiplient par fission binaire, bourgeonnement, fragmentation, ou d'autres mécanismes (Balch *et al.*, 1979; Garcia *et al.*, 2000).

Les *Archaea* peuvent être aérobies, facultativement anaérobies, ou strictement anaérobies et nutritionnellement, elles s'étendent de chimiolithoautotrophes à organotrophes (Garcia *et al.*, 2000). Certaines sont mesophiles, tandis que d'autres sont hyperthermophiles et peuvent se développer à des températures dépassant les 100°C.

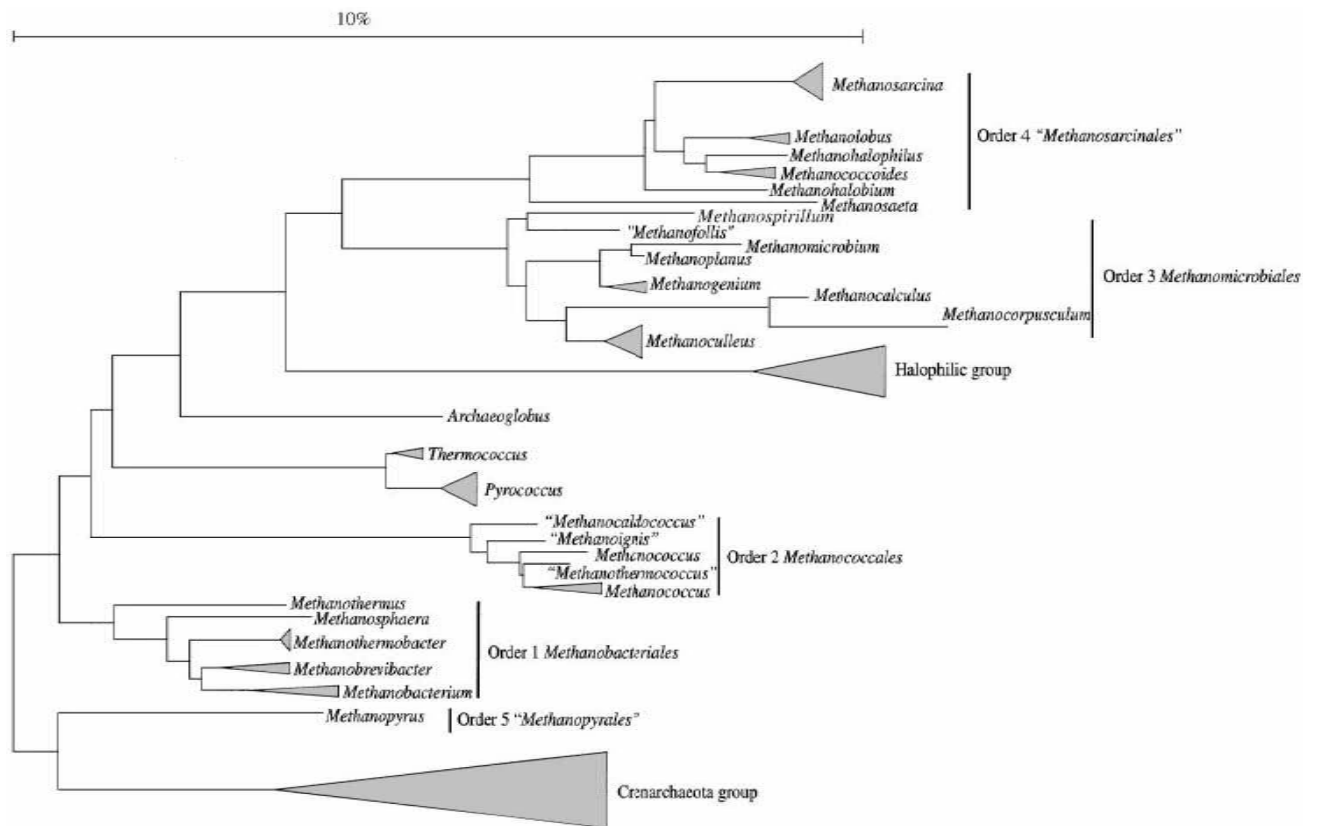


Figure 6 : Arbre phylogénétique des *Archaea* méthanogènes

(Garcia *et al.*, 2000)

Les appellations entre guillemets sont des nouveaux ordres et familles qui ne sont pas encore acceptés et validés.
Les grands triangles indiquent les non méthanogènes par leur nom de groupe

Les *Archaea* peuvent être à Gram positif ou négatif, mais la structure de leur paroi cellulaire diffère significativement de celle des bactéries. La paroi cellulaire de beaucoup d'*Archaea* à Gram positif est constituée d'une seule couche homogène, alors que chez les bactéries une couche de peptidoglycanes est séparée par l'espace périplasmique de la membrane plasmique. Chez les *Archaea* à Gram négatif, la membrane externe et le complexe peptidoglycane, caractéristiques des bactéries à Gram négatif ne sont pas présents (Balch *et al.*, 1979; Garcia *et al.*, 2000).

La paroi cellulaire des *Archaea* se distingue aussi par sa chimie. Chez certaines espèces la paroi est composée de pseudo-peptidoglycanes : il manque l'acide muramique, remplacé par de la pseudomuréine et les résidus de D-alanine remplacent les L-alanine. Cette composition particulière leur confère la résistance au lysozyme et aux antibiotiques bêta-lactamines. Chez d'autres espèces la paroi cellulaire est composée entièrement de protéines et est appelée réseau paracristallin ou S-layer. Les lipides de la membrane cellulaire, sont des hydrates de carbone ramifiés attachés au glycérol par des liaisons « éther » à la différence de la chaîne droite des acides gras attachés au glycérol par des liaisons « ester » chez les *Bacteria* et *Eucarya*. Les lipides sont souvent polaires comme les phospholipides, les sulfolipides ou les glucolipides. Chez les extrêmes thermophiles, des structures type tétra-éther en monocouche confèrent la résistance aux températures élevées (Balch *et al.*, 1979).

L'ADN des *Archaea* est organisé en un seul chromosome circulaire comme chez les *Bacteria*, mais comporte des gènes en mosaïque similaires à ceux des *Eucarya*. Très peu de plasmides sont retrouvés chez les *Archaea*. Les ARN messagers (ARNm) ressemblent aux bactériens : ils peuvent être polygéniques et ne sont pas organisés en intron/exons. Les ARN polymérases des *Archaea*, par contre, sont beaucoup plus complexes que les ARN-polymérases des bactéries, et étonnamment proches de celles des eucaryotes (Baptiste *et al.*, 2005). Phylogénétiquement les *Archaea* sont classées en 3 phyla : *Crenarcheota*, *Euryarcheota*, *Nanoarcheota* (Figure 5).

IV.2. Le groupe des *Archaea* méthanogènes

Les méthanogènes sont des micro-organismes qui produisent du CH₄ comme sous-produit métabolique de la vie en conditions anoxiques. Ils font tous partie du domaine des *Archaea*, phylum *Euryarcheota* et sont organisés en 5 ordres (Garcia *et al.*, 2000) : *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales*, *Methanopyrales* (Figure 6) regroupant 10 familles et 31 genres.

Ordre	Famille	Genre	Substrats	Habitats typiques
Méthanobactériales	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	H ₂ , CO ₂ , (formate)	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces, rumen
		<i>Methanobrevibacter</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	TGI des animaux, digesteurs, rizières
		<i>Methanosphaera</i>	H ₂ , CO ₂ , méthanol	TGI des animaux
		<i>Methanothermobacter</i>	H ₂ , CO ₂ , (formate, CO)	digesteurs anaérobiques
Methanococcales	<i>Methanothermaceae</i>	<i>Methanothermus</i>	H ₂ , CO ₂	Sources chaudes
		<i>Methanococcus</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	Sédiments marins
	<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanothermococcus</i>	H ₂ , CO ₂	Sédiments marins géothermales
		<i>Methanocaldococcus</i>	H ₂ , CO ₂	Sédiments marins géothermales
Methanomicrobiales	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanotorris</i>	H ₂ , CO ₂	Sédiments marins géothermales
		<i>Methanomicrobium</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	digesteurs anaérobiques, rumen
		<i>Methanoculleus</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	digesteurs, sédiments eaux douces, eaux salées, rizières, champs pétroliers ; sources chaudes
		<i>Methanofollis</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	digesteurs anaérobiques
Méthanosarcinales	<i>Methanospirillaceae</i>	<i>Methanogenium</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	sédiments eaux douces, eaux salées, rizières, TGI
		<i>Methanolacinia</i>	H ₂ , CO ₂	Sédiments marins
		<i>Méthanoplanus</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	champs pétroliers
		<i>Methanospirillum</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux salées
	<i>Methanocorpusculaceae</i>	<i>Methanocorpusculum</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces
		<i>Methanocalculus</i>	H ₂ , CO ₂ , formate	champs pétroliers
	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	(H ₂ , CO ₂ , CO), Acétate, Méthylamines	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces, eaux salées, rumen
		<i>Methanococcoides</i>	Méthylamines	sédiments eaux salées
		<i>Méthanohalobium</i>	Méthylamines	Sédiments hypersalins
		<i>Méthanohalophilus</i>	Méthylamines	Sédiments hypersalins
	<i>Méthanomethylovorans</i>	<i>Methanolobus</i>	Méthylamines	Sédiments hypersalins
		<i>Méthanomethylovorans</i>	Méthylamines	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces
Méthanopyrales	<i>Méthanosaetaceae</i> <i>Methanopyraceae</i>	<i>Méthanimicrococcus</i>	H ₂ , CO ₂ , Méthylamines	TGI des animaux
		<i>Méthanosalsum</i>	Méthylamines	Sédiments hypersalins
		<i>Methanosacta</i>	Acétate	digesteurs anaérobiques, sédiments eaux douces
		<i>Methanopyrus</i>	H ₂ , CO ₂	Sédiments marins géothermales

Tableau 1 : Substrats et habitats typiques des *Archaea* méthanogènes

Pour les substrats entre parenthèses, seules certaines espèces du genre sont capables de les utiliser (Balch *et al.*, 1979; Yuchen Liu, 2008) ; TGI, tractus gastro-intestinal

Les plus connus avec leurs habitats et substrats typiques sont présentés dans le Tableau 1. D'autres groupes phylogénétiques sont constamment découverts tels le RCC (Rumen Cluster C) et RC-I (Rice Cluster I) ; aucun représentant de ces deux groupes n'a encore été cultivé.

IV.2.1. *Le génome des méthanogènes*

Le séquençage du génome entier facilite la compréhension de la physiologie des méthanogènes. Aujourd'hui les génomes de 18 espèces cultivées ont été séquencés et leur taille varie de 1.6 Mpb jusqu'à 5.8 Mpb. Les espèces du genre *Methanosarcina* possèdent les plus grands génomes sans doute à cause de leur métabolisme assez versatile (Tableau 1). Le génome d'une espèce non cultivée du groupe RC-I a été reconstruit et a révélé des gènes rares chez les méthanogènes, qui codent pour des enzymes impliquées dans la détoxification de l'oxygène, le métabolisme des hydrates de carbone et la sulfato-réduction. Les analyses phylogénomiques ont mis en évidence 31 protéines exclusivement présentes chez pratiquement tous les méthanogènes, ainsi que 10 protéines restreintes à quelques espèces de méthanogènes (Gao & Gupta, 2007). **Ces résultats suggèrent fortement que les *Archaea* méthanogènes forment un groupe monophylétique, excluant les autres *Archaea*** (Gao & Gupta, 2007).

Les enzymes impliquées dans la méthanogenèse sont codées par des gènes pour certains, exclusivement présents chez les *Archaea* méthanogènes (Tableau 2). Seuls les méthanogènes possèdent la quasi-totalité des protéines impliquées dans la méthanogenèse et la synthèse des coenzymes. Chez les procaryotes en général, les protéines impliquées dans la synthèse des coenzymes sont plus largement distribuées que celles réalisant la méthanogenèse (duplications/pertes et/ou transferts mais pas entre méthanogènes) (Baptiste *et al.*, 2005). Certaines espèces possèdent même plusieurs enzymes catalysant une seule étape de cette voie métabolique ; ces isoenzymes sont conservées au cours de l'évolution probablement car elles confèrent un avantage métabolique aux méthanogènes (Reeve *et al.*, 1997).

Un gène particulier, le *mcrA*, a reçu beaucoup d'attention ces dernières années, étant identifié en tant que marqueur moléculaire de la communauté méthanogène au même niveau que le *rrs*³. Du fait du rôle important que ce gène a joué dans ce travail de thèse, une section lui est réservée (cf. Section VIII.3).

³ *rrs* : gène qui code pour l'ARNr 16S de la petite sous-unité ribosomale

Phylum	Enzymes de la méthanogénèse										Cofacteur F_{420}					Coenzyme M									
	fir	mch	mtd	hmd	mer	mitr	mcr	mrt			aksA	aksD	aksE	aksF	cofH	A	B	C	D	E					
Euryarchaeota																									
Methanosarcinales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Methanomicrobiales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanobacteriales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanopyrales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Methanococcales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Archaeoglobales	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thermoplasmatales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
Halobacteriales	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thermococcales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-
Crenarchaeota																									
Sulfolobales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-
Thermoproteales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Desulfurococcales	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aquificae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thermotogae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Deinococcus-Thermus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chloroflexi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cyanobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chlorobi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Proteobacteria																									
alpha	P	P	-	-	-	H	-	-	-	-	P	-	P	-	-	-	-	P	P	P	P	P	P	P	P
beta	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	P	P	P	P	P	P	P	P
gamma	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	-	P	-	-	-	P	P	P	P	P	P	P	P
delta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
epsilon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Firmicutes																									
Actinobacteria	-	-	-	-	-	H	-	-	-	-	P	P	P	P	P	-	-	P	P	P	P	P	P	P	P
Planctomycetes	-	-	-	-	-	P	H	-	-	-	P	P	-	P	P	-	-	P	P	-	-	-	-	-	-
Chlamydiae	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spirochaetes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bacteroidetes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fusobacteria	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 2 : Distribution des gènes codant pour des enzymes de la voie méthanogène chez différents procaryotes

(Bapteste *et al.*, 2005)

+ : présent chez toutes les espèces du phylum ;
 - : absent chez toutes les espèces du phylum ;
 P : présent chez certaines espèces ;
 H : homologues retrouvés chez certaines espèces

IV.2.2. Métabolisme méthanogène

Les méthanogènes sont souvent retrouvés dans des habitats où les accepteurs d'électrons « traditionnels » (O_2 , NO_3^- , Fe^{3+} , SO_4^{2-}) sont limitant (Balch *et al.*, 1979). Dans le cas contraire, les méthanogènes sont concurrencés par d'autres microorganismes, tels les sulfato-réducteurs, les dénitrifiants ou les réducteurs de fer, essentiellement car ces réactions sont thermodynamiquement plus favorables que la méthanogenèse (Tableau 3). Le CO_2 toutefois est produit en grandes quantités au cours des processus fermentaires et est rarement limitant dans les environnements anaérobies. Les bactéries acétogènes peuvent également réduire le CO_2 dans la production d'acétate. Bien que leur affinité pour l'hydrogène est moindre et la réaction est moins thermodynamiquement favorable (Tableau 3), les acétogènes arrivent dans certains environnements à concurrencer les méthanogènes (Gagen *et al.*, 2010).

Processus	ΔG° ¹	Affinité pour l'hydrogène ²
Méthanogenèse	- 139,1	0,67
Sulfato-réduction	- 152,3	0,0013
Dénitrification	- 599,8	NA
Acétogénese	- 111,6	1,26

Tableau 3 : Caractéristiques thermodynamiques des processus réductifs en anaérobiose

¹ valeurs calculées à pH 7, température 25°C et pression 1 atmosphère

² en milli moles / L, concentration minimales mesurées chez des cultures pures

NA : information non disponible

Les méthanogènes tirent l'énergie nécessaire à leur développement en produisant de CH_4 (Balch *et al.*, 1979; Thauer *et al.*, 2008). La méthanogenèse est une voie métabolique complexe, exigeant des coenzymes et complexes membranaires uniques (Thauer, 1998). Les méthanogènes sont incapables d'utiliser la plus part des composés organiques (Tableau 1, page 22), tels les hydrates de carbone, les acides gras à chaîne longue. Cette restriction, impose **une relation nutritionnelle étroite avec des microorganismes non-méthanogènes** qui utilisent les composés organiques et dont les produits du métabolisme deviennent des substrats pour la méthanogenèse. Quelques espèces font exception à cette règle en utilisant certains alcools (2-propanol, 2-butanol, cyclopentanol, éthanol) en tant que donneurs d'électrons. Cependant cette voie fournit moins d'énergie que la réduction de CO_2 et reste accessoire (Liu & Whitman, 2008). Ainsi, en fonction du substrat préférentiel, les méthanogènes peuvent être divisés en trois grands groupes : les hydrogénotrophes, les méthylotrophes et les acétotrophes (Balch *et al.*, 1979; Garcia *et al.*, 2000).

Les **hydrogénotrophes** sont les plus fréquemment retrouvés (Tableau 1, page 22). L'accepteur final d'électrons est le CO_2 et le donneur principal l' H_2 . Parmi les hydrogénotrophes, un grand nombre sont également capables d'utiliser le formate (Tableau 1, page 22) ; 4 molécules de formate sont oxydées en CO_2 par la formate déshydrogénase (Fdh) et ensuite le CO_2 est réduit en CH_4 . La réaction se fait en plusieurs étapes (Figure 7) dont quatre réductions (Pelmont, 2005 ; Reeve *et al.*, 1997).

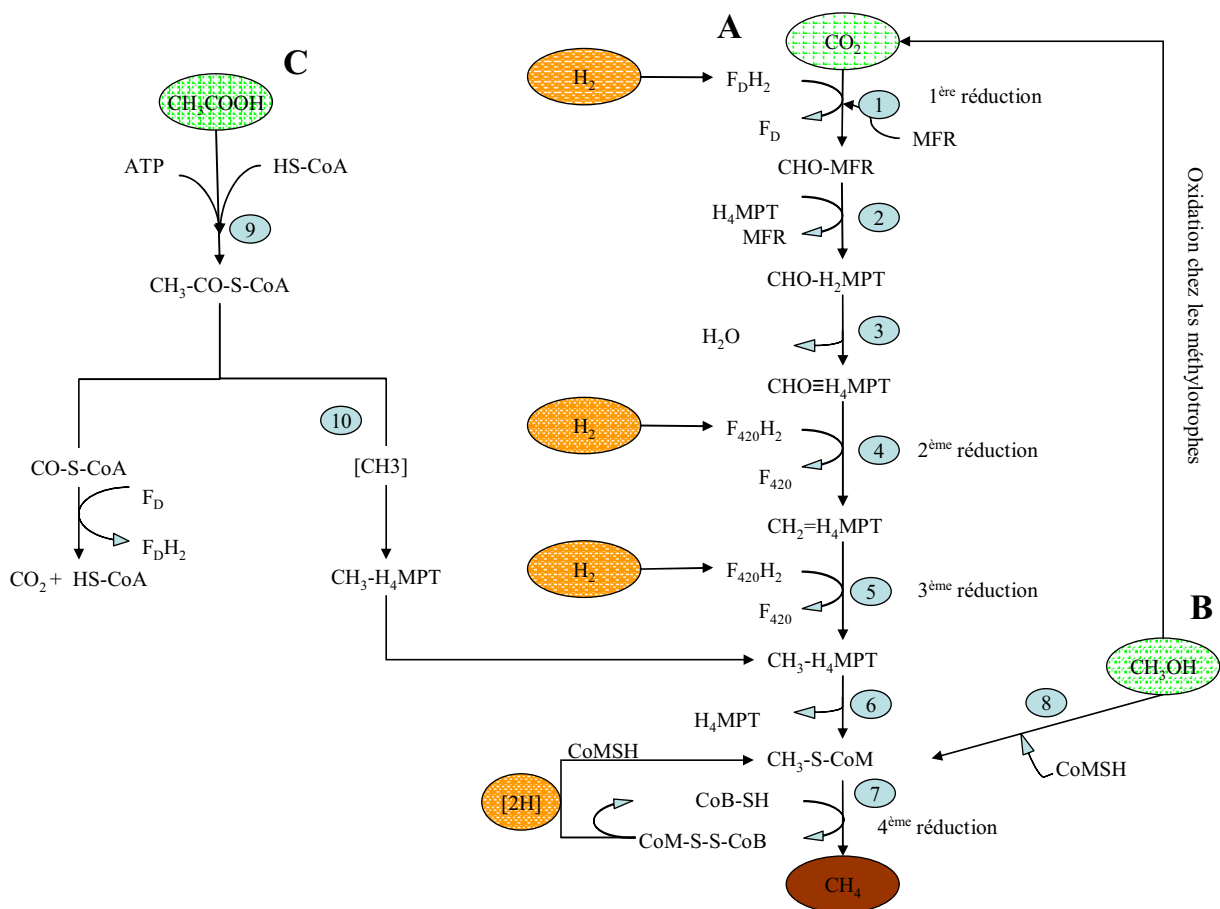


Figure 7 : Voies métaboliques de la méthanogénèse

(Liu & Whitman, 2008)

A. Méthanogénèse à partir de H_2/CO_2 ; B. Méthanogénèse à partir du méthanol ; C. Méthanogénèse à partir de l'acétate

F_D : ferrédoxine, MFR : méthanofurane, H_4MPT : tétrahydrométhanoptérine ; CoM-SH : coenzyme M, CoB-SH : coenzyme B, CoASH : coenzyme A. Les étapes numérotées sont détaillées dans le texte.

Etapes de la méthanogenèse hydrogénotrophes (Figure 7)

(Pelmont, 2005 ; Reeve *et al.*, 1997)

1. Le CO₂ est réduit en acide formique qui décharge son groupe formyle sur un coenzyme inhabituel – le méthanofurane (MFR). L'intermédiaire formé est le formyle-méthanofurane. Le donneur d'électrons est la ferrédoxine (F_D).
2. Un transfert du formyle se fait sur le tétrahydrométhanoptérine (H₄MTP) sans qu'il y ait d'oxydoréduction ; le formyle change juste de transporteur.
3. Une cyclo-isomérase catalyse une cyclisation avec l'élimination d'une molécule d'eau pour passer du formyle au méthényle.
4. Le méthényle est réduit en méthylène par une déshydrogénase dont le cofacteur n'est ni le FAD ni le NAD⁺, mais le F₄₂₀ (car pic d'absorbance à 420 nm). La différence fondamentale entre le F₄₂₀ et le FAD est sa capacité d'accepter deux électrons à la fois et devenir F₄₂₀H₂. Pour que le système puisse avancer, le cofacteur doit être réduit de nouveau, réaction assurée par une hydrogénase particulière contenant du nickel et qui utilise les H₂ en tant que source d'électrons.
5. Une troisième réduction opère le passage de méthylène au méthyle. L'ultime réduction est précédée par le transfert du groupe méthyle sur le coenzyme caractéristique de la méthanogenèse - **coenzyme M** (acide 2-mercapto-éthane-sulfonique) (CoM-SH). La réaction est catalysée par une méthyl-coenzyme M transférase (Mtr), cobalt dépendante. C'est l'étape énergétique essentielle qui contribue à bâtir le potentiel membranaire. L'enzyme fonctionne en expulsant des ions sodium et le potentiel engendré résiste à l'action des ingrédients qui perméabilisent les membranes aux protons. Le potentiel membranaire formé est converti en ATP par une ATP synthase qui est muée par un gradient de Na⁺ ou H⁺ selon les espèces.
6. Le passage en CH₄ nécessite une dernière réduction à deux électrons. L'enzyme est la **méthyl-coenzyme M réductase, MCR**, qui a deux cofacteurs (coenzyme B et F₄₃₀). La coenzyme B (CoB-SH) est un thiol comme la CoM-SH.
7. Au moment de la libération du CH₄, les deux cofacteurs forment un hétérodisulfure. Le complexe est réduit et les cofacteurs rendus de nouveau disponibles par une hétérodisulfure réductase.

Les *Archaea* méthanogènes **méthylotrophes**, utilisent des substrats contenant un groupement méthyle : méthanol, méthylamines (mono-, di-, tri- et tétra-méthylamines), méthylsulfides (méthanethiol, diméthylsulfide). Ce groupe métabolique regroupe

exclusivement les représentants de l'ordre des *Methanosarcinales* (Tableau 1, page 22) à l'exception de *Methanosphaera* qui fait partie de l'ordre des *Methanobacteriales*. Dans cette voie méthanogène, le groupe méthyle est transféré sur le CoM-SH (étape 8, Figure 7) et le complexe suit les mêmes étapes décrites précédemment jusqu'à l'obtention de CH₄.

L'activation et le transfert du groupe méthyle exige des méthyle-transférases qui sont spécifiques du substrat. Chez la plupart des méthanogènes méthylotrophes, les électrons nécessaires à la réduction sont obtenus par l'oxydation de groupes méthyle supplémentaires jusqu'au CO₂. Cette voie a la particularité de se faire pas à pas à l'inverse de la méthanogenèse, décrite dans la Figure 7 (Pelmont, 2005).

Les *Archaea* méthanogènes acétotrophes appartiennent exclusivement aux genres *Methanosarcina* et *Methanosaeta* (Tableau 1). Au cours de la première étape (étape 9, Figure 7) l'acétate est activé par phosphorylation en utilisant un ATP et pris en charge par la coenzyme A (CoA-SH) qui tout comme les CoM et CoB est un thiol. L'acétyle est scindé en méthyle, et CO₂ avec la libération d'un pouvoir réducteur emporté par la F_D. Le groupement méthyle de son côté est emporté par la H₄MPT (étape 10, Figure 7) et devient source de CH₄ par le même cheminement que vue antérieurement.

IV.3. Population méthanogène du rumen

Les *Archaea* méthanogènes du rumen sont des anaérobies strictes et essentiellement des hydrogénotrophes, bien que certaines espèces peuvent occasionnellement utiliser le formate ou les méthylamines. Les *Archaea* méthanogènes constituent une petite partie de la biomasse microbienne du rumen. Parmi toutes les séquences *rrs* (16S et 18S) retrouvées dans le rumen, entre 0.3 % et 3.3% appartenaient au domaine des *Archaea* (Lin *et al.*, 1997 ; Sharp *et al.*, 1998). En parallèle, Yanagita *et al.*, (2000) ont rapporté que seuls 2.8 % à 4 % des microorganismes du rumen ont émis la fluorescence spécifique du cofacteur F₄₂₀⁴ sous illumination en UV.

La population méthanogène colonise le rumen très tôt après la naissance, bien avant que le jeune ruminant ne commence à se nourrir de végétaux. Des méthanogènes cultivables ont été isolés du contenu ruminal d'agneaux âgés de 30 heures (Morvan *et al.*, 1994) ou de 2 jours (Fonty *et al.*, 1987). En utilisant des outils moléculaires, Skillman *et al.*, (2004) ont montré que la population méthanogène commence à s'installer dès le premier jour après la naissance. Dans les trois expériences citées précédemment la densité des méthanogènes a augmenté de

⁴ F₄₂₀ est un cofacteur spécifique des *Archaea* méthanogènes

façon exponentielle dans la semaine suivant la naissance et la densité maximale moyenne (10^8 cellules/g de contenu ruminal) était atteinte une (Fonty *et al.*, 1987) à deux semaines (Skillman *et al.*, 2004) plus tard.

Les premiers méthanogènes colonisateurs du rumen d'agneaux ($n=5$) appartenait à l'ordre des *Methanobacteriales* et aucun représentant des ordres *Methanosarcinales*, *Methanococcales* ou *Methanomicrobiales* n'a été détecté jusqu'à 49 jours après la naissance. Parmi les *Methanobacteriales*, le genre *Methanobrevibacter* spp. a été retrouvé chez les 5 agneaux dès les premiers prélèvements de contenu ruminal. Chez deux de ces agneaux, des espèces appartenant au genre *Methanobacterium* ont également été détectées les premiers jours, mais ont disparu ensuite laissant la place aux *Methanobrevibacter* spp (Skillman *et al.*, 2004). De plus, les similarités observées entre les populations méthanogènes chez des agneaux jumeaux suggèrent que la brebis-mère joue un rôle important dans l'inoculation des *Archaea* chez le jeune ovin (Skillman *et al.*, 2004).

La population méthanogène du rumen est caractérisée par une faible diversité, en plus de la faible densité. Les techniques d'empreinte moléculaire ont mis en évidence un nombre limité de bandes ($\approx$ séquences $\approx$ espèces, voir Section X.1) par individu. L'analyse en DGGE des séquences du gène *rrs* des *Archaea* provenant de contenu ruminal de moutons du Venezuela, a révélé au total 14 bandes différentes. Chaque individu présentait entre 4 et 9 bandes (Wright *et al.*, 2008). D'autres analyses en DGGE des séquences du même gène ont révélé un nombre total de bandes (tous individus confondus) plus élevé : 28, 26 et 33 provenant respectivement des rumens de jeunes bovins (Zhou *et al.*, 2010), de vaches allaitantes (Hook *et al.*, 2009) ou de chèvres chinoises (Cheng *et al.*, 2009).

De même, très peu d'espèces ont été isolées par les techniques classiques de culture : *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanomicrobium mobile* et *Methanoculleus olentangyi* (revue de Janssen & Kirs (2008)). Les membres du genre *Methanobrevibacter* sont reconnus comme prédominants parmi les représentants cultivés de cette communauté microbienne dans le rumen (Miller *et al.*, 1986).

Au niveau moléculaire, l'analyse des séquences du gène *rrs* des *Archaea* provenant de 14 études (sur des ovins et bovins à différents stades physiologiques, recevant différentes rations) a réparti 92,3% des méthanogènes dans trois genres (Figure 8) : *Méthanobrevibacter* (61,6% des séquences), Rumen Cluster C (15,8% des séquences) et *Methanomicrobium* (14,9% des séquences) (Janssen & Kirs, 2008). Mais cette règle est loin d'être sans

exceptions. Des nouvelles séquences d'espèces non cultivées jusqu'à présent ont été les plus abondantes dans le rumen de chèvres (Cheng *et al.*, 2009) ou de moutons (Wright *et al.*, 2006). Dans d'autres études chez des ovins, les méthanogènes prédominants appartenaient aux genres *Methanosphaera* (Wright *et al.*, 2004a), *Methanomicrobium* (Yanagita *et al.*, 2000) ou à l'ordre des *Methanococcales* (Machmüller *et al.*, 2003). Lin *et al.*, (1997) ont mis au point des sondes oligonucléotidiques ciblant l'ARNr 16S et permettant de distinguer les ordres phylogénétiques méthanogènes. Ils ont rapporté que les *Methanobacteriales* sont prédominants dans le rumen des bovins (taurillons et vaches) et des caprins, alors que les méthanogènes majoritaires dans le rumen des ovins sont les *Methanomicrobiales*. L'espèce animale et la ration affectent la quantité et la diversité des *Archaea* dans le rumen (Lin *et al.*, 1997). D'autres facteurs, tels l'environnement, le stade physiologique, l'âge de l'animal sont aussi susceptibles d'influencer la composition de la population microbienne du rumen, et en particulier celle des méthanogènes (Wright *et al.*, 2006)

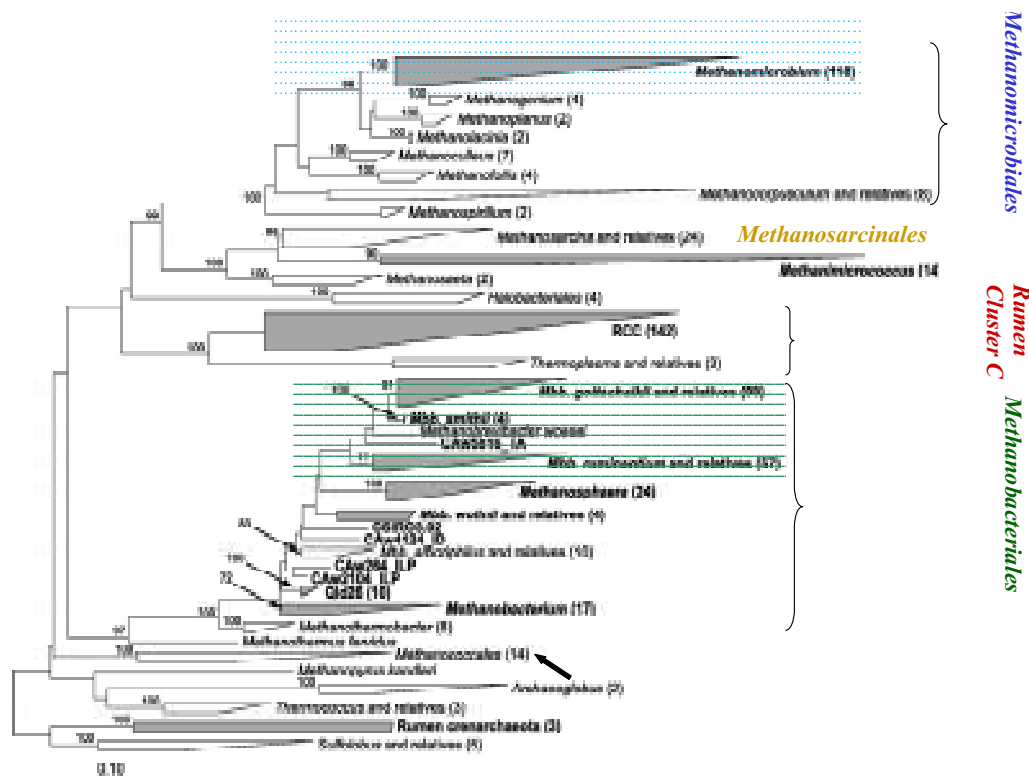


Figure 8 : Arbre phylogénique des *Archaea* du rumen

(Janssen & Kirs, 2008)

L'arbre a été construit avec les séquences du gène *rrs* provenant de 14 études. Les parallélogrammes grisés représentent des clades ; le nombre des séquences est donné entre parenthèses. Les carrés colorés représentent les trois genres majoritairement trouvés. Mbb, *Methanobrevibacter*

Toutefois, il faut aussi souligner le fait que les résultats obtenus dans ces études peuvent être biaisés par un échantillonnage non représentatif du contenu ruminal, ne permettant pas d'estimer toute la diversité de la population. Les prélèvements sont effectués soit après l'abattage des animaux (Pei *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2007), soit via une pompe stomacale introduite dans la gorge de l'animal vivant (Hook *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2004a; Wright *et al.*, 2006), soit via la canule ruminale (Cheng *et al.*, 2009; Denman *et al.*, 2007; Machmüller *et al.*, 2003; Nicholson *et al.*, 2007; Whitford *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2004a; Yanagita *et al.*, 2000). Le contenu ruminal total prélevé, est souvent filtré à travers des mailles et les analyses ne sont réalisées que sur la phase liquide ainsi obtenue (Cheng *et al.*, 2009; Hook *et al.*, 2009; Machmüller *et al.*, 2003; Whitford *et al.*, 2001; Wright *et al.*, 2004a; Wright *et al.*, 2006; Yanagita *et al.*, 2000). Cependant, dans le rumen les *Archaea* méthanogènes occupent quatre différentes niches : libres dans le liquide ruminal, attachées aux particules alimentaires solides, attachées à l'épithélium ruminal ou en ecto- ou endosymbiose avec les protozoaires (Janssen & Kirs, 2008).

La quantification en qPCR ciblant le gène *mcrA* a montré que la population méthanogène attachée à l'épithélium ruminal était plus abondante que celle de la phase liquide ; les cellules attachées aux particules solides prenaient une place intermédiaire (Pei *et al.*, 2010). *Methanobrevibacter millerae* était l'espèce dominante retrouvée dans les trois banques de clones construites avec des séquences amplifiées de la phase liquide, de la phase solide et de l'épithélium ruminal. *Methanobrevibacter smithii* était abondant dans la phase liquide, alors que *Methanobrevibacter ruminantium* n'a été retrouvé que dans la phase solide (Pei *et al.*, 2010). Approximativement un quart des séquences, 25,4% et 23,7%, provenant respectivement de l'épithélium ruminal et de la phase solide présentaient moins de 97% de similarité avec des espèces connues de méthanogènes (Pei *et al.*, 2010), suggérant qu'une **grande partie de la diversité des méthanogènes du rumen reste pour le moment inconnue.**

Comme mentionné, les *Archaea* méthanogènes ont été observées également sur la surface des protozoaires (Vogels *et al.*, 1980). Stumm *et al.*, (1982) ont suggéré que pas moins de 20% des méthanogènes du rumen vivent en association avec les protozoaires. De plus, Finlay *et al.*, (1994) ont mis en évidence des *Archaea* en associations endosymbiotiques avec les protozoaires ciliés *Entodinium* spp. et *Dasytricha ruminantium* et ont estimé que les méthanogènes peuvent occuper jusqu'à 1% du volume cellulaire de ces eucaryotes. Les *Archaea* méthanogènes associées aux protozoaires seraient responsables de 9% à 25% du CH₄

produit dans le rumen (Newbold *et al.*, 1995). Ainsi, dans le liquide ruminal d'une vache multipare recevant une ration mixte (fourrage : concentré, 60 : 40), le signal de la sonde spécifique du gène *rrs* des *Archaea* représentait presque 4% du signal de la sonde procaryote universelle ; dans la fraction enrichie en protozoaires du même prélèvement, le *rrs* des *Archaea* représentait 3.12% du signal total (Sharp *et al.*, 1998). Ces résultats suggèrent qu'un **nombre important de méthanogènes vivent attachés aux ciliés**. Par contre, Vogels *et al.*, (1980) ont rapporté, de leur côté, que pas plus de 30% à 50% des protozoaires émettaient le signal fluorescent caractéristique de cofacteur F₄₂₀ spécifique des méthanogènes. Le désaccord entre les résultats peut s'expliquer par les différentes conditions expérimentales (animaux, rations, prélèvement) et techniques d'analyse.

La phylogénie des *Archaea* vivant en symbiose avec les protozoaires dans le rumen a fait l'objet d'un petit nombre d'études. Dans le liquide ruminal d'une vache recevant une ration mixte (fourrage : concentré 60 : 40), les signaux des sondes ciblant spécifiquement la famille *Methanobacteriaceae*, et les ordres *Methanomicrobiales* et *Methanosarcinales* représentaient respectivement 92%, 12,1% et 2,75% du signal total. Dans la fraction enrichie en protozoaires de ce même prélèvement, les *Methanomicrobiales* n'ont pas été détectés et les *Methanobacteriaceae* représentaient 99% de la réponse (Sharp *et al.*, 1998). Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une association préférentielle des membres de cette famille avec les protozoaires. Dans les études de Chagan *et al.*, (1999) et Tokura *et al.*, (1997), les *Methanobrevibacter* (famille *Methanobacteriaceae*) ont également été les plus abondants parmi les méthanogènes associés aux protozoaires. Regensbogenova *et al.*, (2004a) ont fait les mêmes observations, mais ont également trouvé des *Methanosarcinales* associés au protozoaires. Il est cependant difficile de conclure avec les résultats de ces études. A l'exception de celle de Sharp *et al.*, (1998), le contenu ruminal analysé provenait d'un seul animal, les rations étaient différentes et la diversité totale des méthanogènes dans le rumen (associés ou pas au protozoaires) n'a pas été décrite.

Regensbogenova *et al.*, (2004a) n'ont pas observé d'associations préférentielles entre groupes particuliers de protozoaires et taxa spécifiques de méthanogènes. Alors que selon l'étude d'Ohene-Adjei *et al.*, (2007) avec des ovins à faune contrôlée, les différents taxa d'*Archaea* s'associeraient spécifiquement aux différents groupes de protozoaires. Chez les ovins inoculés uniquement avec *Isotricha* et *Dasytricha*, presque la totalité des clones (90%) ont été regroupés dans le même cluster que *Methanobrevibacter smithii*, alors qu'aucune

séquence de la banque de clones des animaux dépourvus de protozoaires n'a présenté des similarités avec la famille des *Methanobacteriaceae*.

V. AUTRES POPULATIONS MICROBIENNES DANS LE TUBE DIGESTIF

Comme le consensus généralement adopté suppose beaucoup moins de variations intra-animales qu'inter-animales (Wallace, 2008), les communautés microbiennes résidentes d'un côté dans le rumen et d'autre côté dans le reste du tube digestif de l'animal sont considérées comparables. Cependant, une différence majeure caractérise les microbiotes ruminal et caecal : c'est l'absence de protozoaires dans le cæcum-colon (Baldwin & Allison, 1983). De plus, les aliments qui arrivent dans ce dernier fermenteur du tube digestif contiennent moins de matière organique à fermenter. Ces deux facteurs pourraient partiellement expliquer les différences décrites entre les communautés microbiennes du rumen et du cæcum (Frey *et al.*, 2010 ; Lin *et al.*, 1997 ; Romero-Perez *et al.*, 2011). Dans leur étude comparative Romero-Perez *et al.*, (2011) concluent que le type d'échantillon (ruminal ou caecal) plus que le régime ou les conditions environnementales expliquerait les différences observées au niveau microbien dans les deux écosystèmes. Vu cependant, le peu d'informations disponibles et l'importance de la communauté microbienne du rumen dans le cadre de cette thèse, les points ci-après lui seront entièrement consacrés.

V.1. Les bactéries du rumen

La flore ruminale se caractérise par son extrême diversité liée autant au nombre d'espèces bactériennes colonisant le rumen qu'aux activités enzymatiques présentes (Koike *et al.*, 2003 ; Brulc *et al.*, 2009 ; Koike *et al.*, 2010 ; Welkie *et al.*, 2010). Les bactéries sont essentielles pour les ruminants qui ne peuvent pas survivre sans elles (Baldwin & Allison, 1983). Le rumen contient environ 10^{11} cellules bactériennes par millilitre et elles seules représentent environ 50% de la biomasse microbienne (Jouany, 1994). La population bactérienne du rumen a fait l'objet de nombreuses études au cours des 40 dernières années : plusieurs parmi elles ont décrit l'isolement et l'identification d'un nombre important de souches bactériennes provenant de ruminants d'âge, de statut sanitaire, de localisations géographiques différents et soumis à une variété de rations. Bien que les études phénotypiques aient de considérables limites, elles ont fourni un aperçu du métabolisme de quelques bactéries, de leurs interrelations et de leurs contributions aux processus fermentaires du rumen. Hungate (1966) a proposé la classification des bactéries ruminales en fonction des

substrats qu'elles sont capables de dégrader ou de fermenter : fibrolytiques (cellulolytiques et hémicellulolytiques), amylolytiques, saccharolytiques, pectinolytiques, protéolytiques, lipolytiques, et bactéries utilisant les produits formés par d'autres microbes (Tableau 4). Les fonctions de plusieurs espèces se recouvrent largement, ce qui contribue à la stabilité de l'écosystème (Edwards *et al.*, 2008). Les fonctions d'une espèce donnée peuvent être limitées ou au contraire très larges. Ainsi, *Butyrivibrio fibrisolvens* et *Prevotella ruminicola* peuvent utiliser des nombreuses sources d'énergie, alors que les bactéries cellulolytiques n'utilisent que la cellulose et ses produits d'hydrolyse (Tableau 4). D'autres espèces sont encore plus spécialisées et occupent des niches écologiques très étroites : *Anaerovibrio lipolytica* n'hydrolyse que les lipides et ne fermente que le glycérol ; *Vibrio succinogenes* ne tire son énergie que de la réduction du fumarate en succinate.

Espèce bactérienne	Substrats						Produits
	Cellulose	Hémicellulose	Dextrines	Amidon	Pectines	Sucres	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	+	+	-	-	+	-	S, F, A,
<i>Ruminococcus albus</i>	+	+	-	-	-	-	A, F, E, H
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	+	-	-	-	-	S, F, A, H
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+	+	-	+	+	+	B, F, A, H
<i>Prevotella ruminicola</i>	-	+	-	+	+	+	S, F, A, P
<i>Streptococcus bovis</i>	-	-	-	+	+	+	L, A, P, B, F, H
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	-	-	-	+	-	-	L, A, F, E
<i>Succinomonas amyloletuca</i>	-	-	-	-	+	-	S, F, A, E
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	-	-	+	-	+	+	S, A, P
<i>Eubacterium ruminantium</i>	-	+	+	-	-	+	A, S, P
<i>Megasphaera elsdenii</i>	-	-	-	-	-	+	A, F, B, L

Tableau 4 : Principales espèces bactériennes du rumen, leurs substrats et produits de fermentation.

A : acétate, B : butyrate, E : éthanol, F : formate, L : lactate, P : propionate, H : hydrogène

Néanmoins, les méthodes de culture bactérienne ne permettent l'isolement que d'une faible fraction des espèces de l'environnement (Amann *et al.*, 1995). L'introduction des outils moléculaires a permis d'évaluer la diversité génétique et les relations phylogénétiques entre les microorganismes du rumen sans avoir recours aux techniques microbiologiques « classiques » (Kobayashi, 2006). Ainsi, selon Whitford *et al.*, (2001) les séquences du gène *rrs* issues de jus de rumen, seraient affiliées à au moins 27 genres ou espèces non isolées de bactéries ruminales. Egalement, selon Edwards *et al.*, (2004) la majorité des séquences du gène *rrs* dans le contenu ruminal serait distribuée dans des groupes indépendants, qui ne sont pas affiliables à des bactéries ruminales connues ; seuls 11 % des séquences détectées avaient des représentants cultivables.

Traditionnellement, on considère que la population bactérienne du rumen comprend trois sous-populations en fonction de la niche occupée : bactéries attachées aux particules alimentaires, bactéries planctoniques (libres dans le contenu ruminal) ou attachées à l'épithélium ruminal (Edwards *et al.*, 2008) ; il n'est pas surprenant que la composition de ces trois sous-populations s'est révélée être différente (Sadet *et al.*, 2007; Welkie *et al.*, 2010). La diversité des bactéries de la phase liquide et solide du contenu ruminal a forcément été influencée par la ration alimentaire (Figure 9), sans que ces changements ne se répercutent sur la structure de la sous-population associée à l'épithélium (Sadet *et al.*, 2007). L'influence de l'animal hôte serait plus prononcée sur ce dernier groupe que sur les bactéries dans le contenu ruminal (Sadet *et al.*, 2007). Néanmoins, la structure des **populations bactériennes du contenu ruminal serait également spécifique de l'animal hôte**. Ainsi, parmi toutes les séquences différentes provenant de deux vaches, 11 % étaient retrouvées exclusivement chez une d'entre elles, alors que les animaux recevaient la même ration, en même quantité, produisaient la même quantité de lait de composition comparable et avaient des profils en AGV et pH ruminaux similaires (Welkie *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont été rapportés par Brulc *et al.*, (2009) : 66% des séquences retrouvées chez un des trois taurillons utilisés dans leur étude appartenaient à la classe des *Gammaproteobacteria*, alors que ce phylum ne représentait que de 3.5 % à 8 % des séquences chez les deux autres animaux. **Ces résultats suggèrent qu'il existe un chevauchement considérable des niches dans le rumen, ainsi qu'une capacité de remplacement de niche.**

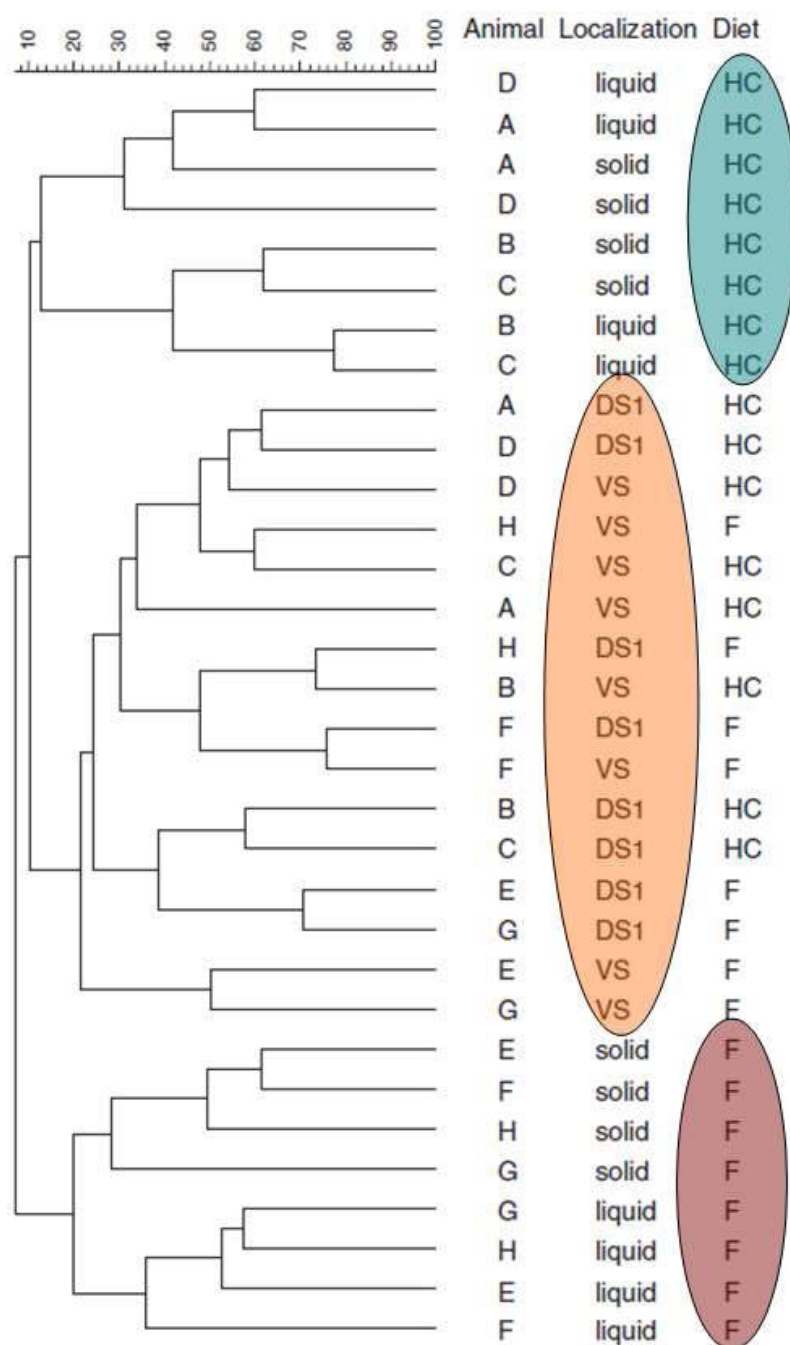


Figure 9 : Dendrogramme construit en utilisant la méthode UPGMA⁵ sur les profils de migration en PCR-DGGE des séquences *rrs* isolées de bactéries du rumen

Les échantillons sont de l'épithélium ruminal - sac ventral et dorsal (VS et DS1 respectivement) ou de la phase liquide et solide du contenu ruminal. Les échantillons ont été prélevés sur 8 agneaux ayant reçu une ration fourrage (F) ou riche en concentré (HC) (Sadet *et al.*, 2007)

⁵ UPGMA: unweighted pair-group method using arithmetic averages

L'étude d'un plus grand nombre d'animaux a montré que les profils d'empreinte moléculaire bactériens se regroupaient en fonction de la race (Guan *et al.*, 2008). **La génétique de l'hôte peut donc jouer un rôle important dans l'organisation de l'écosystème microbien ruminal.** L'analyse en PCR-DGGE du polymorphisme de séquence du gène *rrs* a montré que les profils des taurillons « efficaces » dans l'utilisation la ration (caractérisés par une faible ingestion résiduelle, RFI pour residual feed intake) groupaient ensemble et étaient clairement séparés de ceux des animaux à fort RFI (moins efficaces) (Guan *et al.*, 2008). **L'efficacité avec laquelle la ration est utilisée est probablement liée à des groupes bactériens spécifiques.**

Evidemment, l'influence de la ration alimentaire sur la composition de la population bactérienne du contenu ruminal ne doit pas être sous-estimée. Le dendrogramme construit avec des séquences *rrs* dans l'étude de Sadet *et al.*, (2007) (Figure 9) a séparé en deux nœuds bien distincts les échantillons provenant des moutons recevant une ration composée de fourrage seul de ceux provenant des moutons alimentés avec une ration riche en concentré. Ces différences qualitatives dans la diversité bactérienne en fonction de la ration ont également été soulignées par d'autres auteurs, comparant des rations « fourrage » aux rations « concentré » (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2000; Tajima *et al.*, 2001), des différentes rations « fourrage » entre elles (Huws *et al.*, 2010; Pitta *et al.*, 2010) ou des ensilages contenant ou pas des tanins condensés (Romero-Perez *et al.*, 2011). Quantitativement, le nombre des bactéries viables et cultivables a été estimé à 10^{10} cellules par gramme de MS de contenu ruminal aussi bien avec une ration 100% fourrage qu'avec une ration 50% fourrage : 50% concentré (Mosoni *et al.*, 2007). Les bactéries cellulolytiques représentent 10 % de la flore avec une ration fourrage et leur nombre diminue 4.5 fois après l'inclusion du concentré (Mosoni *et al.*, 2007). Les mêmes observations ont été faites par Tajima *et al.*, (2000) : un mois après la transition entre un régime à base de foin et un régime riche en concentré, le nombre de bactéries fibrolytiques a diminué, au profit des amylolytiques.

Sur le dendrogramme de la Figure 9, on peut également voir une séparation nette des échantillons de la phase liquide et solide chez les moutons ayant reçu une ration fourrage (Sadet *et al.*, 2007). Aussi, chez des vaches recevant un régime mixte, 13,5 % des fragments différents détectés en ARISA⁶ était exclusivement trouvés dans la phase liquide contre 1,9 % dans la phase solide (Welkie *et al.*, 2010). Ces résultats sont en accord avec d'autres études

⁶ ARISA : Automated rRNA Intergenic Spacer Analysis, technique d'empreinte moléculaire basée sur le polymorphisme des séquences intergéniques

(Huws *et al.*, 2010 ; Pitta *et al.*, 2010) et suggèrent des **niches spécialisées dans la dégradation des sucres solubles et des fibres végétales.**

V.2. Les protozoaires

Le rumen abrite une population complexe de protozoaires, comprenant les flagellés et les ciliés (Jouany *et al.*, 1995). La diversité et l'activité des flagellés ne sont pas encore bien connues. Les ciliés constituent un groupe remarquable dont la concentration peut atteindre 10^5 à 10^6 cellules/ml de liquide ruminal (Hungate, 1966). Les protozoaires ciliés du rumen appartiennent aux deux grands groupes : les Entodiniomorphes et les Holotriches (Clarke, 1977). Les genres d'Entodiniomorphes les plus fréquemment retrouvés dans le rumen, sont *Entodinium*, *Eudiplodinium*, *Epidinium*, *Diplopastron*, *Polyplastron* et *Metadinium*.

Des méthodes PCR ont été développées pour amplifier des fragments du gène de l'ARNr 18S, ainsi que des espaces intergéniques afin d'assurer l'identification de plusieurs protozoaires du rumen morphologiquement distincts, mais issus de cultures pures (Wright *et al.*, 1997). L'application de cette approche moléculaire *ex vivo* sur contenu ruminal nécessite des précautions du fait de la présence d'autres membres du domaine *Eucarya* (levures, champignons, cellules végétales ou animales), dont le gène de l'ARNr 18S est potentiellement amplifiable avec les mêmes amorces (Deng *et al.*, 2008).

Aussi bien le dénombrement classique que l'utilisation d'outils moléculaires ont identifié *Entodinium* comme le genre prédominant dans le rumen (Karnati *et al.*, 2003 ; Regensbogenova *et al.*, 2004b ; Shin *et al.*, 2004). L'étude de Regensbogenova *et al.* (2004b) a souligné les **variations qui peuvent exister dans la diversité des protozoaires entre animaux** logés et nourris ensemble.

Tout comme pour les bactéries et les *Archaea*, le nombre et la diversité des protozoaires sont influencés par la ration alimentaire (Tableau 5) (Bonhomme, 1990 ; Karnati *et al.*, 2003 ; Regensbogenova *et al.*, 2004b). Ceci peut être dû à la compétition entre les groupes de ciliés, mais également à l'impossibilité de certains groupes de s'adapter aux conditions physico-chimiques tel un pH bas (Bonhomme, 1990). Les phases liquide et solide du contenu ruminal présenteraient des populations différentes de ciliés suggérant **des rôles spécifiques dans la fonction du rumen** (Shin *et al.*, 2004). Cependant, la totalité des séquences du gène codant l'ARNr 18S de la phase solide du contenu ruminal appartenait à des espèces inconnues ; c'était également le cas pour un peu moins de 80% des séquences retrouvées dans la phase

solide. Ces résultats suggèrent que nous ne connaissons à ce jour qu'une infime partie de la faune ruminale.

Abondance relative %	Fourrage : Concentré 1 :1	Luzerne
<i>Entodinium</i>	97.3	77.2
<i>Diplodiniæ^a</i>	1.7	4.6
<i>Epidinium</i>	0.3	<0.5
<i>Ophryoscolex</i>	ND	0.9
<i>Isotricha</i>	<0.3	6.0
<i>Dasytricha</i>	0.7	11.2

Tableau 5 : Abondance relative des protozoaires du rumen chez des vaches recevant deux rations différentes.

^a Sous-famille, comprenant les genres *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, and *Polyplastron*. ND : non détecté (Karnati *et al.*, 2003)

Les recherches ont démontré que les protozoaires ne sont pas indispensables au bon fonctionnement du rumen. La faune microbienne peut être partiellement ou complètement éliminée, procédé expérimental connu sous le nom de **DEFAUNATION**. Les animaux défaunés sont toujours capables de digérer les fibres et dans certaines conditions la défaunation peut avoir des effets bénéfiques sur le métabolisme et la performance animale (Eugène *et al.*, 2004). Les effets de la défaunation sur la production de CH₄ sont discutés dans l'Annexe 1.

V.3. Les champignons

Les champignons du rumen, sont difficiles à dénombrer car les résultats sont largement influencés par la méthode utilisée (nombre de sporanges ou de zoospores). Malgré cette incertitude, leur concentration est estimée à 10³/ml. Trois genres ont été bien identifiés : *Neocallimastix*, *Piromyces* et *Caecomyces*. *Neocallimastix* est pluri-flagellé, alors que les deux autres sont uniflagellés (Jouany, 1994).

Les zoospores se fixent sur les tissus végétaux frais lors de leur germination et se développent ensuite au cours du stade végétatif. Le système rhizoïdal⁷ du thalle⁸ pénètre les tissus végétaux, alors que le sporange se développe sur la partie extérieure des fragments végétaux. Les zoospores sont libérées du sporange mûr et infestent les autres tissus végétaux. La colonisation des tissus végétaux débute peu après l'ingestion des aliments par les animaux (15-30 minutes). Les champignons produisent de grandes quantités d'enzymes impliquées dans la digestion des glucides de la paroi végétale (exocellulases, endocellulases, cellodextrinases) pour former du cellobiose qui est ensuite fermenté.

⁷ rhizoïde : un poil assurant les fonctions de fixation et d'absorption

⁸ thalle : appareil végétatif ne possédant ni feuilles, ni tiges, ni racines

Les champignons du rumen peuvent fermenter la plupart des mono- et disaccharides mais ils ne peuvent pas utiliser le mannose, le sorbitol et le fucose comme source de carbone. Les principaux produits terminaux de la fermentation sont le lactate, le formate, l'acétate, l'hydrogène, le dioxyde de carbone et l'éthanol (Jouany, 1994).

VI. POURQUOI LA PRODUCTION DE MÉTHANE VARIE ?

La place centrale de l'hydrogène dans la régulation des fermentations ruminales a été soulignée il y a près de 50 ans (Hungate, 1967) et a été récemment revisitée (Janssen, 2010). L'hydrogène dans le rumen est issu du métabolisme d'un certain nombre de microorganismes fermentaires et se trouve sous deux formes : gazeuse dans le sac dorsal du rumen et dissoute dans le contenu ruminal. Les informations sur la concentration en hydrogène dans le rumen sont rares à cause de ses faibles valeurs (1 μM à 50 μM d'après Janssen (2010)) qui passent sous le seuil de détection de la plupart des appareils analytiques actuels. Ces basses concentrations reflètent la consommation rapide de l'hydrogène par les méthanogènes (Janssen, 2010). Par manque de méthodes sensibles, les premières études ont été réalisées *in vitro*. En incubant des contenus ruminiaux sous des concentrations croissantes en hydrogène dans la phase gazeuse, Czerkawski & Breckenridge (1972) ont mis en évidence une corrélation positive entre la production de CH_4 et la disparition d'hydrogène gazeux. Les concentrations en hydrogène dissous restaient basses et constantes suggérant que le substrat est capté par les méthanogènes dès qu'il se trouve sous sa forme dissoute.

L'hydrogène est le produit du métabolisme d'un grand nombre des microorganismes du rumen : certaines bactéries (Tableau 4), les protozoaires et les champignons. Intuitivement, on peut s'attendre à ce que les variations observées dans la quantité d'hydrogène produit trouvent leur origine dans des modifications des communautés bactériennes qui le produisent. Bien que la méthanogenèse soit, en conditions normales, la principale voie hydrogénotrophe dans le rumen, elle n'est pas la seule. Quelle proportion de l'hydrogène métabolique serait assimilée par les méthanogènes dans la production de CH_4 dépend d'un certain nombre de facteurs biotiques et abiotiques. Dans ce contexte, la synthèse bibliographique ci-après reprend quelques-uns des essais menés pour étudier la production de CH_4 chez les ruminants dans l'objectif de relier changements dans la communauté méthanogène avec la dynamique de la production / consommation de l'hydrogène métabolique.

PRODUCTION DE METHANE ET INTERACTIONS MICROBIENNES DANS LE RUMEN

M. Popova, D. P. Morgavi, M. Doreau et C. Martin

5

Article de synthèse bibliographique

EN PREPARATION POUR SOUMISSION A INRA PRODUCTIONS ANIMALES

10 Résumé

Le méthane entérique est formé au cours de la dégradation microbienne des aliments dans le rumen, ce qui implique que toute variation dans sa production serait le résultat d'un changement dans la chaîne trophique microbienne. En effet la structure et/ou l'activité de la communauté microbienne fermentaire détermine la quantité et partiellement l'utilisation de l'hydrogène métabolique, substrat limitant de la méthanogenèse. Les microorganismes méthanogènes, bien qu'ils constituent une petite partie de la biomasse et de la diversité microbienne dans le rumen, seraient capables d'adapter leur métabolisme quand les conditions ruminales ne sont pas optimales. Aujourd'hui, le manque de lien entre la production de méthane et le nombre des méthanogène est bien établi. En revanche, les nouvelles études relient de plus en plus les variations observées dans la méthanogenèse à des variations dans l'activité métabolique des méthanogènes ou à des changements considérés jusqu'à là « mineurs » dans sa diversité. Ainsi, le développement des stratégies pour réduire les émissions de méthane implique inévitablement la bonne compréhension des modifications induites à long terme en considérant l'écosystème microbien dans son ensemble.

25 Abstract

Enteric methane is formed during the microbial degradation of food in the rumen, which implies that any change in its production is the result of a change in the microbial trophic chain. Indeed the structure and/or activity of the microbial community determines the amount and partial use of hydrogen, limiting substrate of methanogenesis. Methanogenic microorganisms, although they constitute a small portion of the biomass and microbial diversity in the rumen, would be able to adapt their metabolism when rumen conditions are not optimal. Today, the lack of link between methane production and the number of

methanogens is well established. However, new studies highlights that the variations in methane production are more likely to be due to changes in the metabolic activity of methanogenic community or changes considered to the "minor" in its diversity. Thus, developing strategies to reduce methane emissions inevitably involves the understanding of long-term changes induced by considering the microbial ecosystem as a whole.

Mot clés : hydrogène, méthane, méthanogènes, microbes, rumen

« **Chapeau** » **incitatif** : La production de méthane n'est pas reliée au nombre des méthanogènes présents dans le contenu ruminal. Les changements dans la composition et l'activité de cette communauté, conditionnés par la quantité d'hydrogène produit au cours des fermentations expliquent les variations dans la production de méthane par les ruminants.

Introduction

Bien que le méthane (CH_4) soit un produit naturel des fermentations ruminales, sa production représente une perte énergétique de l'ordre de 2% à 12% de l'énergie ingérée par l'animal (Johnson and Johnson, 1995). Il est rejeté dans l'atmosphère essentiellement par voie orale (95%) au cours d'éruclations régulières ou par les poumons, après passage dans le sang. La contribution du CH_4 à l'effet de serre au niveau de la ferme est comprise entre 30% et 60% ; le CH_4 d'origine entérique en représente 80% et les 20% restants proviennent des effluents d'élevage (Gill et al., 2010). La réduction des émissions de CH_4 par les ruminants, présente donc des intérêts économiques et environnementaux non négligeables.

Le CH_4 est formé dans le rumen quand l'hydrogène (H), libéré par les microorganismes fermentaires, est utilisé par d'autres microorganismes dans la réduction du dioxyde de carbone (CO_2). Les *Archaea* méthanogènes sont les uniques responsables de la production de CH_4 dans le rumen ce qui a motivé un certain nombre de travaux à étudier cette communauté microbienne particulière (revue de Janssen et Kirs (2008)). Cependant, comme pour tout écosystème complexe, il est important de tenir compte aussi bien des interactions entre microorganismes et environnement (les conditions physico-chimique du rumen et/ou l'animal hôte dans ce cas précis) que des interactions entre les différentes populations microbiennes (symbiose, prédation, compétition). Dans ce contexte, concentrer les recherches exclusivement sur les producteurs directs de CH_4 , en les isolant de leur environnement naturel, peut conduire à de mauvaises interprétations quant à leur rôle dans la méthanogenèse.

Un nombre restreint d'études a cherché à relier la production de CH₄ et l'ensemble des mécanismes microbiens qu'elle implique au sein d'un même essai; un nombre encore plus petit parmi ces études ont été réalisées *in vivo*.

La production de CH₄ dans le rumen dépend de deux facteurs d'égale importance, mais régulés autant l'un que l'autre par les concentrations d'H métabolique : la dynamique de la population méthanogène et la thermodynamique des fermentations ruminales (Janssen, 2010). L'objectif de cette revue est de récapituler les réponses microbiennes aux différentes stratégies utilisées pour diminuer la méthanogénèse ruminale ; une attention particulière sera portée sur l'utilisation de l'H métabolique et les effets sur les *Archaea* méthanogènes.

Les méthanogènes dans l'écosystème ruminal

La communauté microbienne du rumen est extrêmement diverse, comportant des bactéries, des protozoaires, des champignons, des *Archaea* et des bactériophages (Jouany, 1994). Ces microorganismes interagissent pour assurer la dégradation des aliments ingérés par les ruminants, composés principalement de polymères glucidiques. La dégradation des aliments commence par l'hydrolyse en monomères qui sont ensuite fermentés (Jouany, 1994). Au cours des fermentations les microorganismes tirent l'énergie (sous forme d'ATP) nécessaire à leur croissance et prolifération et produisent des acides gras volatils (AGV) et des gaz (ammoniac (NH₃), CO₂ et H₂). Les AGV qui sont sans valeur pour les microbes, traversent la paroi du rumen et peuvent constituer jusqu'à 70% de l'énergie de l'animal (Hvelplund, 1991). Les principaux AGV sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Les gaz sont éliminés par la respiration ou éructations régulières, sauf pour la partie de l'H qui est dissoute dans le contenu ruminal. L'élévation de la pression partielle en H empêche l'oxydation des cofacteurs impliqués dans les voies fermentaires et peut inhiber le déroulement optimal de la dégradation des aliments. Pour assurer la continuité des fermentations, les microorganismes du rumen ont mis en place des relations nutritionnelles étroites, illustrées au mieux par le « transfert d'H inter-espèce » (Jouany et Thivend (2008)) qui permet de régénérer les cofacteurs oxydés. En effet, les *Archaea* méthanogènes utilisent l'H produit par les microorganismes fermentaires pour réduire le CO₂ en CH₄.

Malgré le rôle important que les *Archaea* méthanogènes jouent dans l'écosystème microbien, elles ne constituent qu'une petite partie de la biomasse microbienne (de 1 % à 4 %) (Lin et al., 1997; Yanagita et al., 2000) et se caractérisent par une faible diversité aussi bien chez l'ovin (Wright et al., 2004a; Wright et al., 2006; Wright et al., 2008; Yu et al.,

2008) que chez le bovin (Whitford et al., 2001; Nicholson et al., 2007; Wright et al., 2007).
 100 Uniquement 8 espèces ont été isolées (Janssen and Kirs, 2008), mais les techniques de
 biologie moléculaires ont permis un regard plus large en identifiant des nouvelles séquences
 appartenant aux espèces non-cultivées. Un grand nombre d'études d'indentification classique
 et moléculaire de la population méthanogène du rumen a été mené avec toute une série de
 conditions expérimentales différentes (rations, traitements, localisation géographique, race
 105 des animaux...) (Janssen and Kirs, 2008). Les résultats de ces expérimentations, ont identifié
Methanobrevibacter spp comme le genre prédominant. Parmi les *Methanobrevibacter*, le
 clade de *M. gottschalkii* (*M. gottschalkii*, *M. thaueri*, *M. millerae*) est le plus représenté, suivi
 de près par celui de *M. ruminantium* (*M. ruminantium*, *M. olleyae*) (Janssen and Kirs, 2008).

L'énergie nécessaire à la croissance des *Archaea* méthanogènes est obtenue
 110 principalement lors de la production du gaz CH₄. Ce groupe fonctionnel est capable d'utiliser
 un nombre restreint de substrats et trois voies métaboliques méthanogènes ont été reconnues,
 en fonction de l'accepteur final d'électrons : hydrogénotrophes, méthylotrophes et
 acétoclastes (Pelmont, 2005; Liu and Whitman, 2008). Les voies complètes avec les enzymes
 correspondantes ont été récemment revues par Liu et Whitman (2008). Ainsi les
 115 méthanogènes en général peuvent être divisés en trois groupes, bien que certaines espèces
 sont capables d'emprunter deux ou même les trois parmi ces voies (Liu and Whitman, 2008).
 Dans le rumen, les méthanogènes identifiées sont essentiellement des hydrogénotrophes. Des
 séquences appartenant au genre *Methanosarcina*, caractérisé par le métabolisme versatile de
 ses membres, ont été cependant identifiées (Denman et al., 2007). Les représentants de ce
 120 groupe phylogénétique utilisent principalement les méthylamines et l'acétate comme substrats
 et sont des hydrogénotrophes occasionnels (Balch et al., 1979; Garcia et al., 2000).

Le rôle central de l'H dans les fermentations ruminales

Czerkawski (1986) ont estimé que 48% du pool total d'H métabolique sont utilisés dans la
 125 méthanogenèse, 33% dans la synthèse d'AGV et 12% dans la biomasse microbienne. Plus
 récemment, Janssen (2010) a proposé un modèle thermodynamique des fermentations
 ruminales, régulé par la disponibilité du substrat limitant, notamment l'H. En effet, les voies
 fermentaires ne sont pas équivalentes en termes de bilan en H : la production d'acétate
 s'accompagne de libération d'H dans le milieu ruminal alors que la synthèse de propionate est
 130 une voie d'utilisation de l'H (revues de Martin et al., (2006) et Jouany and Thivend (2008)).
 Paradoxalement, selon le modèle de Janssen (2010), les conditions ruminales qui conduisent à

une augmentation des concentrations en H₂ réduiraient la quantité de CH₄ produit par unité de monomère alimentaire dégradé dans le rumen (Figure 1). Quand la pression partielle d'H₂ dans le milieu ruminal est faible, les voies métaboliques menant à sa production (synthèse de l'acétate en particulier) seront stimulées. Dans ce cas de figure, uniquement les microorganismes à grande affinité pour l'H₂ (les méthanogènes) activeront les voies hydrogénotrophes (Janssen, 2010) et par voie de conséquence une quantité importante de CH₄ sera produite. En revanche, l'élévation de la pression partielle d'H₂ exercerait un effet négatif sur la production d'acétate et stimulerait la production de propionate. Le substrat préférentiel des méthanogènes serait ainsi dévié et la méthanogenèse serait diminuée.

Depuis une cinquantaine d'années, un grand nombre de pistes pour réduire les émissions de CH₄ ont été proposées et étudiées par des nombreuses équipes. Globalement, les actions concrètes de ces stratégies peuvent être séparées dans trois grands groupes selon s'il s'agisse de la composition de la ration, l'utilisation d'additifs alimentaires, ou une manipulation directe du microbiote ruminal (Martin et al., 2010).

Toutefois, sauf dans les cas où des inhibiteurs spécifiques des méthanogènes sont utilisés, le mécanisme commun mis en œuvre pour réduire la production de méthane entérique, est la diminution de l'hydrogène potentiellement disponible pour la méthanogenèse.

Composition de la ration, production de méthane & *Archaea* méthanogènes

Il est admis d'une manière générale que le rendement en CH₄ (CH₄ g/kg MSI) avec une ration riche en cellulose est plus important que le rendement avec une ration riche en hémicellulose ; le rendement avec une ration riche en amidon étant le plus bas (pour des revues : Beauchemin *et al.*, 2009, Janssen 2010, et Martin *et al.*, 2010). Or, les rations riches en amidon n'ont pas eu d'effet apparent sur le nombre des méthanogènes dans le rumen (Tableau 1), bien que leur diversité semble être influencée par la composition de la ration (Tableau 2). Les clades méthanogènes prédominants restent toujours les mêmes quel que soit le régime (Wright et al., 2004a; Wright et al., 2007), mais des différences au niveau espèce (ou souche) liées au changement alimentaire ont été reportées (Zhou et al., 2010). En comparaison avec des animaux recevant des rations riches en amidon, la diversité des méthanogènes est plus riche chez des ovins au pâturage (Wright et al., 2004a). De même, la communauté méthanogène dans le rumen bovin était plus riche et plus diverse chez les animaux recevant un concentré fibreux comparés aux animaux recevant un concentré riche en amidon et lipides (Popova et al., 2011). L'amidon et/ou les lipides exerceraient une pression

sélective sur les méthanogènes du rumen (Popova et al., 2011). Zhou et al., (2010) ont suggéré que la ration sélectionnerait des voies méthanogènes particulières : avec des régimes pauvres en énergie (74% paille d'avoine), les souches *Methanobrevibacter ruminantium* NT7 qui produisent du CH₄ en réduisant le CO₂ sont les plus abondantes. Leur proportion diminue, avec des régimes riches en céréales (28% d'avoine et 58% d'orge), au profit de celle des souches de *Methanobrevibacter smithii* qui sont capables d'utiliser en plus du CO₂/H, le formate ou le méthanol (Zhou et al., 2010). La sélection des méthanogènes serait réalisée sous la pression d'un substrat moins disponible, car avec des régimes riches en amidon une réorientation des voies fermentaires vers la production de propionate au dépit de l'acétate est souvent observée (Martin et al., 2006; Beauchemin et al., 2009; Martin et al., 2010). Dans leur analyse bibliographique, Janssen (2010) concluent que dans ces conditions, la corrélation négative qui existe entre les productions de CH₄ et de propionate **signifie que moins d'H est formé par unité d'aliment**. Ce n'est cependant pas une règle sans exceptions : la production de CH₄ peut diminuer avec des régimes riches en céréales sans que la proportion molaire du propionate change pourtant (données non publiées de Martin et al., citées dans Martin et al., (2010)). Selon Martin et al., (2010), la diminution dans la méthanogenèse dans ces conditions serait la conséquence d'un effet direct de la baisse du pH ruminal sur les microorganismes, en particulier protozoaires et *Archaea*.

En effet, une corrélation positive entre le pH du contenu ruminal et la méthanogenèse a été rapportée (Lana et al., 1998). Le pH optimal des méthanogènes fluctue entre 6.1 et 7.8 en fonction des espèces (Miller and Wolin, 1985; Jarvis et al., 2000; Miller and Lin, 2002). Des cultures mixtes de microorganismes du rumen incubées à pH 7 ont produit la même quantité de CH₄ que celles incubées à pH 6 ; alors que à pH 6 et avec 80 mM d'acétate dans le milieu la méthanogenèse a été complètement inhibée (Van Kessel and Russell, 1996). L'activité des méthanogènes est inhibée par des fortes concentrations en acétate et cet effet négatif est renforcé par des pH bas. L'acétate est hautement lipophile et peut traverser les membranes microbiennes pour s'accumuler à l'intérieur des cellules en créant un gradient de pH. Ceci se traduit par une **inhibition de l'activité métabolique du microbe** qui peut être levée soit en augmentant le pH soit en diminuant la concentration en acétate dans le milieu externe (Van Kessel and Russell, 1996).

A la différence des régimes riches en amidon, la supplémentation de la ration avec des lipides a l'avantage d'augmenter sa valeur énergétique sans provoquer des baisses importantes du pH ruminal. Selon une première hypothèse, la réduction des émissions de CH₄

195 avec des rations supplémentées en lipides (voir Beauchemin et al., 2009, Martin et al., 2010) serait également expliquée par une baisse dans l'activité métabolique des méthanogènes, conséquence de la **disponibilité limitée du substrat H**. En théorie, l'H métabolique peut être utilisé pour saturer les acides gras insaturés. Cependant, Czerkawski (1986) ont estimé que l'H utilisé dans la biohydrogénation ne représente qu'1 % du pool total d'H dans le rumen. En 200 plus, récemment, des études *in vitro* (Mohammed et al., 2004; Zhang et al., 2008) ont montré une accumulation de l'H métabolique, lorsque des acides gras mono- et poly-insaturés sont utilisés. Si la disponibilité de l'H diminue avec l'ajout de lipides, ça serait plutôt la conséquence d'une **production plus faible**, résultat des effets toxiques sur les populations microbiennes du rumen (Doreau and Ferlay, 1995; Dohme et al., 2001; Zhang et al., 2008; 205 Agarwal et al., 2009). *In vivo*, l'huile de soya (riche en acide laurique) a diminué l'abondance relative des protozoaires de plus de 50 % et a exercé un fort effet toxique sur les bactéries fibrolytiques : *F. succinogenes* et *R. flavefaciens* dont l'abondance relative (en % de l'ADNr 16S bactérien) a diminué de 30% et 80% respectivement (Mao et al., 2010).

En ce qui concerne la population méthanogène, *in vitro*, son nombre n'est pas affecté 210 par l'ajout d'acides gras saturés à chaîne moyenne dans l'étude de Dohme et al., (2001), alors que la population se trouve significativement réduite (-78%) dans l'étude de Soliva et al., (2003) ; Zhang et al., (2008) ont observé une croissance avec des petites doses acides gras à chaîne longue saturés ou mono-insaturés et une inhibition par des faibles et fortes doses des acides gras à chaîne longue polyinsaturée. De plus, la sensibilité aux acides gras des différents 215 ordres de méthanogènes n'est pas la même. Avec un apport d'acide laurique (30 mg) le nombre des *Methanococcales* a régressé plus significativement que celui des *Methanobacteriales*, *Methanosarcinales* ou des *Methanomicrobiales* (Soliva et al., 2003). En accord avec les essais *in vitro*, la supplémentation de la ration d'ovins dépourvus de protozoaires avec de l'huile de la noix de coco (riche en acide laurique), était accompagnée 220 d'une baisse du signal de la sonde ciblant l'ARNr 16S des *Methanococcales* (Machmüller et al., 2003). Les auteurs ont utilisé le nombre des copies de l'ARNr 16S en tant qu'indicateur de l'activité métabolique des *Archaea*, ce qui leur permet de conclure que la baisse observée dans la quantité de CH₄ produit (-14 % en L/kg de matière organique digérée) était due à l'effet inhibitoire que l'huile exerce sur les méthanogènes et en particulier les 225 *Methanococcales*. En revanche la concentration des cellules méthanogènes dans le liquide ruminal des animaux dépourvus de protozoaires était multipliée par 3 avec la supplémentation de la ration avec de l'huile de la noix de coco. A l'inverse un effet toxique marqué (-20%) sur

les *Archaea* a été rapporté chez des taurillons avec l'huile de raifort japonaise supplémentée à hauteur de 2% de la matière sèche de la ration (Mohammed et al., 2004). L'abondance relative des méthanogènes (en % du *rrs* bactérien) a baissé de 40% chez des agneaux quand la ration était supplémentée avec 3% (sur base de la matière sèche) d'huile de soya (Mao et al., 2010). Ces résultats insinuent une **sensibilité différentielle** des différentes espèces de méthanogènes en fonction de la nature et/ou la quantité des lipides supplémentés dans la ration

La composition de la ration influence les voies fermentaires et les conditions physico-chimiques tel le pH dans le rumen. En conséquence, des espèces ou souches de méthanogènes plus aptes à survivre dans les nouvelles conditions environnementales sont sélectionnées. Les variations observées dans la méthanogenèse avec des différentes rations seraient dues au substrat limitant (H) moins disponible et/ou une communauté méthanogène moins efficace dans la production de CH₄.

La défaunation, production de méthane & *Archaea* méthanogènes

La défaunation est un procédé expérimental permettant d'éliminer la population de protozoaires du rumen. Une baisse moyenne de 10% des émissions de CH₄ est observée après la défaunation, cette valeur peut varier en fonction du régime alimentaire du ruminant (Morgavi et al., 2010). L'élimination des protozoaires est souvent associée à une augmentation de la proportion molaire du propionate, baisse de la production d'acétate et butyrate, et temps de rétention des aliments réduits dans le rumen (Eugène et al., 2004; Ranilla et al., 2007; Morgavi et al., 2008). Ces **réorientations fermentaires** peuvent être attribuées d'un côté au métabolisme des protozoaires (producteurs importants de butyrate et acétate), mais également à leur activité prédatrice envers les bactéries, (Hsu et al., 1991; Machmüller et al., 2003; Karnati et al., 2009) qui de plus semble sélective (Ozutsumi et al., 2006; Mosoni et al., in press). Aussi, en absence de protozoaires, la population bactérienne est plus nombreuse (Ozutsumi et al., 2005; Ozutsumi et al., 2006; Mosoni et al., in press), et la biomasse bactérienne peut également être considérée comme un puits à H (Hegarty, 1999).

La présence des protozoaires assure la **stabilité du pH ruminal** (Eugène et al., 2004). En effet, les ciliés sont capables d'engorger et stocker des graines d'amidon pour les dégrader ultérieurement, en évitant ainsi une baisse rapide du pH avec des rations riches en céréales (Jouany, 1994). Les réductions les plus significatives après l'élimination des protozoaires ont

été observées avec des rations mixtes (fourrage et concentré) (Morgavi *et al.*, 2010) et peuvent donc être partiellement attribuées à la corrélation positive, déjà discutée, entre la production de CH₄ et le pH ruminal (Lana *et al.*, 1998).

Enfin, les protozoaires semblent être spécifiquement **retenus dans le rumen** (Leng *et al.*, 1986; Williams and Coleman, 1997), assurant ainsi des temps de séjour plus longs à leurs méthanogènes symbiotiques (Janssen, 2010).

On pourrait donc s'attendre à des changements brusques dans la structure de la communauté méthanogène quand les protozoaires sont éliminés. Le tableau 3 résume les résultats de quelques études *in vivo* sur quantification de la population méthanogène en présence ou absence de protozoaires. En effet le nombre des méthanogènes viables avait baissé d'un log après la défaunation (Takenaka and Itabashi, 1995). Ces résultats de comptage cependant ne sont pas confirmés par les quantifications moléculaires. Le nombre des gènes *rrs* des *Archaea* par ml de contenu ruminal a doublé après la défaunation chez des moutons (Machmüller *et al.*, 2003) ce qui est cohérent avec l'augmentation du nombre des copies du gène *mcrA* (marqueur moléculaire des méthanogènes) observée chez des ovins défaunés (Popova *et al.*, 2010; Mosoni *et al.*, in press).

Dans notre étude, (Popova *et al.*, 2010), nous n'avons pas observé des changements dans la diversité des méthanogènes chez des moutons défaunés depuis 3 mois. Des études précédentes ont montré que les membres de la famille des *Methanobacteriaceae* (ordre *Methanobacteriales*) constituent 99% des méthanogènes retrouvés associés aux protozoaires ; leur nombre diminue au profit des membres de l'ordre des *Methanomicrobiales* (essentiellement retrouvés libres dans le contenu ruminal), après l'élimination des protozoaires (Sharp *et al.*, 1998). La diminution dans la production de CH₄ par les animaux défaunés, pourrait être expliquée par un changement dans la diversité des *Archaea* vers des espèces moins efficaces dans la production de CH₄. Cependant, les changements dans la diversité de la population méthanogène suite à la défaunation s'installent lentement (2 ans dans l'étude de Morgavi *et al.*, (2006)), alors que les effets sur la production de CH₄ sont immédiats.

Stumm *et al.*, (1982) ont montré que quand la contribution relative des protozoaires à la production totale d'H₂ dans le rumen diminue, le nombre d'association ectosymbiotiques avec les *Archaea* diminue également. De plus, des effets inhibitoires de la moindre disponibilité en H sur l'activité des méthanogènes ont été démontrés en mesurant l'expression du gène fonctionnel *mcrA* (Popova *et al.*, 2010). En absence de protozoaires la population

méthanogène était 2.5 fois moins active qu'en présence de protozoaires, bien que plus abondante.

La baisse dans la méthanogenèse suite à la défaunation serait due au substrat H qui devient limitant, parce que produit en moindre quantité et dévié vers de la production de propionate.

290 L'élimination des protozoaires du rumen, dans des conditions expérimentales, est réalisée soit en isolant le ruminant dès sa naissance, soit en lavant le rumen via la canule avec des détergents ou juste à l'eau. Bien que les résultats sur la production de CH₄ avec la défaunation semblent prometteurs, ces pratiques ne peuvent pas être appliquées dans les élevages.

295

Extraits de plantes, production de CH₄ & *Archaea* méthanogènes

Ces dernières années, l'exploration de phyto-molécules bioactives en tant qu'additifs alimentaires naturels a reçu une grande attention de la part des nutritionnistes et des microbiologistes du rumen pour modifier favorablement les fermentations (Jouany and Morgavi, 2007; Patra and Saxena, 2009a). Un grand nombre de molécules végétales, telles que les saponines, les tanins, les huiles essentielles ont sollicité l'intérêt des chercheurs par leur capacité à inhiber la méthanogenèse, améliorer le métabolisme des protéines et la productivité animale ou encore augmenter le contenu d'acide linoléique conjugué dans des produits alimentaires d'origine animale (Jouany and Morgavi, 2007; Patra, 2010).

305 **Les saponines** sont des détergents naturels qui possèdent des propriétés membranolytiques. Ils forment des complexes avec les stérols dans les membranes cellulaires essentiellement des eucaryotes (protozoaires et champignons dans le rumen) et provoquent la lyse cellulaire. La réduction des émissions de CH₄ observée quand les animaux reçoivent des rations riches en saponines (références dans les revues de Beauchemin *et al.*, 2009, Martin et al., 2010) peuvent partiellement être attribuées à la toxicité de ces molécules envers les protozoaires du rumen. Newbold et al., (1997) ont trouvé qu'une saponine présente dans *Sesbania sesban* (arbre polyvalent africain) est fortement toxique pour les protozoaires dont le nombre a diminué de 60% en 4 jours dans le rumen de moutons. Après 10 jours, cependant, la population de protozoaires dans le rumen était revenue à son niveau initial. La sensibilité des protozoaires à *S. sesban* n'ayant pas changé entre temps, les auteurs ont conclu en une adaptation des bactéries à dégrader les saponines et leur activité anti-protozoaires (Newbold et

315

al., 1997). *Yucca schidigera*, une autre plante à saponines, administrée via la canule (à faibles (20 g/jour) ou fortes (60g/jour) doses), a baissé la population de protozoaires de 42% chez des génisses (Hristov et al., 1999) sans effet dose. Après 14 jours de traitement, le nombre des
 320 protozoaires n'avait pas augmenté suggérant qu'il n'y a pas eu d'adaptation ni de la part des protozoaires ni de la part des bactéries du rumen (Hristov et al., 1999). En revanche, Benchaar et al., (2008) ont supplémenté la ration de vaches laitières avec 60 g de *Y. schidigera*, contenant 10 % de saponines sans observer d'effets négatifs sur les protozoaires. Hormis ces quelques divergences, qui pourraient s'expliquer par des dosages ou méthodes
 325 d'administrations différents, l'activité anti-protozoaire des saponines est l'effet le plus fréquemment rapporté dans les études (Patra and Saxena, 2009a). Toutefois, bien que les réductions des émissions de CH₄ avec des rations contenant *S. saponaria* chez des animaux faunés soient plus prononcées que chez les animaux défaunés (-29% vs -14% (Hess et al., 2003)), la baisse dans la méthanogenèse ne serait pas uniquement associée à leur toxicité
 330 envers les protozoaires. Enfin, on ne sait pas si la sensibilité de toutes les espèces de protozoaires est identique ou si la ration ne joue pas un rôle dans la sélection des bactéries capables de métaboliser ces toxines.

L'activité inhibitoire des saponines sur les *Archaea* varie en fonction de la nature de la molécule (Tableau 3). Selon Patra et Saxena (2009a), les effets des saponines sur les
 335 méthanogènes dépendraient aussi de la composition de la ration et du niveau de supplémentation (Patra and Saxena, 2009a). Les effets de *S. sesban* sur la méthanogenèse étaient plus prononcés avec une ration riche en concentré qu'avec une ration à base de fourrage (Goel et al., 2008b). Les saponines des fruits de *S. rarak* ont réduit *in vitro* le nombre des ARNr 16S des *Archaea* quand celles-ci étaient ajoutés à hauteur de 4 mg/ml; les
 340 concentrations plus basses n'ont pas eu d'effets significatifs (Wina et al., 2005). La paroi cellulaire des *Archaea* diffère de celle des autres procaryotes, mais aussi de celle des eucaryotes par sa composition en lipides et protéines uniques dans le monde vivant. Il est possible que cette particularité leur confère la résistance à certaines saponines. L'ajout de la saponine du thé dans des cultures pures de *Methanobrevibacter ruminantium* n'a pas eu
 345 d'effet ni sur la production de CH₄, ni sur le nombre des cellules ou sur leur activité métabolique mesurée via l'expression du gène fonctionnel *mcrA* (Guo et al., 2008). A l'inverse, la saponine de thé, a baissé la production de CH₄ de 8% dans des cultures mixtes du rumen sans affecter le nombre des producteurs de CH₄, mais en diminuant leur activité métabolique de 76% (Guo et al., 2008). Les saponines contenues dans *Sesbania* ont diminué

la population méthanogène de 78% sans que ceci se reflète sur la production de CH₄ *in vitro* (Goel et al., 2008a). Ces résultats divergents peuvent être dus à une efficacité différentes des espèces méthanogènes dans la production de CH₄. A notre connaissance, des études de diversité des méthanogènes n'ont pas été réalisées avec rations riches en saponines. Il serait intéressant de voir si des espèces particulières ne sont pas sélectionnés i) parce qu'elles sont résistantes aux saponines et/ou ii) parce qu'elles ont une affinité plus importante pour l'H.

Ces résultats contradictoires peuvent être bien sûr attribués aux différentes conditions expérimentales et méthodes analytiques. Néanmoins, quand la méthanogenèse se trouvait réduite soit des **effets directs (toxicité) ou indirects (substrat limitant) ont été décrits**. Parallèlement la nature de la saponine à utiliser pour des résultats optimaux sur la méthanogenèse, à quel usage et quelle durée nécessite encore des recherches. Très peu d'études à long terme ont été menées (Patra and Saxena, 2009a). Le principal problème qui se pose est la capacité d'adaptation des microorganismes du rumen (Newbold et al., 1997; Wina et al., 2005)

Les tanins sont des composés hydrosolubles polyphénoliques qui peuvent précipiter les protéines. Leurs effets sur les protozoaires sont contradictoires. Certaines études n'ont pas vu le nombre des ciliés changer (Newbold et al., 1997), alors que dans d'autres, il était significativement réduit (Hristov et al., 2003). Monforte-Briceno et al., (2005) se sont intéressés aux effets des tanins présents dans 15 variétés d'arbres sur les protozoaires; uniquement 3 parmi eux ont présenté des d'activités inhibitrices.

Les mécanismes d'action des tannins sur les *Archaea* méthanogènes et en particulier *M. ruminantium* ont été étudiés par Tavendale et al., (2005). Deux souches, YLM-1 et DSM1093 ont été cultivées sur un milieu contenant un extrait de tanins condensés. Les fractions oligomériques n'ont eu d'effet sur la croissance d'aucune des deux souches, estimée via la production de CH₄. En revanche, la fraction polymérique a complètement inhibé la méthanogenèse. Pour la souche YLM-1, ces effets étaient uniquement bactériostatiques, mais bactéricides pour la souche DSM1093 qui n'a pas repris ses activités métaboliques même après incubation prolongée. Les résultats de cette étude suggèrent que la baisse dans les émissions de CH₄ par les ruminants observée avec des rations contenant des tanins (pour des revues traitant le sujet : Patra and Saxena (2009b), Martin et al., (2010)) peut être due à une **inhibition directe des méthanogènes**, qui dépendrait toutefois de la structure chimique des tanins condensés. Il est également nécessaire de mener des études à long terme pour s'assurer que des espèces résistantes de méthanogènes n'apparaîtront pas. Les bactéries tanins-

tolérantes (genre *Streptococcus*,) présentent un autre problème potentiel. La tolérance dans certain cas de figure est due à leur capacité de modifier ou dégrader les tanins (Smith et al., 2005), ce qui permet de décontaminer le milieu ruminal.

Les **huiles essentielles** sont généralement abondantes dans les herbes et les épices et à moindre degré chez les autres plantes et jouent un rôle protecteur contre les attaques bactériennes, fongiques ou d'insectes. Les huiles essentielles sont lipophiles et interagissent avec les membranes cellulaires ce qui est à l'origine de leur toxicité et propriétés antimicrobiennes particulièrement à l'égard des bactéries à Gram positif. Des concentrations basses d'huiles essentielles (< 100 ppm) ont inhibé la croissance de presque toutes les cultures pures de bactéries du rumen (McIntosh et al., 2003), *S. bovis* s'est révélée être la souche la plus résistante et *P. ruminicola* parmi les plus sensibles, mais a développé une résistance. En ce qui concerne le nombre de protozoaires, il n'est pas influencé (Benchaar et al., 2008) ou diminue significativement (Ando et al., 2003) avec l'ajout d'huiles essentielles dans la ration de bovins (d'autres références disponibles dans les revues de Jouany and Morgavi, (2007) Beauchemin et al., (2009), Martin et al., (2010)).

Très peu de données sur les effets des huiles essentielles sur la population méthanogène sont disponibles dans la littérature. En cultures, la croissance de *M. smithii* a été inhibée quand la concentration des huiles est devenue supérieure à 1000 ppm (McIntosh et al., 2003). Ohene-Adjei et al., (2008) ont montré que la supplémentation de rations à base d'orge avec les huiles essentielles de cannelle, de l'ail ou du genévrier n'a pas influencé le nombre des copies du gène *rrs* des *Archaea* quantifiées en qPCR (Tableau 3). En revanche, le nombre des clones phylogénétiquement reliés aux *Methanosphaera stadtmanae*, *M. smithii* et à quelques taxas non cultivés avait augmenté au dépit des clones apparentés à *M. ruminantium*. Dans l'étude *in vitro* d'Agarwal et al., (2009), l'inclusion d'huile de menthe à hauteur de 0.33 ml/L a multiplié par deux le nombre des méthanogènes, alors que la production de CH₄ avait diminué de 20 %, sans affecter la synthèse des AGV. Des doses plus fortes (1 et 2 ml/L) ont eu un effet toxique sur les *Archaea* s'accompagnant d'une baisse de la méthanogenèse. Les effets négatifs sur la production de CH₄ à basses doses peuvent être expliqués par l'apparition des espèces méthanogènes **résistantes mais moins efficaces**.

L'effet anti-méthanogénèse des extraits de plantes est essentiellement dû à leur potentiel de diminuer la production d'H₂ en agissant sur les microorganismes fermentaires. Des effets directs sur les méthanogènes ont été observés à moindre degré. Bien que leur caractère « naturel » soit apprécié par les consommateurs, leurs effets sur les performances animales sont encore confondus. De plus, il n'est pas exclu que sous la pression sélective, les microorganismes trouvent des voies d'adaptation.

Puits alternatifs à hydrogène, production de CH₄ & *Archaea* méthanogènes

415

L'**acétogénèse réductrice** représente une autre voie alternative consommatrice d'H₂. L'acétogénèse réductrice a deux avantages principaux : abondance de l'accepteur d'électrons et production d'acétate, une source d'énergie aisément utilisable par le ruminant. Le problème est que l'affinité des acétogènes pour l'H₂ est considérablement plus basse que celle des méthanogènes (Mackie and Bryant, 1994). Thermodynamiquement, l'acétogénèse réductrice est moins favorable que la méthanogénèse dans le rumen (Weimer, 1998). Grâce à leur plus grande affinité pour le substrat et le rendement énergétique plus important (Fonty et al., 2007), les méthanogènes sont plus efficaces dans l'utilisation de l'H₂ que les acétogènes (Chaucheyras et al., 1995). En absence de méthanogènes, l'acétogénèse réductrice est la principale voie hydrogénotrophe (Fonty et al., 2007) et peut être stimulée par des pré- et probiotiques. Chaucheyras et al., (1995) ont montré que la consommation d'H₂ par une bactérie acétogène en co-culture avec une souche méthanogène était stimulée en présence de *Saccharomyces cerevisiae*, sans pourtant avoir des effets sur la consommation d'H₂ du méthanogène ou sur la production de CH₄.

Les acétogènes sont présents en grand nombre dans le rumen d'agneaux nouveau-nés avant l'établissement de la population méthanogène (Morvan et al., 1994), mais également dans le rumen d'ovins adultes recevant des rations pauvres en fourrage (Leedle and Greening, 1988). Mais, même en quantité importante, les souches acétogènes ne peuvent pas concurrencer les méthanogènes pour l'utilisation de l'H₂ dans des conditions normales (Lopez et al., 1999). De plus, uniquement deux des six souches acétogènes testées *in vitro* par Lopez et al., (1999) ont eu un effet négatif sur la production de CH₄ (-15 % en 24h).

Pour obtenir des réductions satisfaisantes de la méthanogénèse, il faudrait parallèlement inhiber les méthanogènes et stimuler les acétogènes (Nollet et al., 1997; Nollet et al., 1998; Lopez et al., 1999). Nollet et al., (1998) ont montré que le surnageant sans

440 cellules d'une bactérie lactique (*Lactobacillus plantarum* 80) comporte des composés toxiques pour les *Archaea*. Par conséquence, les auteurs ont observé l'accumulation d'H dans la phase gazeuse. Une réorientation de la fermentation vers la production d'AGV réduits (propionate et butyrate) aurait pu être attendue, mais en réalité c'est l'acétogénèse réductrice qui a été stimulée. L'effet a été encore plus marqué en ajoutant une souche acétogène
 445 (*Peptostreptococcus productus* ATCC35244) qui a réduit la concentration d'H₂ au même point que les méthanogènes (Nollet et al., 1998). Cependant, l'ajout d'acétogène seul, n'a pas eu d'effet ni sur les AGV, ni sur la production de CH₄ ou le nombre d'*Archaea*. L'utilisation de l'acide bromoéthansulfonique provoque une inhibition de la méthanogénèse et l'accumulation d'H *in vitro* ; si des souches acétogènes sont ajoutées parallèlement, la
 450 concentration en acétate augmente en diminuant la production d'H (Lopez et al., 1999).

L'utilisation *in vivo* du surnageant de *L. plantarum* 80 combiné avec l'acétogène *P. productus* n'a pas donné les mêmes résultats qu'*in vitro*. La production de CH₄ a été baissée les trois premiers jours après l'administration, de plus de 80%, mais est revenue à l'état initial très rapidement (Nollet et al., 1998). Les composés anti-méthanogènes contenus dans le
 455 surnageant ont probablement été métabolisés dans le rumen ou les *Archaea* se sont rapidement adaptées. De plus, la souche acétogène *P. productus* n'a pas pu s'installer dans l'écosystème ruminal à cause de l'activité prédatrice des protozoaires ou à cause de bactéries autochtones antagonistes (Nollet et al., 1998).

Les **acides organiques** tels le fumarate et le malate sont des intermédiaires importants
 460 dans la production de propionate : le malate est déshydraté en fumarate qui est réduit en succinate en utilisant l'H₂ métabolique ; le succinate est décarboxylé en propionate. L'introduction *in vitro* de ce nouveau puits à l'H₂ diminue la méthanogénèse en stimulant la production d'AGV, en particulier du propionate menant à baisser le ratio molaire acétate : propionate (Asanuma et al., 1999; Newbold et al., 2005). Cependant, l'affinité des
 465 méthanogènes pour l'H₂ est plus élevée que celle des bactéries réductrices de fumarate, ce qui suggère que pour que l'effet sur la méthanogénèse soit significatif, l'abondance relative de ces bactéries doit être largement supérieure à celle des méthanogènes (Asanuma et al., 1999). A l'inverse, l'affinité des réducteurs de fumarate pour le formate en tant que donneur d'électrons est plus élevée que celle des *Archaea*. La méthanogénèse pourrait être réduite efficacement en
 470 combinant le fumarate avec du formate *in vivo* (Asanuma et al., 1999).

L'utilisation de fumarate paraît prometteuse en théorie, étant donné que stoechiométriquement la conversion d'une mole de fumarate en propionate consumerait une

mole d'équivalents réducteurs (H_2), et diminuerait la production de CH_4 de 0.25 moles (4 moles d' H_2 sont utilisées pour réduire le CO_2 en CH_4). En pratique, la production de CH_4 *in vitro* diminue uniquement de 0.037 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ de fumarate ajouté (Ungerfeld et al., 2007). En effet une partie du fumarate est utilisé pour produire de l'acétate en libérant 2 moles d' H_2 métabolique, ce qui contrebalance leur incorporation dans la production de propionate. Les résultats *in vivo* sont encore moins concluants. Les émissions de CH_4 ont diminué, n'ont pas changé ou ont augmenté avec l'ajout de fumarate (revue de Ungerfeld et al., (2007)). Le calcul fait par Newbold et al., (2005) a montré que théoriquement pour réduire de 10% les émissions journalières de CH_4 d'une vache laitière (estimées à 500 l/j), l'animal devrait ingérer 1.4 kg/jour de fumarate di-sodique. De plus, à notre connaissance, il n'y a pas d'étude publiée sur les effets de la supplémentation des rations avec du fumarate sur l'écosystème microbien *in vivo*. Il serait intéressant de voir si les bactéries réductrices de fumarate réussissent à long terme à prendre le dessus sur les méthanogènes dans le cadre d'un apport de fumarate seul; mais également dans le cas d'apport combiné fumarate/formate, de contrôler s'il n'y a pas un changement dans la population méthanogène essentiellement hydrogénotrophe dans les conditions normales vers une population préférentiellement utilisatrice de formate.

L'utilisation des puits alternatifs d'hydrogène, tels les acides organiques, présentent l'avantage de dévier l'H de la production de CH_4 vers des produits bénéfiques pour l'animal hôte, en augmentant ainsi la valeur énergétique de la ration. Cependant, leur optimisation et effets à long terme nécessite encore des recherches.

490

Inhibition spécifique des méthanogènes

La vaccination des animaux contre les méthanogènes permettra de diminuer la production de CH_4 sans altérer la digestion, la performance animale ou la qualité des produits (Wright et al., 2004b). Il s'agit d'une stimulation du système immunitaire de l'animal afin de produire des anticorps anti-méthanogènes qui via la salive rejoindront le rumen où ils inhiberont les *Archaea*. Parmi les trois vaccins formulés à ce jour (Wright et al., 2004b; Williams et al., 2009), un seul a réussi à baisser les émissions de CH_4 de 8% (Wright et al., 2004b). Wright et al., (2004b) ont déterminé à postériori que le animaux traités avaient reçu un vaccin ne ciblant que 20% des espèces de méthanogènes présents dans le rumen; ils en ont conclu qu'en ciblant une plus grande proportion de la population, la diminution des émissions

500

de CH₄ serait plus importante. Ceci implique que la composition du vaccin est prédéterminée par la composition (espèce / souche) précise de la communauté méthanogène des animaux à traiter. Bien que les outils moléculaires actuels permettent une identification rapide des microorganismes, la diversité des populations, et en particulier celle des méthanogènes, est sujette à des fluctuations liées entre autre au régime alimentaire (Williams et al., 2009). Ceci rend la formulation d'un vaccin efficace laborieuse. L'élimination d'espèces ou souches de méthanogènes par les anticorps qui leur sont dirigés mène à la création des niches vacantes dans le rumen et la population méthanogène s'adapterait en sélectionnant des souches résistantes (Williams et al., (2009). Après l'administration du vaccin, le nombre total d'*Archaea* n'a pas été modifié alors qu'il aurait dû diminuer. En fait, les méthanogènes dominants avaient laissé la place à des nouveaux représentants de ce groupe métabolique (Williams et al., 2009). L'adaptation de la population méthanogène est un point important à prendre en compte afin de prévoir l'efficacité du vaccin à long terme. Egalement, la formulation d'un vaccin universel nécessite encore de recherches.

L'utilisation de **composés anti-méthanogènes (bromochlorométhane (BCM), bromoéthanesulfonate (BES), lumazine)** a des effets drastiques sur les *Archaea* du rumen en perturbant spécifiquement la méthanogenèse (Ungerfeld et al., 2004). L'ajout de BCM *in vitro* réduit la quantité de CH₄ produit de 30% des gaz totaux à des traces, en éliminant complètement la population méthanogène (Goel et al., 2009). Le BES réduit *in vitro* la quantité de CH₄ produit de 86% en réduisant de presque 10 fois le nombre des méthanogènes (Guo et al., 2007). Le taux de recouvrement de l'H₂ métabolique [(H₂ utilisé / H₂ produit) x 100] diminue d'environ 60% dans l'étude de Goel et al., (2009) et de 40% dans l'étude de Guo et al., (2007). Le calcul tient compte de l'incorporation de l'H₂ dans les AGV et le CH₄, mais pas de la partie utilisé dans la synthèse de la biomasse microbienne qui était améliorée avec l'ajout de BCM (Goel et al., 2009). Bien que ces inhibiteurs soient considérés comme spécifiques au méthanogènes, *in vitro* ils influencent aussi la microflore du fluide ruminal. La croissance de *Fibrobacter succinogenes* a été stimulée aussi bien par le BCM (+68%, P<0.05 (Goel et al., 2009)) que par le BES (+50%, P<0.05 (Guo et al., 2007)). *F. succinogenes* est le plus important producteur de propionate via la voie du succinate dans des régimes à base de foin (Moss et al., 2000). La prolifération de *F. succinogenes* peut s'expliquer par la disparition des méthanogènes, concurrents pour l'H métabolique qui devient toute de suite plus disponible pour la synthèse de propionate.

In vivo, l'ajout de BCM diminue de la production de CH₄ de 59%, et le nombre des *Archaea* méthanogènes de 34% (Denman et al., 2007). Cependant, le nombre des méthanogènes n'avait diminué significativement que 8 heures après la première administration journalière de l'inhibiteur et avait retrouvé sa valeur initiale 4 heures plus tard, alors que la baisse dans la méthanogenèse était retenue tout au long de la journée. Il est possible que l'additif ait eu plus d'effets bactériostatiques que bactéricides ou qu'il ait sélectionné des espèces moins efficaces dans la production de CH₄. Les membres de l'ordre des *Methanobacteriales* étaient prédominants (74%) dans la banque de clones construite avant l'administration de BCM et leur abondance n'était que 56% après l'administration de BCM. Les auteurs en concluent que les méthanogènes dominants ont été plus sensibles au BCM et d'autres ordres, moins sensibles, ont repris le dessus une fois la niche appauvrie (Denman et al., 2007). Le BCM inhibe une étape cobamide dépendante de la méthanogenèse ; il est possible que des voies non cobamide dépendantes existent dans le rumen ce qui mènerait probablement à la sélection de groupes particuliers de méthanogènes si la pression est maintenue à long terme. La sensibilité différentielle des méthanogènes aux inhibiteurs de la méthanogenèse a été démontrée avec des cultures pures de *Méthanobrevibacter ruminantium*, *Methanosarcina mazei* et *Methanomicrobium mobile* (Ungerfeld et al., 2004).

L'utilisation des inhibiteurs spécifiques des méthanogènes peut aboutir à la sélection de souche résistantes. De plus, dans l'écosystème complexe du rumen, ces composés chimiques peuvent être métabolisés par les autres espèces microbiennes. En effet, l'efficacité de certains inhibiteurs était meilleure dans des cultures pures de méthanogènes que dans des cultures mixtes de microorganismes du rumen.

Conclusion

La production de CH₄ est une voie métabolique essentielle assurant la continuité des fermentations ruminales. La thermodynamique des processus métaboliques intervenant dans la dégradation des aliments dans le rumen est fortement dépendante de la production et de l'utilisation de l'H métabolique. Dans le cas particulier de la méthanogenèse, l'absence de lien entre la production de CH₄ et le nombre de méthanogènes semble aujourd'hui établie, sauf dans les cas où des inhibiteurs spécifiques des *Archaea* sont employés (vaccin, additifs chimiques). Cette synthèse met en évidence que les variations dans la production de CH₄, observées dans les cas de modification d'un des constituants de la ration ou de l'écosystème

microbien, trouveront leur explication davantage dans les changements de diversité et/ou d'activité métabolique des *Archaea* en conséquence à une moindre disponibilité en H métabolique. La diversité des méthanogènes dans le rumen n'est pas encore entièrement connue, et des nouvelles séquences appartenant au phylum sans représentants clonés sont

565 trouvées dans pratiquement toutes les études. Bien qu'à priori très peu de genres soient présents dans le rumen, cette communauté se caractérise par un fort potentiel d'adaptation. Comme dans tout écosystème, les actions ciblant des microorganismes particuliers sollicitent inévitablement des réponses des autres populations présentes. C'est un point important à

570 considérer et qui souligne la nécessité d'évaluer toutes les stratégies pour réduire la production de CH₄ entérique sur le long terme et en considérant la communauté microbienne ruminale dans son ensemble.

575

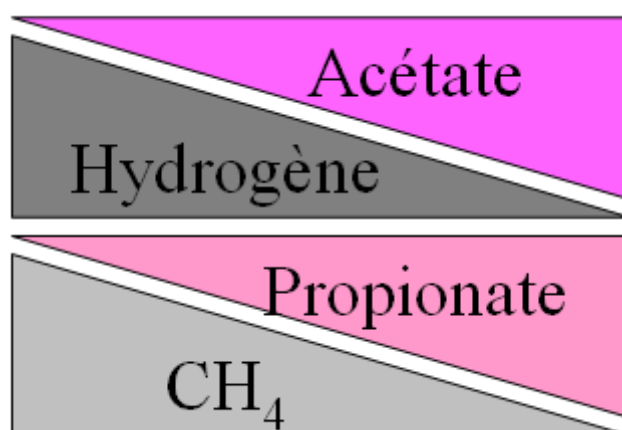


Figure 1 : Equilibre dynamique de l'utilisation et la production d'hydrogène dans le rumen (d'après Janssen 2010).

Rations alimentaires		Effet	Remarques	Référence
Fibres	Amidon + lipides			
<i>log (copies mcrA / g MS)</i>				
9.02	9.07	= (P>0.05)	- 26% CH ₄ /j avec la ration « amidon + lipides »	Popova <i>et al.</i> , 2011
74% paille d'avoine	28% d'avoine et 58% d'orge			
<i>copies rrs Archaea / ml contenu ruminal</i>				
2.12 x 10 ⁷	2.15 x 10 ⁷	= (P>0.96)	Animaux "efficaces" dans l'utilisation de la ration	Zhou <i>et al.</i> , 2010
2.52 x 10 ⁷	2.18 x 10 ⁷	= (P>0.76)	Animaux "inefficaces" dans l'utilisation de la ration	Zhou <i>et al.</i> , 2010
pauvre en concentré	riche en concentré			
<i>cellules / g contenu ruminal</i>				
4 x 10 ⁸	8 x 10 ⁸	NA		Leedle <i>et al.</i> , 1988
Manioc (75%)	Maïs (75%)			
<i>copies rrs Archaea / ml</i>				
1.55 x 10 ⁸	4.46 x 10 ⁸	+ 65% (P<0.05)	Rations supplémentées avec 15 g/kg MS urée	Wanapat <i>et al.</i> , 2009
7.26 x 10 ⁷	2.40 x 10 ⁸	+ 70% (P<0.05)	Rations supplémentées avec 30 g/kg MS urée	Wanapat <i>et al.</i> , 2009
Témoin	+ Huile de raifort			
<i>log (cellules / ml contenu ruminal)</i>				
8.6	6.9	-24.4 (P<0.05)	-23% CH ₄ /j kg MSI avec la ration supplémentée avec l'huile de raifort	Mohammed <i>et al.</i> , 2004
Témoin	+ Huile de soja			
<i>rrs Archaea en % de rrs Bactérien</i>				
0.34	0.20	-70% (P<0.05)	-13.9% CH ₄ L/ kg MSI avec la ration supplémentée avec l'huile de soja	Mao <i>et al.</i> , 2010

580

Tableau 1 : Effets de la composition de la ration alimentaire sur la concentration des *Archaea* méthanogènes du rumen. Les différents modes d'expression de la concentration microbienne sont indiqués en *italique* au dessus des valeurs numériques pour chaque étude. Quand la production de méthane a été mesurée, les résultats sont indiqués dans la colonne « Remarques ». Toutes les études ont été réalisées *in vivo* sur des bovins, à l'exception de celle de Mao *et al.*, 2010 qui a été réalisée sur des agneaux en croissance.
NA : information non disponible dans la publication

Ration	Gene ciblé	No de bandes	Espèces identifiées	Référence
Foin	<i>rrs</i>	6 à 8	<i>Métanobrevibacter spp.</i>	Ouwkerk <i>et al.</i> , 2008
75% orge		1 à 4	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	
Fibres	<i>mcrA</i>	19	NA	Popova <i>et al.</i> , 2011
Amidon + lipides		14		
74% paille d'avoine	<i>rrs</i>	24	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> NT7	Zhou <i>et al.</i> , 2010
28% d'avoine et 58% d'orge		22	<i>Methanobrevibacter smithii</i>	
			<i>Methanobrevibacter sp. AbM4</i>	
			<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> NT7	
Manioc (+15 ou 30 g/kg MS urée)	<i>rrs</i>	7	NA	Wanapat <i>et al.</i> , 2009
Maïs (+15 ou 30 g/kg MS urée)	7			

Tableau 2 : Effets de la composition de la ration alimentaire sur la diversité des *Archaea* méthanogènes du rumen. Toutes les études ont été réalisées *in vivo* sur des bovins.

NA : information non disponible dans la publication

Defaunation		Effet	Remarques	Référence
Avec protozoaires	Sans protozoaires			
<i>log (copies mcrA / g MSI)</i>				
9.90	10.95	+10% (P<0.05)	-20 % CH ₄ L/ kg MSI en absence de protozoaires	Mosoni <i>et al.</i> , (in press)
9.21	9.48	+3% (P<0.05)	-11 % CH ₄ L/ kg MSI en absence de protozoaires	Popova <i>et al.</i> , 2010
<i>cellules / ml contenu ruminal</i>				
1.23 x 10 ⁷	1.12 x 10 ⁶	-998 % (P<0.05)	Pas d'effet significatif sur la production de méthane	Takenaka <i>et al.</i> , 1995
2.31 x 10 ⁸	4.04 x 10 ⁸	= (P>0.05)		Machmüller <i>et al.</i> , 2003
Extraits de Plantes		Effet	Remarques	Référence
Ration Témoin	+ <i>S. rarak</i> s			
<i>µg ARN / ml contenu ruminal</i>				
3.12	2.61	-20% (P<0.05)		Wina <i>et al.</i> , 2005
Ration Témoin	+ Saponines de thé			
% <i>rrs Bacteria</i>				
0.34	0.36	= (P>0.05)	-27.7% CH ₄ L/ kg MSI	Mao <i>et al.</i> , 2010
Ration Témoin	+ Saponines			
% <i>rrs Bacteria</i>				
NA	NA	De -20 % à -78%	Carduus < Knautia < Fenugreek < Sesbania ²	Goel <i>et al.</i> , 2008b
Ration Témoin	+ HE¹			
<i>copies rrs Archaea / ng ADN génomique</i>				
NA	NA	= (P>0.05)		Ohene-Adjiei <i>et al.</i> , 2008

Tableau 3 : Effets de la defaunation et des extraits de plantes sur la concentration des *Archaea* méthanogènes du rumen. Les différents modes d'expression de la concentration microbienne sont indiqués en *italique* au dessus des valeurs numériques pour chaque étude. Quand la production de méthane a été mesurée, les résultats sont indiqués dans la colonne « Remarques ». Toutes les études ont été réalisées *in vivo*.

¹ HE : huiles essentielles

² Classement des différentes saponines utilisées dans l'étude en fonction de leur toxicité envers les *Archaea* méthanogènes

NA : information non disponible dans la publication

Références

- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., Kamra, D.N., 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology* 148, 321-327.
- Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K., Bayaru, E., 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science* 82, 245-248.
- Asanuma, N., Iwamoto, M., Hino, T., 1999. Effect of the Addition of Fumarate on Methane Production by Ruminal Microorganisms In Vitro. *Journal of Dairy Science* 82, 780-787.
- Balch, W.E., Fox, G.E., Magrum, L.J., Woese, C.R., Wolfe, R.S., 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 43, 260-296.
- Beauchemin, K.A., McAllister, T.A., McGinn, S.M., 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews* 4.
- Benchaar, C., McAllister, T.A., Chouinard, P.Y., 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *J Dairy Sci* 91, 4765-4777.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G., Gouet, P., 1995. In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 61, 3466-3467.
- Czerkawski, J.W. (Ed.), 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press (Oxford Oxfordshire and New York).
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 313-322.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., Kreuzer, M., 2001. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology* 32, 47-51.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livest. Prod. Sci.* 43, 97-110.
- Eugène, M., Archimède, H., Sauvant, D., 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 85, 81-97.
- Fonty, G., Joblin, K., Chavarot, M., Roux, R., Naylor, G., Michallon, F., 2007. Establishment and Development of Ruminal Hydrogenotrophs in Methanogen-Free Lambs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6391-6403.
- Garcia, J.-L., Patel, B.K.C., Ollivier, B., 2000. Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic Archaea. *Anaerobe* 6, 205-226.
- Gill, M., Smith, P., Wilkinson, J.M., 2010. Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *animal* 4, 323-333.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2008a. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology* 105, 770-777.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2008b. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology* 147, 72-89.

- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2009. Inhibition of methanogens by bromochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. *British Journal of Nutrition* 101, 1484-1492.
- Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., McSweeney, C.S., 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 47, 421-426.
- Guo, Y.Q., Liu, J.X., Zhu, W.Y., McSweeney, C., 2007. Shifts of rumen microbial population detected by real-time PCR when methanogenesis is inhibited. *Journal of Animal and Feed Sciences* 16, 107-112.
- Hegarty, R.S., 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research* 50, 1321-1328.
- Hess, H.D., Kreuzer, M., Díaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R., Machmüller, A., 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* 109, 79-94.
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Van Herk, F.H., Cheng, K.J., Newbold, C.J., Cheeke, P.R., 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J Anim Sci* 77, 2554-2563.
- Hsu, J.T., Fahey, G.C., Jr., Merchen, N.R., Mackie, R.I., 1991. Effects of defaunation and various nitrogen supplementation regimens on microbial numbers and activity in the rumen of sheep. *J. Anim Sci.* 69, 1279-1289.
- Hvelplund, T., 1991. Volatile fatty acids and protein production in the rumen, In: Jouany, J.P. (Ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, INRA, Paris, pp. 165-178.
- Janssen, P.H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology* 160, 1-22.
- Janssen, P.H., Kirs, M., 2008. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3619-3625.
- Jarvis, G.N., Strömpl, C., Burgess, D.M., Skillman, L.C., Moore, E.R.B., Joblin, K.N., 2000. Isolation and Identification of Ruminal Methanogens from Grazing Cattle. *Current Microbiology* 40, 327-332.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim Sci.* 73, 2483-2492.
- Jouany, J.-P., 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.* 7, 207-225.
- Jouany, J.-P., Thivend, P., 2008. La production de méthane d'origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatique. *Management & Avenir* 20, 259-274.
- Jouany, J.P., Morgavi, D.P., 2007. Use of "natural" products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *animal* 1, 1443-1466.
- Karnati, S.K.R., Yu, Z., Firkins, J.L., 2009. Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. II. Interaction of treatment and presence of protozoa on prokaryotic communities. *J. Dairy Sci.* 92, 3861-3873.
- Lana, R.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76, 2190-2196.
- Leedle, J.A., Greening, R.C., 1988. Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low-forage diets once daily. *Appl Environ Microbiol* 54, 502-506.
- Leng, R.A., Dellow, D., Waghorn, G., 1986. Dynamics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle fed on diets of freshly cut grass. *Br J Nutr* 56, 455-462.

- Lin, C., Raskin, L., Stahl, D.A., 1997. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 281-294.
- Liu, Y., Whitman, W.B., 2008. Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Ann N Y Acad Sci* 1125, 171-189.
- Lopez, S., McIntosh, F.M., Wallace, R.J., Newbold, C.J., 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* 78, 1-9.
- Machmüller, A., Soliva Carla, R., Michael, K., 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 41-55.
- Mackie, R.I., Bryant, M.P., 1994. Acetogenesis and the rumen: syntrophic relationships, In: Drake, H.L. (Ed.), *Acetogenesis*, Chapman and Hall, New York.
- Mao, H.-L., Wang, J.-K., Zhou, Y.-Y., Liu, J.-X., 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* 129, 56-62.
- Martin, C., Morgavi, D., Doreau, M., Jouany, J.P., 2006. Comment réduire la production de méthane chez les ruminants. *Fourrages* 187, 283-300.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351-365.
- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A., Newbold, C.J., 2003. Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5011-5014.
- Miller, T.L., Lin, C., 2002. Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woesei* sp. nov. and *Methanobrevibacter wolinii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 819-822.
- Miller, T.L., Wolin, M.J., 1985. *Methanospaera stadtmanniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives of Microbiology* 141, 116-122.
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z.A., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., Itabashi, H., 2004. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *J. Anim Sci.* 82, 1839-1846.
- Monforte-Briceno, G.E., Sandoval-Castro, C.A., Ramirez-Aviles, L., Capetillo Leal, C.M., 2005. Defaunating capacity of tropical fodder trees : Effects of polyethylene glycol and its relationship to in vitro gas production. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4, 1024-1036.
- Morgavi, D.P., Jouany, J.P., Martin, C., 2008. Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48, 69-72.
- Morgavi, D.P., Jouany, J.P., Martin, C., Ranilla, M.J., 2006. Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. *International Congress Series* 1293, 127-130.
- Morvan, B., Dore, J., Rieu-Lesme, F., Foucat, L., Fonty, G., Gouet, P., 1994. Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiol Lett* 117, 249-256.
- Mosoni, P., Martin, C., Forano, E., Morgavi, D.P., in press. Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science*.

- Moss, A.R., Jouany, J.-P., Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49, 231-253.
- Newbold, C.J., el Hassan, S.M., Wang, J., Ortega, M.E., Wallace, R.J., 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br J Nutr* 78, 237-249.
- Newbold, C.J., Lopez, S., Nelson, N., Ouda, J.O., Wallace, R.J., Moss, A.R., 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation in vitro. *Br J Nutr* 94, 27-35.
- Nollet, L., Demeyer, D., Verstraete, W., 1997. Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 194-200.
- Nollet, L., Mbanzamihigo, L., Demeyer, D., Verstraete, W., 1998. Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Animal Feed Science and Technology* 71, 49-66.
- Ohene-Adjei, S., Chaves, A.V., McAllister, T.A., Benchaar, C., Teather, R.M., Forster, R.J., 2008. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. *Microb Ecol* 56, 234-242.
- 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. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 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, 158-162.
- Patra, A., Saxena, J., 2009a. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek* 96, 363-375.
- Patra, A.K., 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2700-2708.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2009b. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews* 22, 204-219.
- Pelmont, J., 2005. Hydrogène - Acétate - Méthane, In: Sciences, E. (Ed.), *Biodégradation et métabolismes*, Grenoble.
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M.M., Doreau, M., Morgavi, D.P., 2011. Diet composition influences methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Animal Feed Science and Technology* in press.
- Popova, M., Martin, C., Rochette, Y., Graviou, D., Morgavi, D.P., 2010. Methane emissions and rumen methanogens in sheep harbouring or not protozoa, In: *Proc. of the 7th Joint Symposium RRI-INRA "Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems"*, Aberdeen, UK.
- Ranilla, M.J., Jouany, J.P., Morgavi, D.P., 2007. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 675-680.
- Sharp, R., Ziemer, C.J., Stern, M.D., Stahl, D.A., 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* 26, 71-78.
- Smith, A.H., Zoetendal, E., Mackie, R.I., 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb Ecol* 50, 197-205.

- Soliva, C.R., Hindrichsen, I.K., Meile, L., Kreuzer, M., Machmuller, A., 2003. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis in vitro. *Lett Appl Microbiol* 37, 35-39.
- Stumm, C.K., Gijzen, H.J., Vogels, G.D., 1982. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *Br. J. Nutr.* 47, 95.
- Takenaka, A., Itabashi, H., 1995. Changes in the population of some functional groups of rumen bacteria including methanogenic bacteria by changing the rumen ciliates in calves. *The Journal of General and Applied Microbiology* 41, 377-387.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., Sivakumarab, S., 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- Ungerfeld, E., Rust, S., Boone, D., Liu, Y., 2004. Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens*. *Journal of Applied Microbiology* 97, 520-526.
- Ungerfeld, E.M., Kohn, R.A., Wallace, R.J., Newbold, C.J., 2007. A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *J. Anim Sci.* 85, 2556-2563.
- Van Kessel, J.A.S., Russell, J.B., 1996. The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology* 20, 205-210.
- Weimer, P.J., 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim Sci.* 76, 3114-3122.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1997. The rumen protozoa, In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.), *The rumen microbial ecosystem*, Blackie Academic & Professional, London, pp. 73-139.
- Williams, Y.J., Popovski, S., Rea, S.M., Skillman, L.C., Toovey, A.F., Northwood, K.S., Wright, A.-D.G., 2009. A Vaccine Against Rumen Methanogens Can Alter The Composition Of Archaeal Populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, AEM.02453-02408.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2005. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 121, 159-174.
- Wright, A.-D., Ma, X., Obispo, N., 2008. *Methanobrevibacter* Phylotypes are the Dominant Methanogens in Sheep from Venezuela. *Microbial Ecology* 56, 390-394.
- Wright, A.-D.G., Auckland, C.H., Lynn, D.H., 2007. Molecular Diversity of Methanogens in Feedlot Cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4206-4210.
- Wright, A.-D.G., Toovey, A.F., Pimm, C.L., 2006. Molecular identification of methanogenic archaea from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel archaea. *Anaerobe* 12, 134-139.
- Wright, A.-D.G., Williams, A.J., Winder, B., Christophersen, C.T., Rodgers, S.L., Smith, K.D., 2004a. Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1263-1270.
- Wright, A.D.G., Kennedy, P., O'Neill, C.J., Toovey, A.F., Popovski, S., Rea, S.M., Pimm, C.L., Klein, L., 2004b. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* 22, 3976-3985.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y., Minato, H., 2000. Phylogenetic Analysis of Methanogens in Sheep Rumen Ecosystem and Detection of *Methanomicrobium mobile* by Fluorescence In Situ Hybridization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64, 1737-1742.

- Yu, Z., Garcia-Gonzalez, R., Schanbacher, F.L., Morrison, M., 2008. Evaluations of different hypervariable regions of archaeal 16S rRNA genes in profiling of methanogens by Archaea-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 74, 889-893.
- Zhang, C.M., Guo, Y.Q., Yuan, Z.P., Wu, Y.M., Wang, J.K., Liu, J.X., Zhu, W.Y., 2008. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora in vitro. *Animal Feed Science and Technology* In Press, Corrected Proof.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L.L., 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3776-3786.

*MATERIELS
&
METHODES*

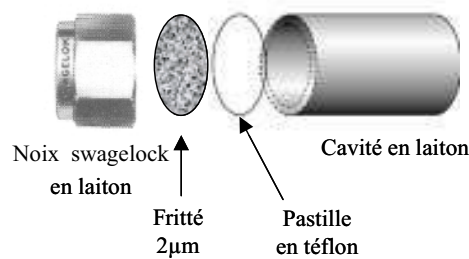


Figure 10 : Structure d'une capsule en laiton

(Rochette *et al.*, 2005)

Le principe de fabrication consiste à introduire une quantité précise de gaz SF_6 dans une capsule en laiton. Le gaz va diffuser à travers une membrane en téflon, dont l'épaisseur conditionne la vitesse de sortie du gaz.

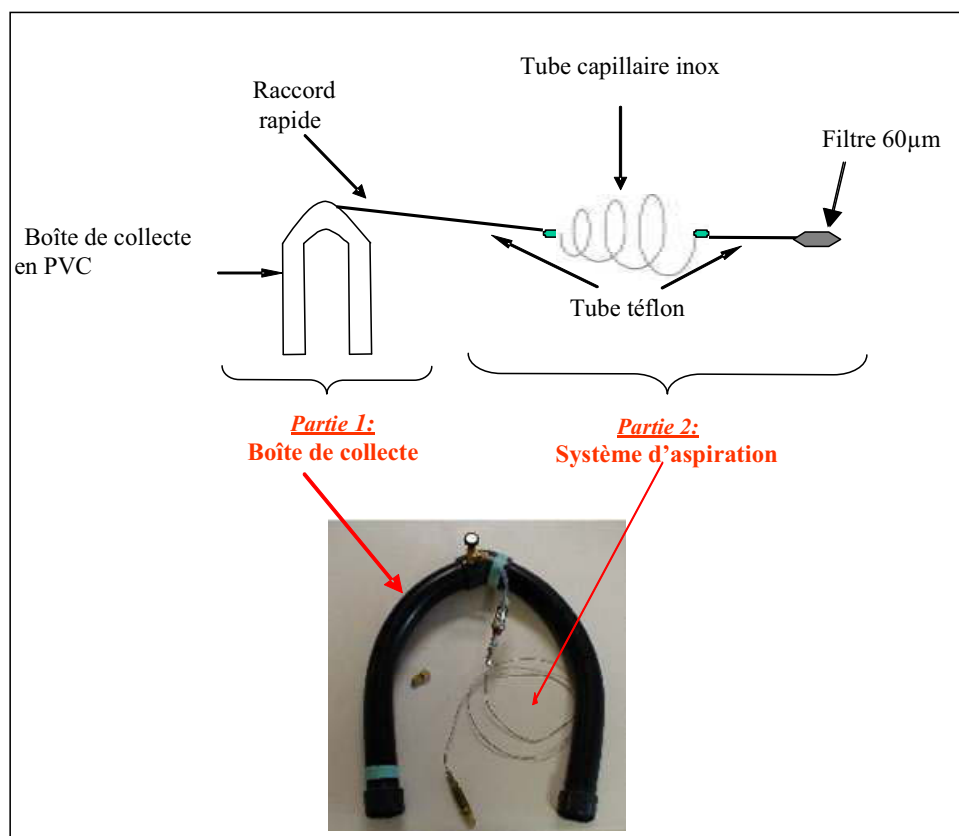


Figure 11 : Les différents composants du système de collecte des gaz

(Rochette *et al.*, 2005)

La boîte de collecte est maintenue au tour du cou de l'animal ; le tube capillaire en inox dont les dimensions sont 0.13mm de diamètre interne et 1.59mm de diamètre externe régulent le débit d'introduction des gaz dans la boîte ; le filtre situé à l'extrémité du tube capillaire (à proximité des naseaux) évite l'obstruction du capillaire par des particules alimentaires ou les mucosités nasales et salivaires

VII. MESURER LA PRODUCTION DE METHANE

Deux techniques sont principalement utilisées pour mesurer les productions de CH_4 par les ruminants : la technique des chambres respiratoires et la technique du gaz traceur hexafluorure de soufre (SF_6). La méthode de référence pour quantifier les émissions de CH_4 d'origine digestive chez le ruminant est la mesure réalisée en **chambre respiratoire**. L'avantage de cette technique est qu'elle permet une mesure directe des quantités de CH_4 produites par l'animal, ainsi que des quantités d'aliment ingéré ou les excréments. Par contre, les animaux sont isolés et attachés dans une enceinte hermétique pendant la période de mesure, et reçoivent une ration contrôlée dans sa composition et sa distribution. Cette situation est très différente de celle rencontrée dans la pratique surtout au pâturage, à la fois sur le plan du comportement animal et du choix des aliments par l'animal. D'autre part, elle permet de travailler sur un nombre d'animaux limité étant la lourdeur et le coût du système.

La technique retenue, dans l'équipe DIMA et au cours de cette thèse pour mesurer *in vivo* la production de gaz par les ruminants à l'auge ou au pâturage est celle de Johnson *et al.*, (1994). La technique du gaz traceur SF_6 repose sur le principe de la dilution d'un gaz traceur inerte introduit dans le rumen, capable de se mélanger aux autres gaz issus des fermentations (CH_4 , CO_2 ...) (Annexe 6).

VII.1. Principe de la technique du gaz traceur SF_6

Le gaz traceur SF_6 est introduit dans le rumen à l'aide d'une capsule perméable (Figure 10), dont la vitesse de diffusion (SF_6 en g/j) est préalablement déterminée *in vitro* (Johnson *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2008b).

Deux systèmes d'échantillonnage des gaz ont été développés au laboratoire : la **boîte de collecte** et la **canule à gaz**.

La collecte des gaz est réalisée grâce à un système d'aspiration fixé sur un licol adapté à la tête de l'animal, et relié à une boîte (mise en dépression) (Annexe 6). Ce dispositif est utilisé pour prélever des échantillons des gaz expirés ou éructés par l'animal (Figure 11). La boîte de collecte des gaz est mise sous vide (-1 atm) à l'aide d'une pompe à vide, puis elle est fermée avant d'être posée sur l'animal. A l'ouverture du robinet, la force d'aspiration exercée par le vide interne de la boîte, associée à la force de rétention liée au passage dans le capillaire, permet une aspiration régulière et linéaire des gaz. L'échantillonnage doit être représentatif des gaz éructés par l'animal sur une période préalablement définie par

l'expérimentateur (généralement 24h de prélèvement) et doit correspondre au remplissage de la moitié de la boîte en PVC (pression finale = 1/2 pression initiale) pour une vitesse de remplissage linéaire. L'ensemble du circuit de prélèvement ne doit pas présenter de fuites (Rochette *et al.*, 2005).

En fin de prélèvement gazeux, la boîte en PVC est fermée puis retirée du cou de l'animal. Avant analyse des gaz, la boîte est mise en surpression (environ + 1,2 atm) avec un gaz neutre de type Azote. La pression interne de la boîte est relevée avant et après addition d'azote afin de calculer le facteur de dilution. L'échantillon gazeux est en surpression dans la boîte, ce qui permet son injection directe dans le système chromatographique.

Le dispositif de la canule à gaz (Figure 12) permet de prélever des échantillons de gaz directement dans le rumen d'animaux canulés. La procédure est simple permettant d'obtenir des échantillons non contaminés par l'air ambiant. Des échantillonnages fréquents (par minute) peuvent être obtenus, permettant ainsi les études en cinétiques de la composition des gaz du rumen sans perturber les animaux (Jouany & Senaud, 1979).

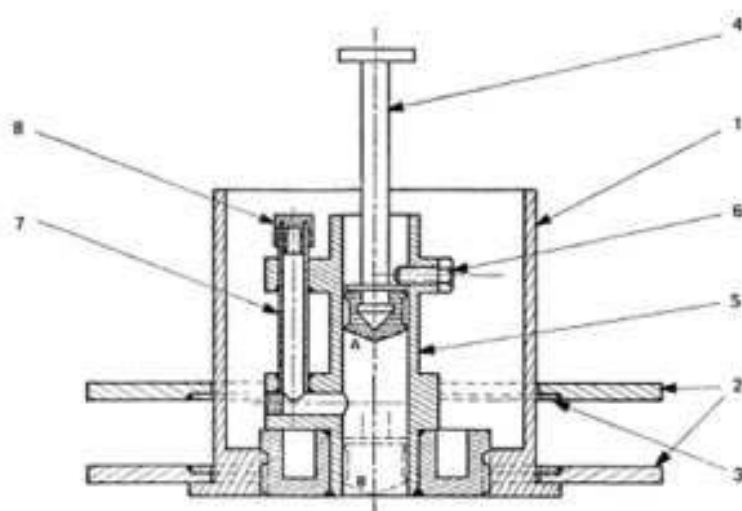


Figure 12 : Les différentes parties d'une canule à gaz

(Jouany & Senaud, 1979)

1 corps de la canule ; 2 rondelles d'étanchéité souples ; 3 armature rigide des rondelles d'étanchéité ; 4 piston muni d'un joint d'étanchéité en caoutchouc à son extrémité ; 5 bouchon de la canule ; 6 vis de butée fin de course du piston, 7 tube de prélèvement, 8 capsule en latex

Au moment du prélèvement, on appuie sur le corps de la canule de manière à éloigner le contenu du rumen alors que le piston (4) est en position B (Figure 12). On tire ensuite sur le corps de la canule en amenant le piston en position A. Le conduit (7)

communiqué ainsi avec l'intérieur du rumen. Il suffit alors de prélever les gaz à travers la capsule en latex, à l'aide d'une seringue graduée, munie d'un robinet à deux voies placé entre le corps de la seringue et l'aiguille. Le piston (4) est ensuite placé en position B jusqu'au prélèvement suivant, évitant ainsi le passage de contenu de rumen dans les conduits (5) et (7). Les gaz contenus dans la seringue sont transférés immédiatement dans des tubes de Balch dans lesquels le vide a préalablement été fait et transportés au laboratoire.

Les échantillons de gaz du rumen sont ensuite dilués par un système de seringues pour correspondre aux limites de détection de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse. Ces dilutions sont faites « à l'œil » en utilisant comme seul outil de mesure les graduations de la seringue. Au cours de nos expériences, nous nous sommes rendu compte que les valeurs absolues obtenues peuvent biaiser les résultats sur la production réelle de CH₄, à cause de fuites (les canules ruminales et les seringues ne sont pas étanches) ou des dilutions pas précises. Néanmoins, cette technique nous a permis de suivre la cinétique de la production de CH₄ dans le rumen sur une période de 12h (Expérimentation 1).

VII.2. Analyse des gaz

Les gaz (SF₆ et CH₄) sont mesurés par **Chromatographie en Phase Gazeuse** (CPG). La détermination de la concentration de ces deux gaz est obtenue à partir d'échantillons étalons de SF₆ et de CH₄ de concentrations connues qui sont injectés dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser (Rochette *et al.*, 2005).

Pour l'analyse de CH₄, le système CPG est constitué d'une boucle d'échantillonnage de 1 ml, d'une colonne remplie de phase PorapaK N et d'un détecteur à ionisation de flamme. Le flux d'hélium, utilisé en tant que gaz vecteur est de l'ordre 30ml/mn. Le four est maintenu à 60°C et le bloc détecteur à 200°C (Rochette *et al.*, 2005). Le SF₆ est mesuré en utilisant un chromatographe équipé d'un détecteur à capture d'électrons. L'échantillon est injecté dans l'appareil *via* une boucle d'échantillonnage de 1 ml. On utilise une colonne remplie de phase Moléculaire Sieve 5A (40-60 mesh) maintenue dans le four en isothermie à 50°C. La température du bloc détecteur est de 275°C et le flux de gaz vecteur (Azote) est voisin de 30 ml/mn (Rochette *et al.*, 2005).

Une fois les concentrations des gaz SF₆ et CH₄ dans l'échantillon prélevé déterminées, en connaissant la vitesse de diffusion du SF₆ de la capsule, on en déduit la vitesse de production de CH₄ :

$$\text{CH}_4 \text{ (l/j)} = \text{Vit. SF}_6 \times \frac{[\text{CH}_4]}{[\text{SF}_6]}$$

Cette technique permet de réaliser des mesures individuelles de la production de CH₄ par des animaux à l'auge ou au pâturage. La méthode est relativement peu coûteuse, hors mis le prix d'achat de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse.

Une des limites de la technique est le fait qu'uniquement les gaz expirés ou éructés sont échantillonnés. L'étude de Murray *et al.*, (Murray *et al.*, 1976) a cependant montré que le CH₄ éliminé par les flatulences constitue qu'1% des émissions totales.

Des comparaisons directes des bilans de CH₄ émis par les mêmes animaux avec les deux techniques (SF₆ vs. chambres respiratoires) ont fait l'objet de plusieurs essais et ont permis de valider la technique du gaz traceur (Grainger *et al.*, 2007b; Johnson *et al.*, 1994). Cependant, les résultats d'autres études suggèrent d'employer plus d'animaux pour mesurer les émissions de CH₄ avec la technique du traceur qu'avec les chambres respiratoires si l'on veut atténuer la variation d'un animal à l'autre (Boadi *et al.*, 2002).

Une des principales sources de variations avec la technique du SF₆ est la capsule contenant ce gaz traceur. Il a été montré que la mesure des émissions de CH₄ chez les ruminants peut être influencée par la vitesse de diffusion de SF₆ (Pinares-Patino *et al.*, 2008). La corrélation entre la concentration de CH₄ dans les gaz du rumen et dans les gaz expirés/éructés était meilleure avec des capsules à faible taux de diffusion (1.577 mg/j) qu'avec des capsules à fort taux de diffusion (3.147 mg/j) (Martin *et al.*, 2010a). De plus de nouvelles études ont suggéré que le taux de diffusion de SF₆ diminue après un long passage dans le rumen. Ainsi les taux de diffusion des capsules ayant passé 9 jours dans le rumen de cerf élaphe correspondaient aux taux de diffusion obtenus lors de la calibration *in vitro*. En revanche, le taux de diffusion des capsules, était 16% et 27% plus bas pour des temps de séjour dans le rumen de respectivement 65 et 212 jours (Swainson *et al.*, 2010).

VIII. METHODES MOLECULAIRES POUR L'ETUDE DE L'ECOSYSTEME MICROBIEN DU RUMEN

VIII.1 La notion d'écosystème microbien

Les micro-organismes dans l'environnement sont généralement organisés dans plusieurs niveaux d'organisation hiérarchique. Du plus simple au plus complexe il s'agit de : individus, populations (regroupement d'individus phylogénétiquement liés), guildes (populations liées métaboliquement), communautés (des guildes interagissant) et écosystèmes. Un écosystème microbien comprend la communauté microbienne, ses facteurs biotiques (des macro-

organismes comme des plantes et des animaux) et ses facteurs exogènes abiotiques (le pH, la température, des substances nutritives inorganiques et organiques, etc.) (Xu, 2006).

VIII.2 La notion de marqueur moléculaire

La phylogénie moléculaire est aujourd'hui le moyen de référence pour décrire la diversité microbienne; elle utilise les séquences de gènes qui peuvent identifier des organismes (Xu, 2006). Cette propriété est un concept important pour la biologie microbienne. Les microbiologistes ont très vite compris qu'il n'était pas possible de décrire et connaître tous les microorganismes uniquement en étudiant leurs propriétés morphologiques. Ils se sont très tôt tournés vers les propriétés métaboliques comme les substrats nutritionnels (sources de carbone, d'azote et d'énergie). Ainsi, la taxonomie microbienne a accumulé un grand nombre de descriptions morphologiques et métaboliques à priori sans relation entre elles. De plus, le nombre des espèces microbiennes que l'on sait cultiver reste très restreint (1% à 10%) par rapport à la diversité globale estimée des procaryotes (Amann *et al.*, 1995).

La phylogénie moléculaire fournit aujourd'hui un outil objectif pour l'étude des liens de parenté entre les microorganismes (Xu, 2006). Le marqueur moléculaire est un fragment spécifique d'ADN qui peut être identifié au sein du génome entier. Contrairement aux marqueurs associés à des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou biochimiques, les marqueurs moléculaires révèlent directement les modifications du patrimoine génétique qu'ils se traduisent ou non par une modification phénotypique, physiologique ou biochimique. Ces marqueurs moléculaires sont donc des indicateurs neutres de variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre famille, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus.

Les marqueurs moléculaires les plus fréquemment utilisés et qui ont servi de base dans les classements phylogénétiques des microorganismes procaryotes sont les gènes codant pour les ARN 16S et 23S de la petite et grande sous-unité ribosomales respectivement. La taille plus importante et la présence de structures secondaires particulièrement marquées dans l'ARNr 23S ont longtemps rendu son clonage et séquençage difficiles. Pour ces raisons, l'ARNr 16S (Figure 13) a été choisi comme index phylogénique et en particulier pour la phylogénie des procaryotes. Ceci a permis la construction de la plus grande banque de données actuelle avec un rythme d'accroissement supérieur à celui de toute autre molécule. Le gène *rrs* codant pour l'ARN 16S s'est imposé en tant que marqueur phylogénétique car (Case *et al.*, 2007):

- il est présent en une ou plusieurs copies mais chez **tous** les procaryotes et son homologue le gène de l'ARNr 18S est universellement présent chez les eucaryotes
- il présente des zones fortement **conservées** au sein de chacun des trois domaines de la vie
- il présente suffisamment de **variabilité** pour distinguer les espèces entre elles
- il est neutre, c'est-à-dire qu'il évolue de façon constante dans le temps en absence de pression de sélection ; de ce fait il permet non seulement de classer les microorganismes, mais également de comprendre leur évolution.

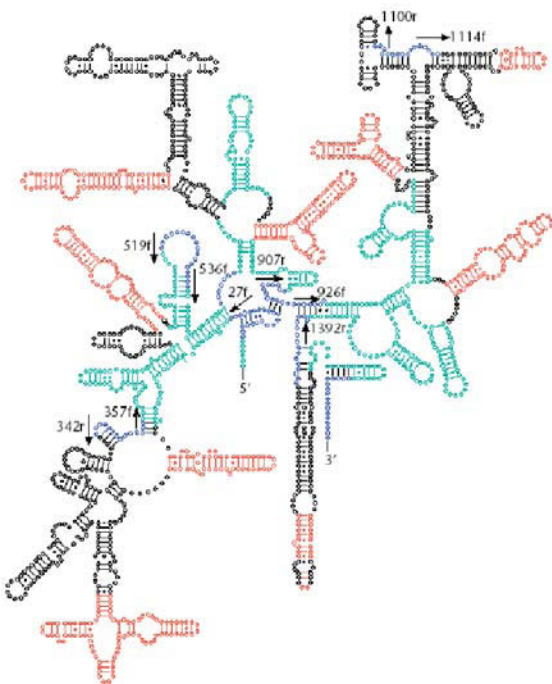


Figure 13 : Structure secondaire de la molécule de l'ARNr 16S

en bleu claire - régions conservées, en bleu foncé - régions hautement conservées et en rouge - régions hypervariables

D'un point de vue technique, le marqueur moléculaire doit comporter une région variable flanquée de part et d'autre de deux régions conservées. En effet, les régions conservées seront la cible d'hybridation des amorces utilisées dans la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction ou PCR). C'est les mutations accumulées dans la région variable qui permettront de distinguer les différentes espèces voire souches.

Le gène *rrs* présente toutefois quelques inconvénients : hétérogénéité dans le nombre et la séquence de ses copies au sein d'une même espèce et manque de variabilité entre espèces proches (Case *et al.*, 2007). Pour certaines bactéries aussi, le pouvoir pathogène est lié à la présence de gènes de virulence souvent portés par un plasmide de pathogénicité. Ce sont ces

gènes qu'il faudra alors cibler. En fonction des objectifs de l'étude, les informations obtenues en ciblant le *rrs* devraient être complétées par d'autres gènes. Les plus communément utilisés restent les gènes ubiquitaires et/ou domestiques (*rpoB*, *gapA*, *gyrA*) (Case *et al.*, 2007). Les informations recueillies permettent d'identifier phylogénétiquement l'organisme sans pourtant renseigner sur sa fonction au sein de l'écosystème. Les gènes impliqués dans les processus métaboliques permettent d'adopter une approche plus fonctionnelle. Ces cibles moléculaires sont le plus souvent spécifiques d'un groupe de microorganismes et ont donc généralement un pouvoir résolutif moindre, car soumis à une pression de sélection. Ces gènes permettent également de mettre en évidence une activité physiologique particulière, parfois différente entre des espèces proches phylogénétiquement, et permettent alors de résoudre des problèmes de diversité entre espèces proches (Brulc *et al.*, 2009; McSweeney *et al.*, 2009; Talbot *et al.*, 2008).

De plus la structure de la communauté microbienne déduite par l'analyse des séquences ADN génomique ne prend pas en compte la viabilité ou l'état métabolique des membres communautaires. L'analyse en utilisant les ARN est plus appropriée car permet d'observer les membres métaboliquement actifs d'une population, la quantité des ARNr totaux produits par une cellule étant directement reliée à la croissance cellulaire (Wagner, 1994). Les ARNm présentent l'avantage d'avoir une demi-vie plus courte que celle des ARNr, c'est-à-dire qu'ils sont détruits plus rapidement dès que la cellule n'en a plus besoin. Leur synthèse (et détection) sont la preuve concrète, sauf dans les cas de régulation post-transcriptionnelle, d'une activité métabolique précise.

VIII.3 Le gène fonctionnel *mcrA*

VIII.3.1. Marqueur phylogénétique

Comme discuté précédemment et illustré dans le Tableau 2 (Section IV.2, page 24), la voie métabolique de la méthanogenèse utilise un certain nombre d'enzymes et complexes enzymatiques uniques. Les gènes encodant la plupart parmi eux sont restreints au groupe monophylétique des *Archaea* méthanogènes (Baptiste *et al.*, 2005). Chez les hydrogénotrophes, l'expression de certaines de ces enzymes est régulée par l'abondance relative de l'hydrogène dans le milieu (Figure 14). Les exemples les plus illustratifs sont ceux des étapes 4 et 7 de la Figure 7 (Section IV.2, page 26).

L'étape 4 de la méthanogenèse est catalysée par une hydrogénase- F_{420} dépendante, la Mtd dont le gène *mtd* est présents chez tous les méthanogènes (Tableau 2, page 24).

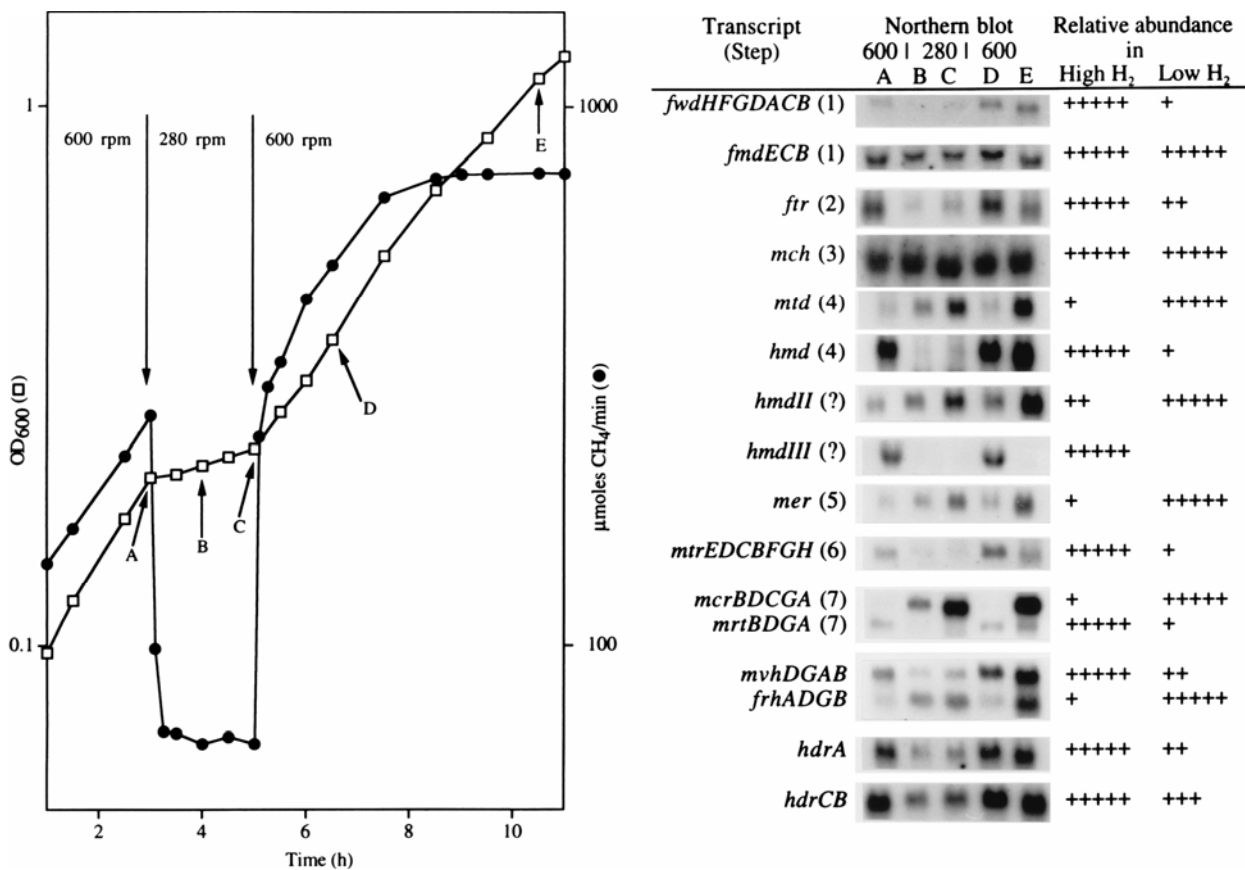


Figure 14 : Régulation par l'hydrogène de la transcription de gènes impliqués dans la méthanogenèse chez *M. thermoautotrophicum*

Le graphique montre la croissance cellulaire (□) et le taux de production de méthane (●) à 55°C dans 1.5 L de culture sous un flux de gaz (89% H₂ et 11% CO₂) à 200 ml/min. La vitesse d'agitation a été baissée à 280 rpm et puis remise à 600 rpm pour varier la disponibilité du substrat hydrogène. Les ARNm des gènes ciblés ont été isolés aux moments A, B, C, D et E indiqués par des flèches sur le graphique et hybridés en Northern blot avec des sondes spécifiques. Les numéros entre parenthèses après les noms des transcrits correspondent aux noms des étapes de la méthanogenèse (Figure 7, Section IV.2.). High H₂ et Low H₂ correspondent respectivement à une forte (agitation à 600 rpm) ou faible (agitation à 280 rpm) disponibilité de l'hydrogène. L'intensité des signaux d'hybridation reflètent le taux de détection des messagers (+ détectable, ++ faible, +++ moyen, +++++ fort) (Reeve *et al.*, 1997)

Certaines espèces possèdent en plus une autre déshydrogénase codée par le gène *hmd* qui ne nécessite pas le cofacteur. La Mtd est synthétisée en priorité par rapport à Hmd quand l'hydrogène est limitant, et c'est l'inverse quand il est abondant (Figure 14). En fait la forme réduite du cofacteur F₄₂₀ est indispensable dans d'autres étapes de la méthanogenèse d'où la nécessité qu'elle soit formé en permanence. Quand l'hydrogène est abondant, le flux d'électrons provenant de Hmd permet de maintenir un taux élevé de F₄₂₀H₂; si l'hydrogène est manquant, la déshydrogénase Mtd qui possède une plus forte affinité pour l'hydrogène assure la réduction du cofacteur (Pelmont, 2005; Reeve *et al.*, 1997).

De même, deux méthyle réductases (MCRI et MCRII), catalysant la dernière étape (n°7, Figure 7, Section IV.2, page 26) de la méthanogenèse ont été retrouvées codées par les gènes

mcr (opéron *mcrBDCGA*) et *mrt* (opéron *mrtBDGA*) (Thauer, 1998). Chez *M. thermoautotrophicus*, pendant la croissance exponentielle des cellules, c'est d'abord l'opéron *mrtBDGA* qui est transcrit et laisse ensuite la place au *mcrBDCGA*. La régulation se fait au niveau de l'initiation de la transcription (Pihl *et al.*, 1994). La densité cellulaire accrue après la phase exponentielle de croissance, diminue la disponibilité de l'hydrogène dont le taux reste constant. Ces résultats confirment donc les résultats d'hybridation présentés dans la Figure 14. Il semblerait que la MCRI est synthétisée quand l'hydrogène est peu abondant, dans le cas contraire, c'est la MCRII qui prendrait le relais. Cependant, les deux enzymes emploient les mêmes cofacteurs, alors la raison d'en avoir deux serait plus une affinité différentielle pour le substrat, différentes localisations intracellulaires ou interactions avec d'autres composants cellulaires (Reeve *et al.*, 1997). Ces remarques soutenues par une similarité maximale de 72% entre leur séquences protéiques suggèrent des différentes propriétés catalytiques de MCRI et MCRII (Reeve *et al.*, 1997). Toutes les *Archaea* méthanogènes possèdent au moins une méthyl-réductase, généralement la MCRI. La MCRII a été retrouvée chez certaines espèces de *Methanothermobacteriales* (*M. Thermoautotrophicus*, (Pihl *et al.*, 1994)) et de *Methanococcales* (Bult *et al.*, 1996), mais toujours en plus de MCRI.

```

351                                     400
Mc. voltae GGVGFTQYAT ASYTDILDD FSYYGYEYVE EKY.G...RGG ...TKA..T
Mc. vanniellii GGVGFTQYAT AAYTDDILDD FSYYALDYVE EKY.G...RNG ...TKA..T
Mt. fervidus GGVGFTQYAT ASYTDNILD PTYYGNEYVE DKY.G....G ...LAEPHD
Mbt.thermoauto GGVGFTQYAT AAYTDNILD PTYFGNEYVE DKY.....G ...LCEAPNT
Msr. barkeri GGVGFTQYAT AAYTDDILON NTYYDVYIN DRYNGAATWG RDNKYKA..S

401                                     450
Mc. voltae MDVVEDIASE VTLYALEQYD EYPALLEDHF GGSQRAAVAA AAAGISVC.M
Mc. vanniellii MDVVEDIASE VTLYSLEQYD EYPALLEDHF GGSQRAAVAA AASGIGVC.M
Mt. fervidus FDTILDVATE VTLYSLDQYE EYPTLMEDHF GGSQRAAIAA AASGCSTA.F
Mbt.thermoauto MDTVLDVASE VTFFGLEQYE EYPALLEDQF GGSQRAAVVA AASGCSTA.F
Msr. barkeri LEVVKDIATE STLYGIETYE KFTTALEDHF GGSQRATVLA AAAGVA.CSL

451                                     500
Mc. voltae ATCNSHAGVN GNYLSQILHK EYHERLGFYQ YDLQDQCGAS NSLAIRNDEA
Mc. vanniellii ATCNSHAGVN GNYLSQILHK EYHERLGFYQ YDLQDQCGAS NSLAIRNDES
Mt. fervidus AAGNAQAGLE GNYLSQILHN ECHARLGFYQ YDLQDQCGAA NTYSIRSDG
Mbt.thermoauto ATANAQTGLS GNYLSMYLHK ECHERLGFYQ YDLQDQCGAS NYPSIRSDG
Msr. barkeri ATGNANAGLE GNYLSMYLHK EAMGRLGFFQ YDLQDQCGAT NVLSYQGRG

501
Mc. voltae SPLELRGPNY PNYAMN
Mc. vanniellii APLELRGPNY PNYAMN
Mt. fervidus LPLELRGPNY PNYAMN
Mbt.thermoauto LPLELRGPNY PNYAMN
Msr. barkeri LPLELRGPNY PNYAMN

```

Figure 15 : Alignements des séquences protéiques partielles du gène *mcrA* de cinq espèces de méthanogènes

(Luton *et al.*, 2002)

Methanococcus (*Mc.*) *voltae* (X07793), *Methanococcus* (*Mc.*) *vanniellii* (M16893), *Methanothermobacter* (*Mt.*) *fervidus* (J03375), *Methanothermobacter* (*Mbt.*) *thermoautotrophicus* (U10036) et *Methanosarcina* (*Msr*) *barkeri* (Y00158). En gras, les régions conservées

Les *Archaeoglobales* possèdent la plupart des enzymes de la voie métabolique de la méthanogénèse (Tableau 2, Section IV.2 page 24), sauf les deux dernières (MCRI et MCRII). Ces microorganismes ne produisent pas de CH₄ et les enzymes de la méthanogénèse sont utilisées dans l'oxydation du lactate. La présence d'au moins une méthyle réductase (MCRI) caractérise donc la cellule en tant que méthanogène. Toutes les MCRI connues actuellement contiennent les trois sous-unités, α , β et γ codées par les gènes *mcrA*, *mcrB* et *mcrG* respectivement de l'opéron *mcrBDCGA*. C'est le gène *mcrA* qui a reçu le plus d'attention, étant très conservé chez les méthanogènes (Springer *et al.*, 1995). Un alignement des séquences protéiques partielles déduites des gènes *mcrA* provenant de 5 méthanogènes différents est présenté dans la Figure 15. L'alignement met en évidence des zones conservées utilisées pour le design des amorces, de part et d'autre d'une séquence plus variable (Luton *et al.*, 2002).

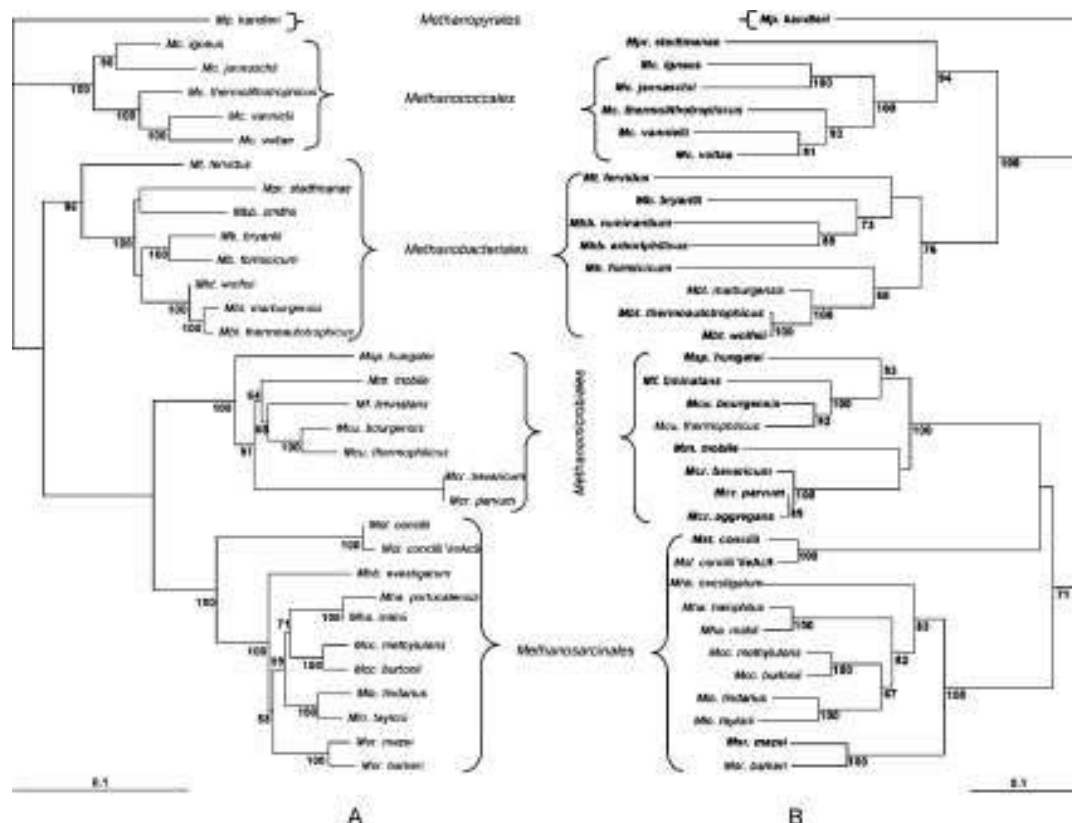


Figure 16 : Arbres phylogénétiques construits en utilisant les séquences des gènes *Archaeals rrs* (A) et *mcrA* (B)

(Luton *et al.*, 2002).

Les alignements ont été réalisés en utilisant la séquence presque entière (1532 pb) du gène *rrs* et les séquences partielles du gène *mcrA* (440 pb). *Methanopyrus kandleri* a été utilisé pour raciner les arbres. Les noms des genres ont été abrégés comme suit: Mb., *Methanobacterium*; Mbt., *Methanothermobacter*; Mbb., *Methanobrevibacter*; Mcc., *Methanococcoides*; Mc., *Methanococcus*; Mcr., *Methanocorpusculum*; Mcu., *Methanoculleus*; Mf., *Methanofollis*; Mhl., *Methanohalobium*; Mha., *Methanohalophilus*; Mlo., *Methanolobus*; Mm., *Methanomicrobium*; Mp., *Methanopyrus*; Mst., *Methanosaeta*; Msr., *Methanosarcina*; Mpr., *Methanosphaera*; Msp., *Methanospirillum*; Mt., *Methanothermus*

Springer *et al.*, (1995) ont annoncé des larges similitudes entre que les arbres phylogénétiques construits avec les séquences de *rrs* et les séquences partielles de *mcrA* dans la famille des *Methanosarcinaceae*. Luton *et al.*, (2002) ont extrapolé ces observations à tous les cinq ordres connus de méthanogènes (Figure 16). En effet, la comparaison plus approfondie au niveau du genre et même de l'espèce au sein des ordres a révélé une forte congruence entre les séquences *rrs* et *mcrA* (Luton *et al.*, 2002).

Le gène *mcrA* recueille donc toutes les propriétés nécessaires à son utilisation en tant que marqueur moléculaire de la communauté méthanogène (Friedrich & Jared, 2005; Lueders *et al.*, 2001; Luton *et al.*, 2002; Springer *et al.*, 1995).

VIII.3.2. Marqueur fonctionnel

L'opéron *mcrBDCGA* a été activement transcrit au cours de la phase exponentielle de croissance de *Methanococcus vannielii* et la demi-vie des transcrits était très courte (15 min) quand la croissance et donc la synthèse d'ARN ont été inhibées (Hennigan & Reeve, 1994). Pour cette raison, une approche moléculaire ciblant les séquences géniques *mcrA* et leur transcrits peut être utilisée pour explorer l'écologie des méthanogènes dans leur environnement. Watanabe *et al.*, (2009) ont conclu, basés sur des analyses ADN, que au cours de l'année la communauté méthanogène est stable dans le sol des rizières japonaises. L'analyse de diversité des séquences des transcrits *mcrA* a par contre révélé des shifts importants dans les membres métaboliquement actifs au cours de la même période. Presque toutes les *Archaea* méthanogènes dans les sols des rizières seraient donc tolérantes aux conditions défavorables causées par des changements environnementaux (l'inondation et le drainage ou l'été et l'hiver) en maintenant leurs métabolismes basaux pour survivre. **La méthanogenèse est sensible aux facteurs exogènes, aboutissant à la prédominance de membres spécifiques en fonction des conditions** (Watanabe *et al.*, 2009).

En plus de ces indications « qualitatives », le taux de transcription du gène *mcrA* peut fournir en plus des estimations quantitatives de l'activité méthanogène. Dans les tourbes, la production de méthane était positivement corrélée ($R^2 = 0.76$) avec le ratio transcrit *mcrA* / gène *mcrA* (Freitag & Prosser, 2009). Bien que la corrélation reste faible, le taux de transcription peut être utilisé en tant qu'indicateur des changements dans le processus méthanogène au sein d'environnements complexes.

La baisse dans l'expression du gène *mcrA* (déterminée via la méthode de $2^{-\Delta\Delta C_T}$, cf Section IX.2.2) a également était reliée à une baisse dans la production de CH_4 par des cultures mixtes de microorganismes du rumen (Guo *et al.*, 2008). *In vivo*, chez des chèvres,

l'expression du gène *mcrA* a présenté cependant des grandes variations entre les animaux (coefficients de variation de 67.7% et 28.5% en fonction de la ration luzerne et luzerne avec avoine respectivement) (Abecia *et al.*, 2010). De plus, les auteurs n'ont pas observé de lien entre la production de CH₄ et l'expression du gène fonctionnel. Ces résultats contradictoires, peuvent être expliqués par les différentes conditions expérimentales, et en particulier par les différentes méthodes utilisés pour quantifier la transcription de *mcrA*

VIII.4 La « démarche » moléculaire pour caractériser les méthanogènes du rumen

VIII.4.1 Prélèvement et stockage des échantillons

Bien que l'ADN bactérien ne soit pas protégé dans le noyau, comme c'est le cas dans les cellules eucaryotes, les risques de dégradation par les DNase extracellulaires sont minimales à cause de la rigide paroi bactérienne maintenant la cellule. En revanche, dès le prélèvement de l'échantillon biologique, des modifications du profil d'expression des gènes peuvent intervenir par dégradation spécifique et non spécifique des ARN et par induction transcriptionnelle. Différentes méthodes de stockage ont été développées : dans l'azote liquide, à -20°C ou -80°C avant l'extraction ; les meilleurs résultats ont été obtenus par lyophilisation (Sessitsch *et al.*, 2002). Toutefois, pour éviter les dégradations irréversibles et des analyses inexacts de l'expression des gènes, des solutions de stabilisation ont été développées par différents industriels. Ces réactifs, en perméabilisant rapidement les cellules, stabilisent immédiatement les ARN (RNAlater® Ambion et Qiagen pour les tissus et les cellules ; système Preamplix BD/Qiagen® pour le sang), ce qui permet d'obtenir un délai avant l'extraction. Les échantillons ainsi traités peuvent être conservés plusieurs jours à température ambiante (1 jour à 37 °C ; 7 jours à 18-25 °C) voire plusieurs semaines à - 20 °C ou - 80 °C (après 24 h à 4 °C) sans dommage pour les ARN (selon fiche technique RNALater® Ambion).

C'est la méthode choisie au cours de cette thèse. Après le prélèvement, le contenu ruminal a été rapidement broyé pour assurer des aliquots homogènes (phase liquide vs. phase solide). Les échantillons prélevés ont été immergés dans 2 fois leur volume de solution RNALater® Ambion, laissés pour la nuit à +4°C et transférés ensuite à -80°C.

VIII.4.2 Extraction des acides nucléiques

Les objectifs de cette thèse étaient de caractériser la population méthanogène du rumen par sa structure (nombres et diversité), mais aussi par son activité métabolique en ciblant

respectivement le gène *mcrA* et son ARNm. Aujourd'hui il est bien admis que la méthode utilisée pour extraire les acides nucléiques peut biaiser les analyses quantitatives et qualitatives (Feinstein *et al.*, 2009; Krause *et al.*, 2001; Schneegurt *et al.*, 2003; Sessitsch *et al.*, 2002; Zoetendal *et al.*, 2001). Un grand nombre de protocoles d'extraction d'ADN ou d'ARN à partir d'environnements complexes sont disponibles dans la littérature (Bera-Maillet *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2009; Krause *et al.*, 2001; Phongsisay *et al.*, 2007; Rodrigo *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 1991; Yu & Morrison, 2004) ; il y a également autant de kits commerciaux. Pour minimiser les variations dues à des extractions séparées, nous avons besoin d'un protocole de co-extraction simultanée d'ADN et d'ARN. Au cours de différents tests préliminaires réalisés, l'efficacité d'extraction de l'ADN était comparable entre les différents protocoles ; en revanche la quantité et la qualité des ARN extraits étaient sujettes à des importantes variations. Un protocole d'extraction des acides nucléiques totaux à partir des échantillons de contenu ruminal conservés dans du RNALater® à -80°C a été développé (Annexe 3) et a fait l'objet d'une publication méthodologique.

IMPROVED PROTOCOL FOR HIGH-QUALITY CO-EXTRACTION OF DNA AND RNA FROM RUMEN DIGESTA.

Popova, M. Martin, C. Morgavi, D. P
Folia Microbiologica (Praha) 55: 368-372.

Abstract

We report an improved method for total nucleic acids extraction from rumen content samples. The method employs bead beating, and phenol-chloroform extraction followed by saline-alcohol precipitation. Total nucleic acids and RNA yield and purity were assessed by spectrophotometric measurements; RNA integrity was estimated using Agilent RNA 6000 Nano Kit on an Agilent 2100 Bioanalyzer. The method provided total nucleic acids and RNA extracts of good quantity and quality. The extraction is not time consuming and it is valuable for ecological studies of rumen microbial community structure and gene expression.

DOI	10.1007/s12223-010-0060-3
ISSN :	1874-9356 (Electronic) 0015-5632 (Linking)

Improved Protocol for High-Quality Co-Extraction of DNA and RNA from Rumen Digesta

M. POPOVA, C. MARTIN, D.P. MORGAVI*

INRA Clermont-Ferrand – Theix, 63122 Saint Gènes Champanelle, France

Received 25 March 2010

Revised version 14 April 2010

ABSTRACT. We report an improved method for total nucleic acids extraction from rumen content samples. The method employs bead beating, and phenol–chloroform extraction followed by saline–alcohol precipitation. Total nucleic acids and RNA yield and purity were assessed by spectrophotometric measurements; RNA integrity was estimated using Agilent RNA 6000 Nano Kit on an Agilent 2100 Bioanalyzer. The method provided total nucleic acids and RNA extracts of good quantity and quality. The extraction is not time consuming and it is valuable for ecological studies of rumen microbial community structure and gene expression.

Similar to other environments, the rumen contains numerous microbial species that have not yet been cultured. In order to overcome culture limits, nucleic acid-based approaches have been applied to this ecosystem (Kobayashi *et al.* 2006). These approaches use DNA extracted from the rumen contents for downstream applications, such as cloning, PCR amplification and sequencing of target genes. Analyses based on genomic DNA do not take into account viability and metabolic state of microbes, while analyses based on RNA are directly correlated with growth activity (Wagner *et al.* 1994). RNA is unstable, which is probably the reason why only few have studied gene expression in the rumen (Bera-Maillet *et al.* 2009; Guo *et al.* 2008; Kang *et al.* 2009). Moreover, none of these studies compared gene abundance in DNA and RNA. Simultaneous DNA and RNA analysis should allow a better comprehension of the structure and dynamics of the microbial populations in the complex rumen ecosystem.

Here we describe a protocol for total nucleic acid extraction from rumen content that allows simultaneously obtaining of high quality DNA and RNA.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and extraction protocol. Rumen content samples were collected from wethers fitted with rumen cannulas. Samples were homogenized using a Polytron grinding mill at speed 5, for three times 1 min with 1-min stands in order to avoid sample heating; 0.5 g was transferred to a 2-mL Eppendorf tube in duplicate and mixed with 1 mL of RNALater® Tissu Collection: RNA Stabilization Solution (Applied Biosystems, USA). Tubes were kept at 4 °C overnight to allow the solution to penetrate through the cells as suggested by the manufacturer and stored at –80 °C for at least two weeks.

Prior to nucleic acid extraction, all solutions and glassware were rendered RNase-free by diethyl dicarbonate treatment, and only certified RNase- and DNase-free plasticware was used.

The detailed protocol for total nucleic acids extraction is described in Table I. Nucleic acids were extracted from 0.5 g (wet mass) of rumen digesta. RNALater solution was removed from the sample by phosphate-buffered saline (PBS) washing prior to extraction. Cell lysis was achieved by mechanical and chemical disruption using bead beating and hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) buffer (Griffiths *et al.* 2000). Precipitation of total nucleic acids was performed with ethanol (100 %) and sodium acetate overnight at –20 °C.

DNA digestion. The total nucleic acid sample was divided into two equal fractions named “DNA sample” and “RNA sample”. DNA in the “RNA sample” was digested by rDNase, RNase-free (from the Total RNA Isolation Kit, Macherey Nagel) as described in Table I.

Comparative studies. We tested three different protocols for total nucleic acids (Griffiths *et al.* 2000), DNA (Persoh *et al.* 2008) or RNA (Trizol method; Kang *et al.* 2009) extraction.

*Corresponding author; fax + (0)4 73 62 42 73, e-mail diego.morgavi@clermont.inra.fr.

Other DNA digestion protocols tested were RNase-Free DNase Set (*Qiagen*, Germany) and RQ1 RNase-Free DNase (*Promega*, USA). The comparative assessment of total nucleic acids yield and purity and RNA quality is discussed.

Table I. Improved protocol for co-extraction of DNA and RNA

I. Elimination of RNALater Solution
1. Centrifuge thawed samples at 7000 <i>g</i> for 10 min at 4 °C 2. Remove the clear part of the supernatant and note its volume (V_1); add V_1 of PBS 1× and centrifuge (7000 <i>g</i> , 10 min, 4 °C); repeat once.
II. Cell lysis
3. Transfer 0.5 g of sample into 2-mL screw-cap tube loaded with 0.8 g silica beads (0.5 mm diameter). 4. Add 0.5 mL of CTAB buffer and 0.5 mL of phenol–chloroform–3-methyl-1-butanol (25:24:1) mixture. 5. Homogenize on a Precellys two cycles of 30 s at speed 6200 with a 30 s interval between cycles; incubate on ice for 5 min. 6. Centrifuge at room temperature (13000 <i>g</i> , 15 min); transfer the supernatant to a new 2-mL Eppendorf® tube; note the volume (V_2). 7. Add V_2 of chloroform–3-methyl-1-butanol (24:1) mixture. 8. Centrifuge (13000 <i>g</i> , 15 min, 4 °C). 9. Repeat steps 7 to 8.
III. Nucleic acids precipitation
10. Transfer the supernatant to a new 2-mL Eppendorf® tube; note the volume (V_3). 11. Add 1/10 V_3 of 3 mol/L sodium acetate and 2 V_3 ethanol (100 %); leave at –20 °C overnight. 12. Centrifuge (16000 <i>g</i> , 45 min, 4 °C). 13. Remove the supernatant and wash the nucleic acid pellet with 70 % ethanol with DEPC treated water; air dry for 5 min; repeat washing and air drying at least once. 14. Dissolve the nucleic acid pellet in 100 µL Tris–EDTA buffer. 15. Divide the resuspended total nucleic acids in two equal parts: “DNA sample” and “RNA sample”.
IV. DNA digestion (NucleoSpin RNA I kit)
15. Load the silica membrane with 3 µg total nucleic acids from the RNA sample. 16. Spin (11000 <i>g</i> , 30 s, 4 °C). 17. Add 350 µL membrane desalting buffer (MDB) and spin (11000 <i>g</i> , 30 s, 4 °C). 18. Prepare DNase reaction mixture: for each sample 10 µL rDNase to 90 µL reaction buffer for rDNase; apply 95 µL DNase reaction mixture directly in the center of the silica membrane of the column. Incubate at room temperature for 1 h. 19. Add 200 µL RA2 buffer to the column and spin (11000 <i>g</i> , 30 s, 4 °C); place the column in a new collection tube. 20. Add 600 µL RA3 buffer to the column and spin (11000 <i>g</i> , 30 s, 4 °C); place the column in a new collection tube. 21. Add 250 µL RA3 buffer to the column and spin (11000 <i>g</i> , 30 s, 4 °C); place the column in a new collection tube. 22. Elute RNA in 30 µL RNase-free water and spin (11000 <i>g</i> , 1 min, 4 °C).

Polymerase chain reaction. PCR primers mcrA-f and mcrA-r (Luton *et al.* 2002) were used to amplify the *mcrA* gene of methanogenic *Archaea*. PCR amplifications were performed using MyCycler thermal Cycler (BioRad, USA) in 50 µL volume according to Luton *et al.* (2002).

Quantity and quality assessment. The yield and the purity of the extracted total nucleic acids and RNA alone were assessed by absorbance measurement using a NanoQuant Plate on an Infinity spectrophotometer (Tecan, Switzerland).

RNA quality was assessed using Agilent RNA 6000 Nano Kit on an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, USA).

RESULTS

Extraction protocol. Four extraction methods were compared using samples conserved in RNALater solution and stored at –80 °C. Table II shows the mean extraction yields and absorbance ratios. Our improved protocol recovered approximately 224 µg of total nucleic acids per g of rumen contents (wet mass), which represented 89, 50 and 61 % higher yield than the output obtained by the methods of Persöth *et al.* (2008), Griffiths *et al.* (2000) and Kang *et al.* (2009), respectively. The 260/280 and 230/280 absorbance ratios

obtained with our protocol were both close to 2, while the 230/260 ratio obtained with the other previously published protocols was <1.

Table II. Total nucleic acids yield (NA; µg/g wet mass) and purity (absorbance ratio)^a

Extraction method	Absorbance ratios		NA
	260/280	230/280	
Persôh <i>et al.</i> (2008)	1.54	0.96	23.85
Griffiths <i>et al.</i> (2000)	1.45	0.89	111.83
Kang <i>et al.</i> (2009)	1.81	0.47	86.99
Improved protocol	1.99	1.87	223.99

^aMeans of duplicates.

DNA digestion and RNA quality. Total nucleic acids extract was divided into two equal parts, and the “DNA sample” was directly used for PCR or qPCR amplification (Fig. 1). The co-extracted DNA in “RNA sample” was removed by digestion. The protocol of Persôh *et al.* (2008) recovered only low quantities of total nucleic acids and therefore was not used in further studies.



Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR products using as template extracted DNA (lanes 1–3) and RNA (4–6); M – low DNA mass ladder (Invitrogen).

Three commercial protocols for DNA digestion were tested: RNase-Free DNase Set (*Qiagen*, Germany), RQ1 RNase-Free DNase (*Promega*, USA), and rDNase from the kit Total RNA Isolation, NucleoSpin RNA II (*Macherey Nagel*, Germany). Yield and purity of the samples were similar independently of the method used to digest DNA (Table III). Complete DNA digestion was confirmed by the absence of PCR amplicon in the “RNA samples”, while a single PCR product of the expected size (464–491 bp) was generated when “DNA samples” were used as template for the amplification (Fig. 1).

The quality of the extracted RNA was analyzed with the *Agilent* RNA 6000 Nano Kit. Fig. 2 presents the electropherograms obtained for RNA extracted with the improved protocol with each DNase treatment. Two major peaks displayed in each electropherogram correspond to the 16S and 23S ribosomal RNA. The RNA Integrity Number (RIN) represents the general total RNA integrity (Schroeder *et al.* 2006). The indicators of RNA integrity are the RIN (maximum value 10), the 23S-to-16S ratio (expected value 2) and the absence of degradation (low baseline). Relatively high amount of low-molar-mass material is present after digestion with *Promega* DNase protocol. Marginally degraded RNA, detected as a noise between the 16S and the 23S peaks, and a smaller 23S than 16S

peak are observed with both *Promega* and *Qiagen* digestion methods. On-column digestion (rDNase *Macherey Nagel*) apparently improved RNA quality with higher RIN values, improved 23S-to-16S ratios and no background degradation was noted. The RNA quality indicators for the RNA extracted with the methods

Table III. Total RNA yield (µg/g wet mass) and purity (absorbance ratio)^a using three (*Qiagen*, *Promega*, *Macherey Nagel*) DNase treatments

Extraction method	DNase I (<i>Qiagen</i>)		RQ1 DNase (<i>Promega</i>)		rDNase (<i>Macherey Nagel</i>)	
	260/280	RNA yield	260/280	RNA yield	260/280	RNA yield
Griffiths <i>et al.</i> (2000)	1.98	20.0	1.98	20.5	2	16.0
Kang <i>et al.</i> (2009)	1.95	37.8	1.85	30.1	2	29.1
Improved protocol	1.99	38.0	1.99	36.4	2	34.9

^aMeans of 2 DNA digestions.

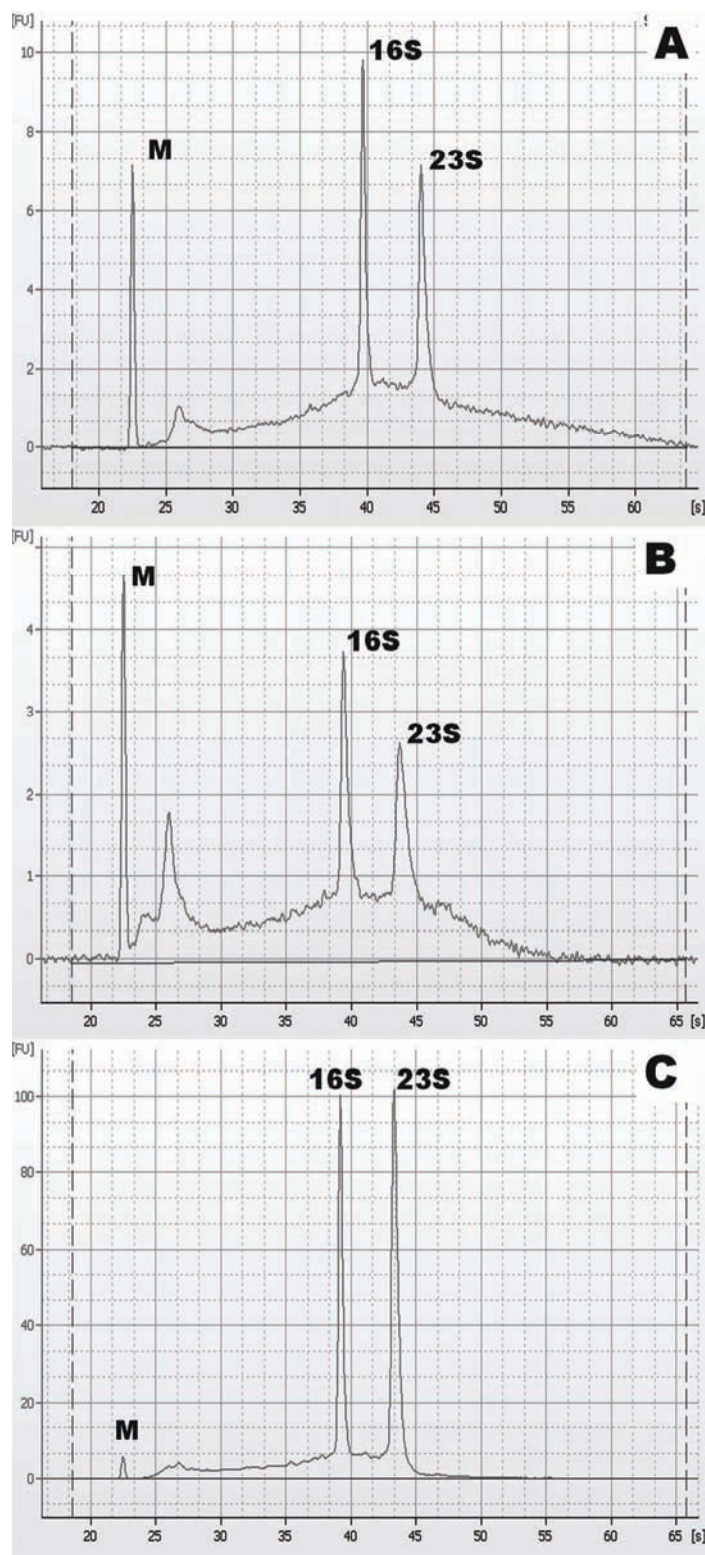


Fig. 2. Analysis of RNA integrity. Electropherograms were obtained using the RNA 6000 Nanolabchip and Agilent 2100 Bioanalyser. RNA samples were obtained with the improved protocol and three different procedures of DNA digestion. **A:** RNase-Free DNase Set (Qiagen) (RIN: 6.9, 23S/16S ratio: 0.8); **B:** RQ1 RNase-Free DNase (Promega) (RIN: 6.7, 23S/16S ratio: 0.9); **C:** rDNase, RNase-free (from the Total RNA Isolation Kit; Macherey Nagel) (RIN: 8.6, 23S/16S ratio: 1.4). Three main peaks correspond to the marker (M), 16S and 23S rRNA.

of Griffiths *et al.* (2000) and Kang *et al.* (2009) followed by the rDNase on-column digestion were 7.0 and 7.2, respectively. Both methods resulted in 23S-to-16S ratio 0.7 with relatively important noise between the two peaks (*data not shown*).

DISCUSSION

This study aimed at optimizing the total DNA and/or total RNA co-extraction from microbial content of the rumen ecosystem. While a large number of published methods or commercial kits for DNA or RNA extractions are available (Bera-Maillet *et al.* 2009; Griffiths *et al.* 2000; Kang *et al.* 2009; Persôh *et al.* 2008; Saleh-Lakha *et al.* 2005; Schneegurt *et al.* 2003), only few studies (Costa *et al.* 2004; Griffiths *et al.* 2000) reported protocols for total nucleic acids extraction from environmental samples. The chosen method for DNA extraction can have an important influence on the quantitative as well as the qualitative results of the study (Guardia *et al.* 2009). Therefore, for simultaneous study of microbial community structure and gene expression, DNA and/or RNA co-extraction seems to be indispensable. Yields of total nucleic acids and RNA alone obtained in this study were similar in all methods. However, only our improved protocol gave high purity total nucleic acids and RNA, as the absorbance ratios were always near 2. With the other protocols, the elimination of total salts, phenol and organic compounds was incomplete as the absorbance ratio 230/260 remained low. Adding a supplemental chloroform–3-methyl-1-butanol wash in our protocol allowed us to improve the purity of the extract. The saline–alcohol precipitation used has already been shown to give sufficient quantities and good quality RNA (Bera-Maillet *et al.* 2009).

Though the three digestion methods used in this study yielded similar quantities of RNA, the on-column DNA digestion gave better quality RNA. The optimum tempera-

ture for RQ1 RNase-Free DNase (*Promega*) was 37 °C (the enzyme is inactivated at 65 °C). RNase-Free DNase Set (*Qiagen*) can be used at room temperature but inactivation requires a heat shock at 65 °C. On-column digestion is performed at room temperature and the enzyme is chemically denatured and eluted. RNAs are fragile and heat shocks seriously affect extraction quality, as shown on the *Agilent*-generated electropherograms. Moreover, even if 260/280 absorbance ratios for RNA extracts obtained with the three digestion protocols were systematically close to 2, only on-column digestion produced a ratio equal to 2. As the enzyme is eluted from the column, the RNA sample is protein-free.

According to RNA yield and quality we recommend the improved protocol and the on-column DNA digestion for combined DNA/RNA studies on rumen content samples.

To our knowledge, this is the first report on the optimization of DNA/RNA co-extraction from rumen content samples with an additional evaluation of the RNA quality assessed by *Agilent* lab-on-a-chip technology.

The authors are grateful to the personnel of the *Experimental Unit Theix* for animal care and D. Graviou for technical help. The first author is the recipient of INRA–Région Auvergne PhD scholarship.

REFERENCES

- BERA-MAILLET C., MOSONI P., KWASIBORSKI A., SUAU F., RIBOT Y., FORANO E.: Development of a RT-qPCR method for the quantification of *Fibrobacter succinogenes* S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *J.Microbiol.Methods* **77**, 8–16 (2009).
- COSTA R., GOMES N.C.M., MILLING A., SMALLA K.: An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Brazilian J.Microbiol.* **35**, 230–234 (2004).
- GRIFFITHS R.I., WHITELEY A.S., O'DONNELL A.G., BAILEY M.J.: Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**, 5488–5491 (2000).
- GUARDIA S., FURET J.P., RECONQUILLAY F., JUIN H., LESSIRE M., LECONTE M., RIDEAUD P., MOREAU-VAUZELLE C., DUPONT C., GUILLOT J.F., IRÈNE G.: A comparison of two methods to extract bacterial DNA of the digestive tract, p. 39 in *6th International Symposium of Anaerobic Microbiology*, Liblice Chateau (Czech Republic) 2009.
- GUO Y.Q., LIU J.X., LU Y., ZHU W.Y., DENMAN S.E., MCSWEENEY C.S.: Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Lett.Appl.Microbiol.* **47**, 421–426 (2008).
- KANG S., DENMAN S.E., MORRISON M., YU Z., MCSWEENEY C.S.: An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction. *Curr.Microbiol.* **58**, 464–471 (2009).
- KOBAYASHI Y.: Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Anim.Sci.J.* **77**, 375–385 (2006).
- LUTON P.E., WAYNE J.M., SHARP R.J., RILEY P.W.: The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**, 3521–3530 (2002).
- PERSÔH D., THEUERL S., BUSCOT F., RAMBOLD G.: Towards a universally adaptable method for quantitative extraction of high-purity nucleic acids from soil. *J.Microbiol.Methods* **75**, 19–24 (2008).
- SALEH-LAKHA S., MILLER M., CAMPBELL R.G., SCHNEIDER K., ELAHIMANESH P., HART M.M., TREVORS J.T.: Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. *J.Microbiol.Methods* **63**, 1–19 (2005).
- SCHNEEGURT M., DORE S., KULPA C.J.: Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Curr.Issues Mol.Biol.* **5**, 1–8 (2003).
- SCHROEDER A., MUELLER O., STOCKER S., SALOWSKY R., LEIBER M., GASSMANN M., LIGHTFOOT S., MENZEL W., GRANZOW M., RAGG T.: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol.Biol.* **7**, 3 (2006).
- WAGNER R.: The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Arch.Microbiol.* **161**, 100–109 (1994).

VIII.4.1 Analyse des ARN

L'intégrité de molécules d'ARN a de l'importance primordiale pour des expériences qui essayent de refléter d'expression d'un gène au moment de l'extraction (Bera-Maillet *et al.*, 2009). Afin de vérifier la qualité de l'ARN après extraction, la technique la plus commune est la migration de l'échantillon sur gel d'agarose 1,2 % suivie d'une visualisation sous lumière UV. Les deux bandes d'ARN ribosomiaux (16S à ~1,5 kb et 23S à ~ 3 kb) doivent être présentes, vue que ces molécules constituent 80% des ARN dans la cellule. Si les ARN migrent sous la forme d'une trainée (*smear*) et que les deux bandes ne sont pas visibles, l'échantillon d'ARN a sans doute subi une dégradation majeure. L'évaluation de la qualité des ARN faite ainsi ne permet pas de comparaisons objectives entre échantillons. Jusqu'à récemment, il n'y avait aucune norme fiable pour évaluer l'intégrité des échantillons d'ARN et le ratio ARNr 23S : ARNr 16S. L'apparition de la séparation microcapillaire électrophoretique des ARN fournit la base pour une approche automatisée d'évaluation de l'intégrité des ARN entre échantillons d'une façon sans équivoque (Schroeder *et al.*, 2006).

Au cours de cette thèse, l'intégrité des ARN a été évaluée en électrophorèse capillaire en utilisant l'Agilent 2100 bioanalyzer et l'Agilent RNA 6000 Nano Kit. Les indicateurs de l'intégrité des ARN utilisés étaient le RIN (RNA Integrity Number, valeur maximale 10), le ratio ARNr 23S : ARNr 16S (valeur attendue 2) et l'absence de dégradation (basse ligne de base) (Bera-Maillet *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2006).

La reverse transcription des ARN a été réalisée avec des amorces hexanucléotidiques aléatoires en utilisant la reverse transcriptase AMV-RT de chez PROMEGA et suivant le protocole du fournisseur.

VIII.4.2 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La «Polymerase Chain Reaction» ou PCR est une technique de répllication ciblée *in vitro*. Imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel dès 1993), la technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988), d'une ADN polymérase résistante aux températures élevées (la Taq polymérase), qui permet son automatisation.

La PCR permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures. C'est, généralement suffisant pour une utilisation ultérieure. Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples (Figure 17). Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en œuvre deux amorces

oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. L'astuce consiste à utiliser les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes. Au lieu d'être linéaire, l'amplification obtenue est exponentielle.

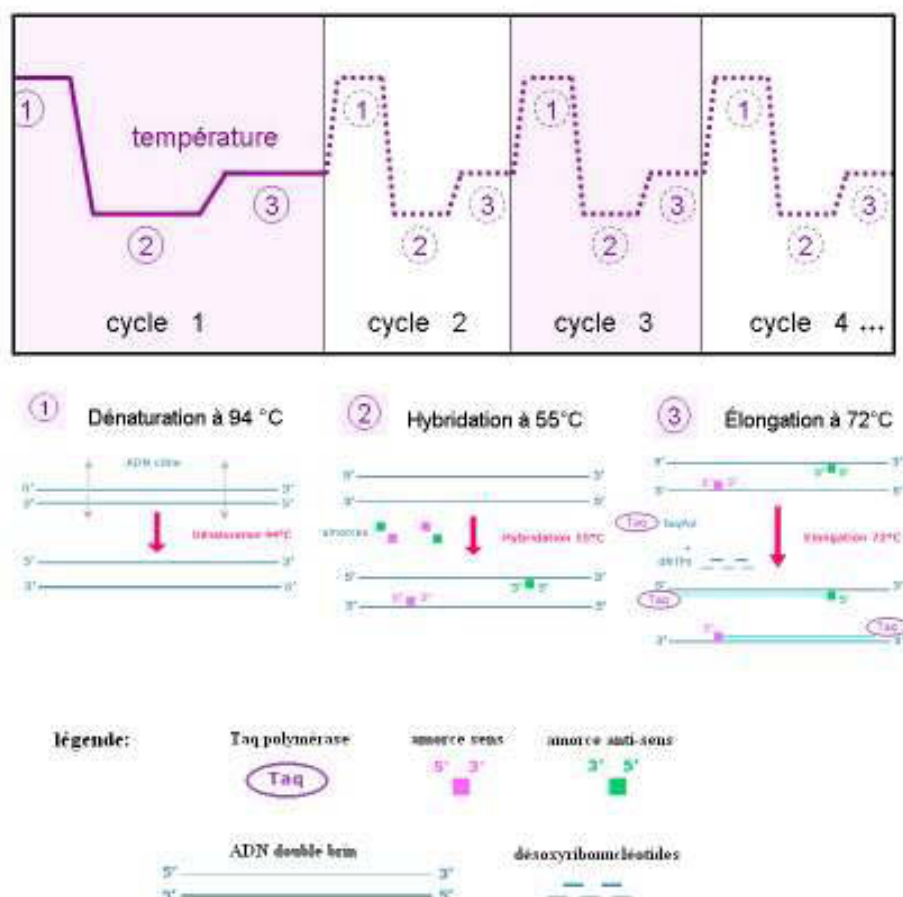


Figure 1 : Principe de la PCR

Trois étapes constituent un cycle de PCR : **1.** La dénaturation de l'ADN double brin (db), réalisée aux alentours de 94°C-96°C ; **2.** L'alignement des amorces à une température inférieure de 5°C environ par rapport à la T_m (température de fusion) des amorces ; **3.** l'élongation ou la polymérisation de nouveau brin ADN qui se déroule à 72°C, température optimale pour l'action de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée. Le cycle de trois étapes est répété de 25 à 35 fois en général. Au cours des répétitions l'évolution de l'amplification peut être représentée par une courbe à l'allure sigmoïde comprenant une phase exponentielle qui atteint un plateau où l'amplification ralentit à cause de l'épuisement des substrats (dNTPs et amorces).

Le choix des amorces est une étape cruciale de la PCR. Concernant les méthanogènes, les gènes *rrs* et *mcrA* ont tous les deux servis de marqueurs moléculaires de cette population ruminale (Denman *et al.*, 2007; Tatsuoka *et al.*, 2004; Wright & Pimm, 2003; Wright *et al.*, 2004a; Wright *et al.*, 2006)

Différentes études ont signalé les possibles biais qui peuvent être introduits par des amorces pas assez ou trop spécifiques. Parmi les études ciblant le *rrs* des *Archaea*, il y a celle de Skillman *et al.*, (2006a) qui ont remarqué qu'en fonction de la paire d'amorces utilisée les espèces de méthanogènes prédominantes dans le même échantillon n'étaient pas les mêmes. La paire 21f/958r amplifiait essentiellement des séquences de *M. stadtmanae*, alors que la paire Arch f364/Arc r1386 amplifiait préférentiellement les séquences affiliées aux *Methanobrevibacter* (Skillman *et al.*, 2006a). Aussi, après séquençage, des espèces apparentées au genre *Thermoplasma* (Wright *et al.*, 2006) ont été retrouvées. Dans cette dernière étude des amorces universelles *Archaea* ont été utilisées, suggérant que les *Archaea* du rumen ne sont pas essentiellement méthanogènes. Amorces universelles ciblant ce domaine phylogénétique (Met86F/Met915R) ont également été utilisés dans le travail de Zhou *et al.*, (2009) : parmi les 972 clones séquencés, 23 présentaient des espèces bactériennes.

La similarité entre les profils de biodiversité construits en utilisant le *rrs* et le *mcrA* a été démontré par Luton *et al.*, (2002) (Figure 16, Section VIII.3.1). Depuis, l'utilisation du gène fonctionnel a connu un essor considérable pour caractériser la population méthanogène de divers environnements : rizières (Lueders & Friedrich, 2000; Lueders *et al.*, 2001; Ramakrishnan *et al.*, 2001) , tourbières (Juottonen *et al.*, 2006), décharges (Luton *et al.*, 2002) et le rumen (Tatsuoka *et al.*, 2004).

Couple d'amorces	Séquence 5' → 3' ^a	Taille de l'amplicon	Dégénérescence ^b	Référence
<i>mcrA</i> de Luton	Amorce sens (32 nucléotides): GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC Amorce anti-sens (23 nucléotides): TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT	~ 414 – 438 pb	16 8	Luton <i>et al.</i> , (2002)
ME1 / ME2	Amorce sens ME1 (20 nucléotides): GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC Amorce anti-sens ME2 (21 nucléotides): TC ATK GCR TAG TTD GGR TAG T	~760 pb	24 24	Hales <i>et al.</i> , (1996)
MCRf / MCRr	Amorce sens MCRf (17 nucléotides): TAY GAY CAR ATH TGG YT Amorce anti-sens MCRr (17 nucléotides): ACR TTC ATN GCR TAR TT	~ 500 pb	48 32	Springer <i>et al.</i> , (1995)

Tableau 1 : Couples d'amorces pour l'amplification de fragments des gènes *mcrA* et *mrtA*

^a Les lettres en gras dans la séquence des amorces indiquent les nucléotides dégénérés ; ^b nombre de séquences différentes obtenues avec les bases dégénérées

Trois paires d'amorces différentes ont été désignées (Tableau 6) ; leur site d'hybridation sur la séquence du gène *mcrA* est indiqué sur la Figure 18.

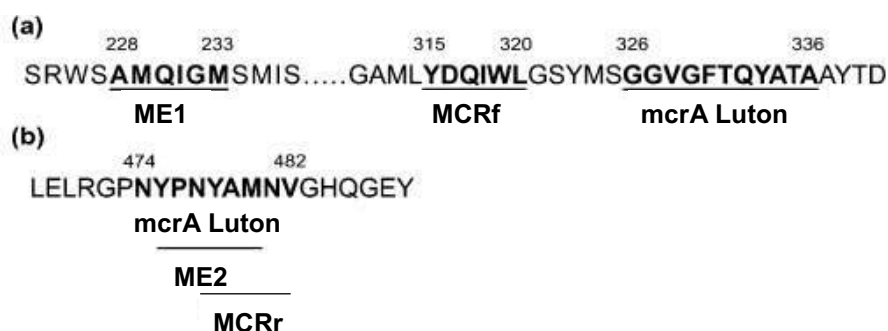


Figure 2 : Sites d'hybridation des différents couples d'amorces désignés pour l'amplification du gène *mcrA*

(Juottonen *et al.*, 2006)

Séquences déduites en acides aminés. (a) amorces sens ; (b) amorces anti-sens.

Lueders *et al.*, (2001) ont démontré que ces amorces permettent également de détecter les gènes *mrtA*. Ceci peut avoir des conséquences considérables lors de l'analyse de la structure d'une communauté méthanogène. Etant donné que les ordres *Méthanococcales* et *Méthanobactériales* peuvent présenter les deux gènes, leur présence peut être donc surestimée. Pour éviter de tels biais, les liens phylogénétiques *mcrA/mrtA* doivent être prudemment examinés (Friedrich & Jared, 2005).

Un autre biais dont il faut tenir compte est la dégénérescence des amorces. Cette dégénérescence est la conséquence du code génétique qui est lui-même dégénéré, surtout au niveau de la troisième position du codon. En résultat, il est possible que certaines espèces soient amplifiées de façon préférentielle et ainsi la composition de la communauté microbienne sera faussée (Figure 19). La paire d'amorces ME amplifie un long fragment (>700 pb, Tableau 6) du gène *mcrA* donnant ainsi plus d'information pour l'analyse phylogénétique. Ce couple n'amplifierait à priori pas le gène *mrt* (Figure 19, A) (Lueders *et al.*, 2001). Les amorces ME1/ME2 et MCRr/MCRf utilisées pour l'analyse des méthanogènes des rizières n'ont pas détecté des membres de l'ordre des *Methanomicrobiales*, alors que la présence de ce phylum a été signalée dans d'autres études (Lueders *et al.*, 2001). Dans une étude comparant les trois paires d'amorces, Juottonen *et al.*, (2006) concluent que les amorces décrites par Luton *et al.* (2002) sont les plus adaptées pour évaluer la diversité de la communauté méthanogène. Cependant, l'utilisation de ce couple pour la quantification des méthanogènes n'est pas appropriée (Juottonen *et al.*, 2006).

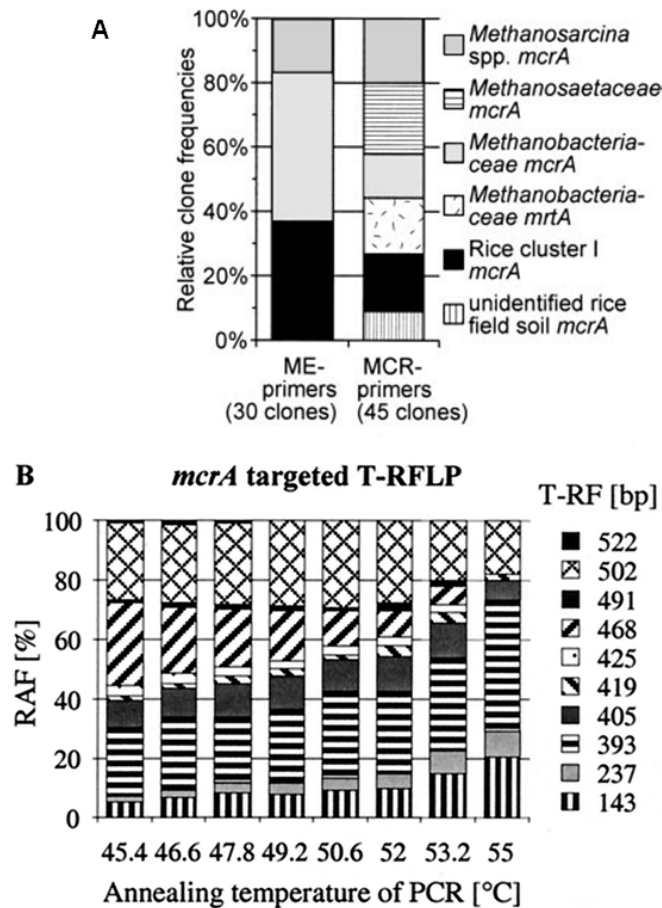


Figure 3 : Exemples de biais introduits dans l'analyse de la population méthanogène en fonction des amorces utilisées.

A : composition relative de la population méthanogène dans des rizières, en utilisant la paire d'amorces ME ou MCR (Lueders *et al.*, 2001)

B : effet de la température d'alignement sur les profils tRFLP du gène *mcrA* du sol (Lueders & Friedrich, 2003).

L'amplification préférentielle de certaines séquences peut être le résultat d'une température d'alignement (T_m) mal définie (Figure 19, B). Les cinétiques de formation et la stabilité des complexes amorces-matrices peuvent être altérées par la T_m , surtout quand des amorces dégénérées sont utilisées. Dans l'expérience de Lueders *et al.*, (2003) le fragment tRFLP¹ de 468 pb représentait 30% des amplicons quand la T_m était de 45,4°C ; il est passé sous le seuil de détection avec une T_m fixée à 55°C (Figure 19, B).

Ces exemples soulignent l'importance du travail d'optimisation d'une technique moléculaire et la prudence avec laquelle les résultats doivent être analysés.

¹ tRFLP : terminal Restriction Fragment Length Polymorphism est une technique d'empreinte moléculaire

IX. AVANTAGES ET INCOVÉNIENTS DE DEUX TECHNIQUES MOLÉCULAIRES UTILISÉES POUR CARACTÉRISER LES *ARCHAEA* MÉTHANOGENÈS DU RUMEN

L'utilisation de techniques moléculaires pour étudier le microbiote du rumen présente un potentiel remarquable et une application qui peut être répandue à des nombreux domaines. L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) et la PCR quantitative en temps réel (qPCR) sont deux techniques qui ont changé la résolution et les types de résultats qui peuvent être obtenus des communautés microbiennes dans le rumen (Edwards *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2008; Huws *et al.*, 2010; Kocherginskaya *et al.*, 2001; Sadet *et al.*, 2007). Cependant, il y a les limitations diverses qui peuvent influencer l'exactitude et la précision des résultats en utilisant ces techniques et il est important de considérer ces limites afin de faire des interprétations valables. La DGGE et la qPCR sont les outils moléculaires de base utilisés dans le cadre de cette thèse, ce qui explique l'importance qui leur est accordée dans les paragraphes qui suivent.

IX.1. L'électrophorèse en gradient de gel dénaturant

XI.1.1. Principe

La DGGE a été initialement développée pour détecter des mutations ponctuelles². Le gradient dénaturant est créé en utilisant du formamide et de l'urée, ajoutés dans l'acrylamide avant la polymérisation. Théoriquement, le gradient dénaturant peut s'étendre de 0% à 100%, mais en pratique ces limites varient entre 20% et 80% en fonction du contenu en GC³ de la molécule cible. La DGGE permet la séparation de molécules d'ADN de même taille, mais de séquences différentes grâce au gradient de dénaturation, présent de façon linéaire dans le gel d'acrylamide. En migrant l'ADN rencontre des conditions de plus en plus dénaturantes jusqu'à ce que sa mobilité au sein du gel soit altérée (Figure 20). Cette dénaturation ne se fait pas de façon progressive tout au long de la molécule, mais de domaine en domaine, s'ouvrant plus ou moins rapidement, en fonction de leur composition en bases AT¹¹ et GC. La stabilité de chacun des domaines dépend de la structure primaire de la molécule. En théorie, deux molécules dont les séquences ne diffèrent que d'une paire de base ne pourront donc pas s'ouvrir au même moment et migreront alors différemment à travers un gradient précis.

² changement de la structure du gène, affectant un à 10 nucléotides

³ Bases azotées de l'ADN : G pour guanine, C pour cytosine, A pour adénine, T pour thymine

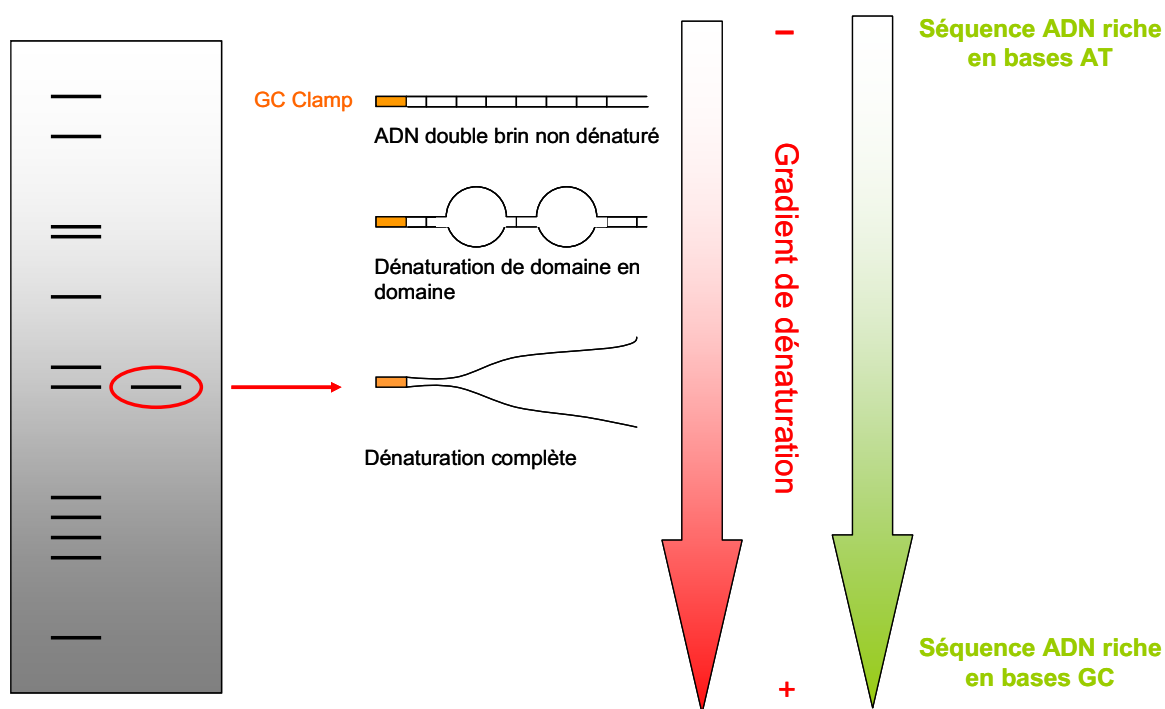


Figure 4 : Schéma illustrant le principe de la DGGE

XI.1.2. Les avantages

La première étude de communauté microbienne complexe, en utilisant la DGGE a été réalisée par Muyzer *et al.*, (1993), depuis cette technique a été utilisée dans un large nombre d'environnements (Galand *et al.*, 2003; Hwang *et al.*, 2008; Keyser *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009). En ce qui concerne les microorganismes du rumen, la DGGE a été utilisée pour l'étude de la communauté bactérienne (Edwards *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2008; Huws *et al.*, 2010; Kocherginskaya *et al.*, 2001; Sadet *et al.*, 2007), méthanogène (Hook *et al.*, 2009; Morgavi *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2010) ou des protozoaires (Regensbogenova *et al.*, 2004b). La DGGE est une technique de biologie moléculaire qui permet de mettre en évidence la diversité génétique d'une communauté microbienne sans passer par l'identification des micro-organismes la composant (Muyzer & Smalla, 1998; Muyzer, 1999).

Théoriquement, un puits de gel DGGE correspond à un échantillon et une bande correspond à une séquence ou espèce microbienne présente dans l'échantillon étudié. Cette technique présente l'avantage de permettre l'analyse simultanée d'un grand nombre d'échantillons (Figure 21) et de fournir rapidement une empreinte moléculaire de la population microbienne ciblée dans les différentes conditions expérimentales étudiées. Par la

suite, l'identification phylogénétique des espèces d'intérêt est possible en excisant la bande correspondante, suivi de l'élution de l'ADN y présent et de son séquençage.

La figure 21 illustre un exemple d'utilisation de la DGGE pour observer des changements dans la communauté méthanogène du rumen de taurillons à différents RFI⁴ et recevant deux régimes différents (Zhou *et al.*, 2010). Un total de 56 échantillons (animaux) ont été analysés et les premières observations (avant toute analyse informatique des profils) permettent de conclure que les espèces prédominantes (bandes les plus foncées) sont différentes en fonction de la ration alimentaire).

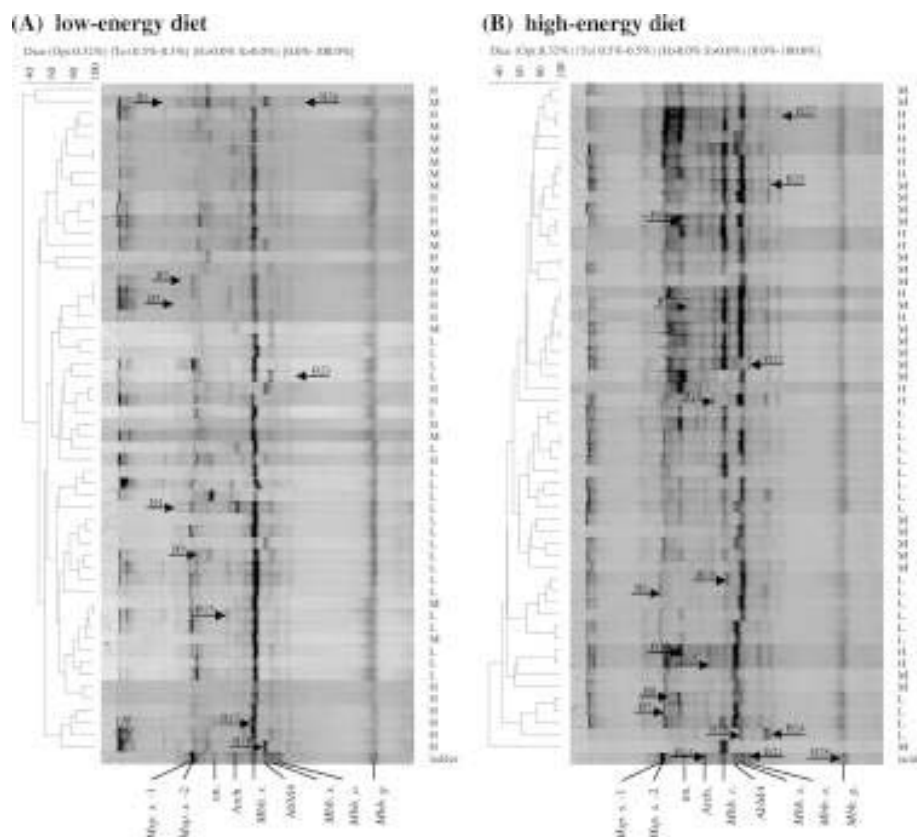


Figure 5 : Profils *rrs* PCR DGGE de la communauté méthanogène

Les échantillons proviennent des fluides ruminaux de 56 taurillons à RFI différents et dont l'alimentation a été changée d'un régime bas en énergie (A) vers un régime haut en énergie (B).

L : animaux à faible RFI, M : animaux à RFI moyen, H : animaux à RFI élevé. *Msp. s.-1* and *Msp. s.-2*, *Methanosphaera stadtmanae*; *Arch.*, *Methanobacteriales* archaeon clone CSIRO1.33; *Mbb. r.*, *Methanobrevibacter ruminantium* NT7; *AbM4*, *Methanobrevibacter* sp. AbM4; *Mbb. s.*, *Methanobrevibacter smithii*; *Mbb. o.*, *Methanobrevibacter olleyae*; *Mbb. g.*, *Methanobrevibacter gottschalkii* HO. Les flèches indiquent les bandes sélectionnées pour le séquençage (Zhou *et al.*, 2010).

⁴ RFI : residual feed intake, voir Annexe 1

L'analyse des gels DGGE nécessite des logiciels spécifiques qui utilisent des standards préalablement définis pour normaliser les différences entre gels dues à la migration. Ainsi plusieurs gels peuvent être comparés si les mêmes échantillons standards y sont déposés. C'est également grâce aux logiciels que les différences entre échantillons peuvent être mises en évidence. Une telle analyse réalisée dans l'étude de Zhou *et al.*, (2010) a permis de créer des dendrogrammes (Figure 21) illustrant le degré de similarité entre échantillons. Les échantillons provenant d'animaux à faible RFI ont groupé ensemble dans un cluster à part, alors que la séparation a été moins nette entre les échantillons provenant des animaux à RFI moyens et élevés et ceci quelque soit le régime. Les bandes d'intérêt (bandes majoritaires, caractéristiques d'un régime ou d'un RFI) ont été excisées, l'ADN purifié est séquencé afin d'identifier ces espèces particulières de méthanogènes (Zhou *et al.*, 2010).

XI.1.3. Les inconvénients

La détection des changements dans la communauté microbienne au moyen de la DGGE est rapide et facile une fois la technique mise au point. En revanche, son optimisation peut se révéler longue et laborieuse à cause des nombreux facteurs entrant en jeu (principalement les séquences à étudier, limites du gradient de dénaturation, temps et voltage de la migration).

Les profils de diversité observés dans une expérience donnée sont toujours dépendants de l'efficacité des étapes précédentes la DGGE. La manière dont les échantillons sont traités pour le stockage influence les profils de diversité de ces derniers (Rochelle *et al.*, 1994), tout comme la méthode utilisée pour l'extraction des acides nucléiques (Zoetendal *et al.*, 2001). La lyse de l'ensemble des cellules microbiennes d'un échantillon n'est pas reproductible à l'identique et la présence d'acides humiques ou encore d'exopolysaccharides bactériens peut par la suite inhiber l'amplification en PCR. Le choix des amorces utilisées en PCR est également crucial, comme ceci a été discuté dans la partie VIII.4.4. En outre, lors de l'amplification, la formation d'hétéroduplexes ⁵ ou des mutations ponctuelles peuvent se produire. Ces molécules ayant une température de fusion différente que celle des homoduplexes, leur migration au sein d'un gel DGGE (par exemple) sera différente, entraînant par la suite des difficultés dans l'interprétation de la complexité des communautés bactériennes.

Les fragments qui sont analysés en DGGE doivent présenter une seule température de fusion, pour assurer la répétitivité de la migration. Cette condition impose que la taille des

⁵ appariement de deux monobrinns d'ADN provenant de deux produits PCR différents

fragments analysés soit <500 paires de bases (pb) (revue de Muyzer (1998)), en réduisant ainsi l'information disponible pour l'analyse phylogénétique. Toutefois, il a déjà été rapporté que des fragments de même séquence migrent de manière différente (Karnati *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Par exemple cinq des 28 bandes indiquées dans la figure 21 (n°5, 8, 13, 16 et 28) ayant migré de manière différente représentaient en effet la même souche méthanogène. C'est un des problèmes de résolution dont il est nécessaire de tenir compte lors de l'analyse de la diversité.

Le nombre des fragments d'ADN qui peuvent être visualisés sur les gels DGGE est également restreint. Uniquement les espèces prédominantes dans les communautés très riches seront observées ; ces espèces représenteraient pas plus d'1% de la diversité globale (Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer & Smalla, 1998). Cette résolution limitée est l'inconvénient commun des techniques d'empreinte moléculaire sur gel, comme la TGGE⁶ et la SSCP⁷ (Muyzer & Smalla, 1998). Une possibilité de surmonter cette limite est de choisir d'étudier une petite portion de la communauté microbienne, notamment par l'utilisation d'amorces spécifiques d'un phylum ou groupe métabolique donné. Les amorces bactériennes universelles sont donc à éviter quand on s'intéresse à un groupe microbien particulier.

En théorie, une bande représente une séquence et donc une espèce, mais la co-migration de différents fragments d'ADN est souvent rapportée (Muyzer & Smalla, 1998; Sekiguchi *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2010). Parmi les 28 bandes différentes sélectionnées sur la Figure 21, vingt ont pu être identifiées après séquençage. Parmi ces 20 bandes, 3 présentaient plus d'une séquence (Zhou *et al.*, 2010). L'hétérogénéité des séquences dans les bandes excisées peut être expliquée par des erreurs de lecture ou erreurs d'incorporation des nucléotides lors de la polymérisation. Cependant, la fréquence de ces erreurs d'amplification semble faible et il serait peu probable qu'elles soient la raison de ce biais (Sekiguchi *et al.*, 2001). L'hétérogénéité peut être également due à la présence des bandes moins intenses qui migrent à proximité de la bande principale ce qui nécessite le développement de méthodes DGGE plus résolutive. Il n'est pas exclu non plus que des fragments d'ADN différents présentent des migrations identiques (Muyzer & Smalla, 1998; Muyzer, 1999). Ainsi, les analyses quantitatives basées sur l'intensité des bandes sont à réaliser avec la même prudence que les analyses de diversité.

⁶ TTGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis

⁷ SSCP : Single Strand Conformation Polymorphism

La présence de copies multiples du gène *rrs* chez certains microorganismes peut mener à surestimer la diversité de la communauté lors de l'analyse en DGGE. En effet, certaines des copies sont silencieuses ; elles accumulent les mutations lors de la réplication du matériel génétique et se retrouvent finalement différentes des copies qui sont transcrites. La conséquence est un nombre de bandes plus grand qu'il n'en devrait être, menant à des fausses conclusions (Muyzer & Smalla, 1998). Les copies multiples peuvent être mises en évidence par une amplification en qPCR avec un nombre connu de cellules provenant de cultures pures. Un biais similaire est introduit lors de l'utilisation d'amorces dégénérées.

XI.1.4. La technique au laboratoire

Au cours de la thèse de S. Sadet réalisée dans l'équipe, il a été observé que la reproductibilité d'un gel de DGGE à un autre était assez difficile à obtenir. En effet, la préparation des solutions d'acrylamide, la migration, la coloration... sont autant d'étapes qui font que pour un même échantillon, des profils différents peuvent être obtenus.

Pour pouvoir comparer des gels DGGE entre eux, il est nécessaire que les **solutions** servant à la fabrication de ces gels soient les plus récentes possible. Les solutions d'acrylamide ont toujours été conservées à +4°C dans des flacons ambrés pour pas plus d'un mois. Le même stock de solutions a été utilisé pour l'ensemble des gels à comparer.

Avant de couler le gel, il est important de s'assurer que les **plaques en verre** ont été bien nettoyées. En effet, s'il reste des résidus, au moment de couler le gel, le gradient ne se fera pas de façon linéaire provoquant par la suite des déformations à l'intérieur du gel (Figure 22). Pour cela, les plaques ont été lavées plusieurs fois à l'eau mQ et ensuite à l'éthanol 100%. Après chaque utilisation, les plaques ont été laissées tremper au moins 24h dans une solution de détergent à 10%.



Figure 6 : Profil déformé suite à la réalisation d'un gradient non linéaire

Les **puits** externes, ceux présentant des anomalies de polymérisation visibles à l'œil nu ou renfermant des bulles d'air n'ont pas été utilisés pour éviter l'obtention de profils déformés, empêchant la comparaison entre les échantillons. Afin de permettre une normalisation optimale lors de l'analyse les mêmes échantillons **standards** ont été déposés en triple (deux sur les côtés et un au milieu) sur l'ensemble des gels à comparer.

	<i>mcrA</i>	<i>rrs</i> bactérien
Gradient en acrylamide	6 % - 8 %	6 % - 8 %
Gradient en agents dénaturant	10 % - 30 %	30 % - 55 %
Température de migration	60°C	60°C
Tension de migration	200 V	200 V
Temps de migration	5.5 h	5 h

Tableau 2 : Caractéristiques des gels et des conditions du migration en fonction du gène étudié.

Les gradients et conditions de migration optimaux pour l'analyse des séquences du gène *rrs* ont été déterminés au cours du travail du thèse de S. Sadet. Dans ma thèse nous nous sommes concentrés sur les conditions permettant la meilleure séparation des amplicons *mcrA*. Ainsi, il a été déterminé que le gradient d'agent dénaturant donnant des meilleurs résultats est le 10%-30% avec un temps de migration de 5,5 h. Les caractéristiques des gels utilisés et les conditions de migrations pour les deux gènes étudiés en DGGE au cours de cette thèse (*mcrA* et *rrs* bactérien) sont résumées dans le Tableau 7.

La coloration peut se faire au bromure d'éthidium ou au nitrate d'argent. L'argent est généralement préféré car moins dangereux. De plus, la coloration au nitrate d'argent est considérée plus résolutive et permet d'avoir un signal plus stable qui ne se dégrade pas rapidement dans le temps (Muyzer & Smalla, 1998). Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le kit de BioRad « Bio-Rad Silver Stain », en suivant le protocole du fabricant.

IX.2. La PCR quantitative en temps réel

IX.2.1. Principe

Le principe de la qPCR est similaire à celui de l'amplification en PCR « ordinaire » (Figure 23).

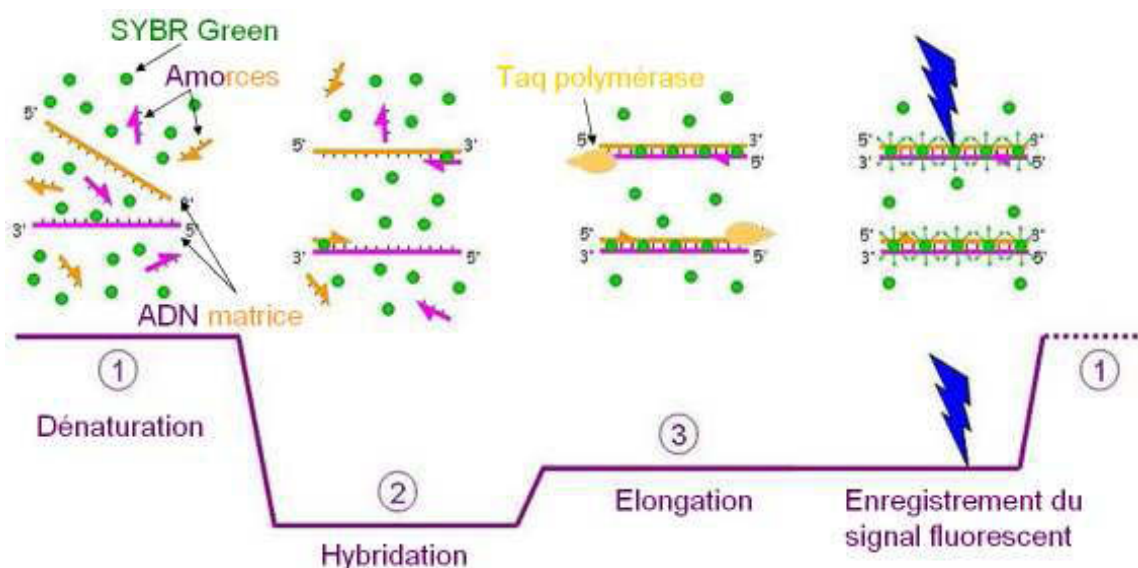


Figure 7 : Principe de la qPCR utilisant le SYBR Green I

La première étape de la réaction d'amplification est la dénaturation (étape 1) de l'ADN double brin (db) pour permettre l'hybridation des amorces (étape 2). Le SYBR Green est un agent intercalant qui n'émet de fluorescence que quand il est fixé dans le sillon mineur de l'ADN db. Durant l'étape d'élongation (étape 3), l'augmentation du signal fluorescent est ainsi associée à la quantité de SYBR se fixant sur l'ADN db naissant. L'émission de fluorescence décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape de dénaturation suivante (étape 1). Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles.

La qPCR présente l'avantage de permettre le suivi de l'amplification en temps réel, en utilisant un fluorochrome. L'intensité du signal fluorescent, mesurée en unités relatives de fluorescence (ΔRn) est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction (Figure 24). La réaction d'amplification passe par une phase exponentielle avant d'entrer dans une phase linéaire (Figure 24) où le taux d'amplification devient extrêmement variable même au niveau du réplica d'un même échantillon, à cause d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Grâce au fluorochrome, il est possible de voir le début de la phase exponentielle d'amplification (le signal devient plus fort que le bruit de fond), caractérisée par le cycle seuil (threshold cycle, Ct) (Figure 24)

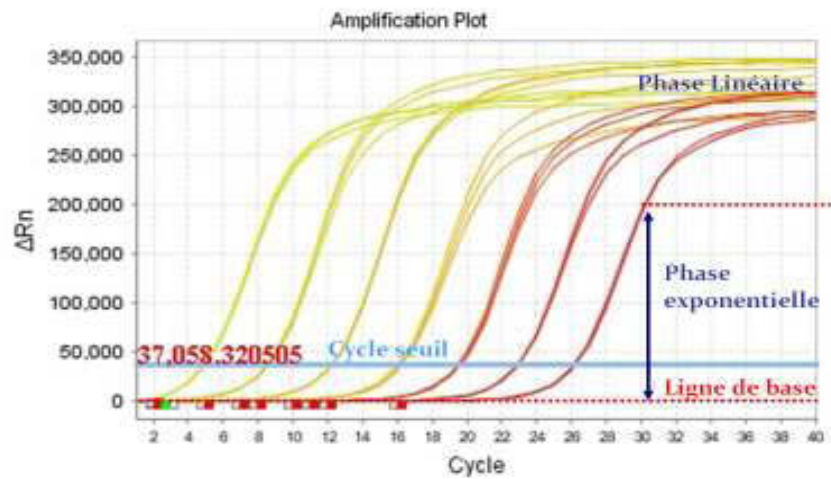


Figure 8 : Suivi de l'amplification en temps réel

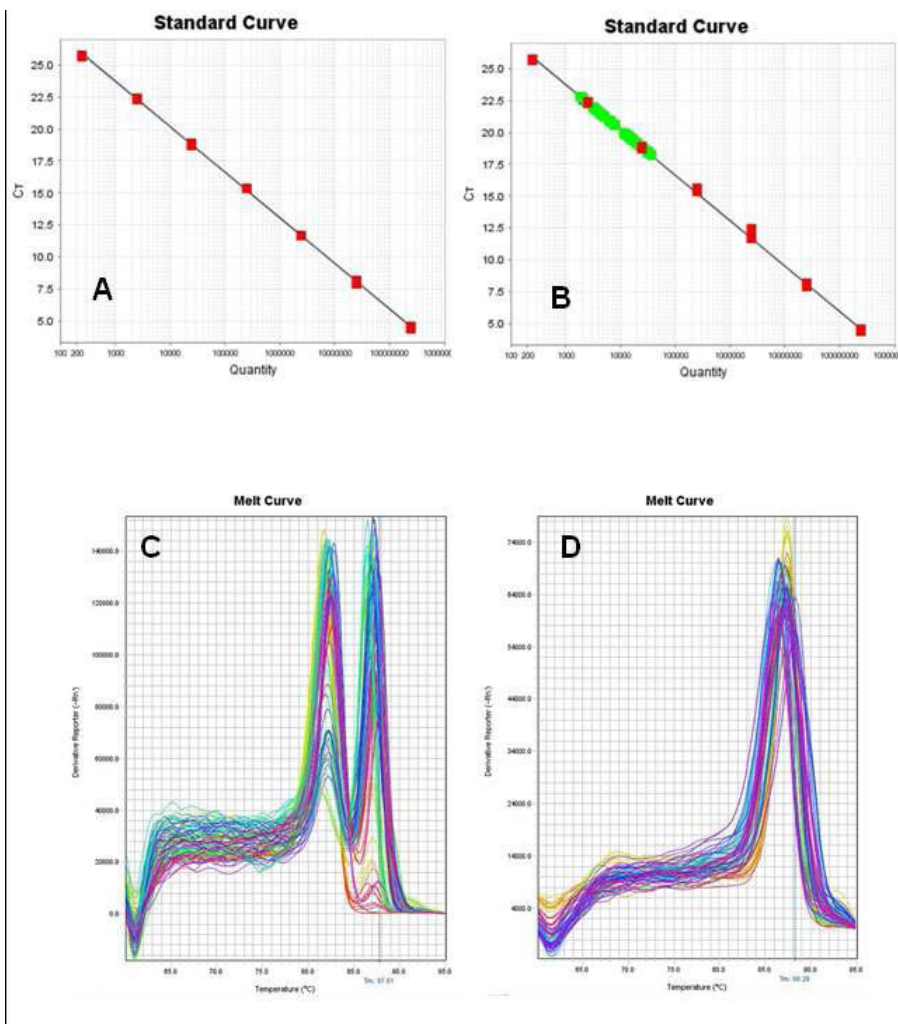


Figure 9 : Exemples de résultats d'amplification en qPCR

A, courbe standard, B : courbe standard (en rouge) avec les échantillons étudiés (en vert) ; C, courbes de dissociations avec deux températures de fusion ; D, courbe de dissociation avec une seule température de fusion.

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction. Plus il y a de matrices d'ADN à amplifier au départ de la réaction, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal fluorescent sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Ce point définit le C_t et apparaîtra toujours au début de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du C_t peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du C_t générées avec des matrices de quantification connues (Figure 25 A et B) (Bustin, 2000; Poitras & Houde, 2002)

La spécificité de la réaction d'amplification est vérifiée par l'analyse des courbes de fusion des amplicons, réalisée après le dernier cycle d'amplification. La température à laquelle l'ADN « fond » dépend de plusieurs caractéristiques spécifiques. La température de fusion (T_m) de l'ADN db est la température à laquelle les deux brins complémentaires se séparent (dénaturation). La séparation de brins est due à la rupture des liaisons hydrogènes (deux entre les bases complémentaires A et T et trois entre les bases complémentaires G et C). Ainsi, les molécules d'ADN avec des proportions plus hautes en G et C ont une T_m plus élevée en raison de l'entassement d'interactions entre des paires de bases voisines. La longueur du fragment d'ADN contribue aussi à la stabilité thermique. Des fragments d'ADN plus longs (>1000bp) peuvent présenter des T_m internes aboutissant à des résultats plus difficilement interprétables. Des fragments d'ADN divergents d'une seule paire de base avec pourraient théoriquement être identifiés en examinant les profils T_m (Figure 25 C et D). Généralement, les courbes de fusion présentent un seul pic. Denman *et al.*, (2007), eux ont observés deux pics (à 81°C et 86°C) dans les profils de fusion des amplicons *mcrA*. Après séquençage, ils ont pu déterminer que les séquences dont le pic de T_m est à 81°C sont proches de *Methanobrevibacter ruminantium*, alors que le pic à 86° correspond aux séquences *mcrA* des autres taxa de méthanogènes.

Le SYBR Green I dont le mécanisme de liaison n'est pas bien défini, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont qu'il est économique, facile à utiliser et possède plus de sensibilité que le bromure d'éthidium sans inhiber la réaction d'amplification. La spécificité de la technologie utilisant le SYBR Green I repose entièrement sur les amorces, étant donné qu'aucune sonde fluorescente n'est nécessaire (Bustin, 2000). Étant donné que le SYBR

Green I se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle (Poitras & Houde, 2002).

La quantification des microorganismes de l'environnement en utilisant la qPCR est devenue aujourd'hui une procédure standard grâce à sa sensibilité et répétitivité. Cette technique est appliquée avec succès également sur des échantillons du rumen pour quantifier les bactéries (Denman & McSweeney, 2006; Mosoni *et al.*, in press; Tajima *et al.*, 2001), les méthanogènes (Denman *et al.*, 2007; Mosoni *et al.*, in press; Tajima *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2009) ou encore les protozoaires et champignons (Denman & McSweeney, 2006; Skillman *et al.*, 2006b). Cette popularité est reflétée par le nombre prodigieux de publications présentant des résultats qPCR ; mais les différentes équipes utilisent inévitablement des réactifs divers, des protocoles, des méthodes d'analyse et de présentations des résultats qui leur sont propres. Ce manque de consensus sur la façon d'exécuter les expériences qPCR a la conséquence défavorable de perpétuer une série des défauts sérieux qui encombrant son statut de mesure indépendante (Bustin *et al.*, 2009). Ainsi, en 2009, Bustin *et al.*, ont souligné le danger réel que cache la littérature scientifique corrompue avec une multitude de publications annonçant des résultats inadéquats ou contradictoires. Le problème est exacerbé par le manque d'informations que caractérise la plupart des rapports scientifiques utilisant cette technologie. Un grand nombre de publications ne fournissent pas les détails expérimentaux nécessaires pour reproduire les expériences ou pour permettre au lecteur d'évaluer de manière critique des résultats présentés. Des informations primordiales comme la manière d'acquisition et de traitement des échantillons, la qualité et l'intégrité des acides nucléiques (ADN ou ARN), des détails sur la transcription inverse, l'efficacité et les paramètres d'analyse de la qPCR sont fréquemment omis ; aussi la normalisation est habituellement effectuée contre des gènes de référence sans justification adéquate. Pour remédier à cela, Bustin *et al.*, ont proposé en 2009 un cahier des charges des informations essentielles, qui doivent être annoncées pour une expérience de qPCR afin d'assurer sa pertinence, exactitude, interprétation correcte et répétitivité (Annexe 2).

IX.2.2. Les différentes stratégies de quantification

La **quantification absolue** nécessite l'utilisation d'une gamme étalon, réalisée à partir de dilutions en cascade d'un échantillon contenant un nombre connu de copies du gène ciblé. Une courbe étalon (Figure 25, A) est ainsi construite pour relier le signal fluorescent du Ct au

nombre de copies initialement présentes dans chaque point de gamme. Il suffit ensuite de rapporter le signal fluorescent mesuré au moment du Ct pour chaque échantillon sur la courbe pour déterminer le nombre des copies du gène cible qu'il contenait avant l'amplification (Figure 25, B). La quantification absolue est très utile quand connaître la quantité exacte des fragments d'ADN ciblés est essentiel à l'étude.

En revanche, quand suite à un traitement le nombre de copies des transcrits d'un gène change de 10^5 à 50^5 par cellule, annoncer une augmentation de 5 fois dans l'expression de ce gène est plus adéquat que donner le nombre précis de transcrits. Dans de tels cas, la **quantification relative** est largement suffisante (Schmittgen & Livak, 2008). La quantification relative exige un certain nombre d'équations et d'assumptions qu'il est indispensable de tester avant d'analyser les résultats. Il est également nécessaire d'avoir une **molécule de référence** et un état **calibreu**. Les calculs permettant la quantification relative ont été développés par Livak et Schmittgen (2001) et les étapes décrites ci-dessous sont issues de leur publication. Ces équations étaient la base de notre étude sur l'expression du gène fonctionnel *mcrA* des *Archaea* méthanogènes dans le rumen, pour cette raison nous présenterons ici les étapes clés du calcul.

L'équation qui décrit la phase exponentielle d'amplification de la PCR est la suivante :

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n$$

Dans cette équation X_n est le nombre de molécules cibles, X_0 est le nombre initial de molécules cibles, E_x est l'efficacité d'amplification (voir Annexe 2) de la cible et n est le numéro de cycle. Au cycle seuil (Ct), le nombre des molécules cible (X) et le nombre de molécules de référence (R) peuvent s'écrire

$$X_{Ct} = X_0 \times (1 + E_X)^{Ct, X} = K_X$$

$$R_{Ct} = R_0 \times (1 + E_R)^{Ct, R} = K_R$$

$$\frac{X_{Ct}}{R_{Ct}} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{Ct, X}}{R_0 \times (1 + E_R)^{Ct, R}} = \frac{K_X}{K_R} = K$$

On suppose que les molécules cibles et les molécules de référence sont amplifiées avec les mêmes efficacités : $E_X = E_R = E$

$$X_0 / R_0 \times (1 + E)^{Ct, X - Ct, R} = K$$

$$X_n * (1 + E)^{\Delta Ct} = K$$

X_n est la quantité normalisée de la cible (X_0/R_0) et ΔCt est la différence dans les cycles seuils de la cible et la référence ($Ct_x - Ct_R$)

$$X_n = K * (1 + E)^{\Delta Ct}$$

La dernière étape est la division du X_n de l'échantillon (e) par le X_n du calibrateur (cb)

$$\frac{X_{N,e}}{X_{N,cb}} = \frac{K x (1 + E)^{-\Delta Ct, e}}{K x (1 + E)^{-\Delta Ct, cb}} = (1+E)^{-\Delta \Delta Ct}$$

Ici, $-\Delta \Delta Ct = -(\Delta Ct_e - \Delta Ct_q)$

La dernière assumption consiste d'admettre que les efficacités des qPCR de la cible et du calibrateur sont proches de 100%, ce qui permet d'affirmer que :

Le changement dans l'expression = $2^{-\Delta \Delta Ct}$

Les **molécules de référence** sont utilisées pour normaliser les quantités de molécules cibles utilisées dans la réaction de qPCR (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). Les molécules de référence le plus souvent utilisées sont les gènes de ménage dont l'expression ne devrait pas être influencée par les différentes conditions expérimentales (**le calibre**). L'expression constante peut-être vérifiée par l'analyse statistique des valeurs 2^{-Ct} ou $2^{-\Delta Ct}$ (avec $\Delta Ct = (Ct_{\text{temps}/\text{état 1}} - Ct_{\text{temps}/\text{état 0}})$). Ces deux méthodes issues de la méthode $2^{-\Delta \Delta Ct}$ peuvent également être utilisées pour l'étude des changements d'expression d'un gène cible dans les cas où aucun gène de référence n'est disponible qPCR (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008).

Le Ct est un terme exponentiel et pas linéaire ; les analyses statistiques sur les valeurs brutes de Ct sont donc à éviter. Comme décrit jusqu'à là, la présentation d'expression d'un gène en qPCR relative est plus souvent calculée avec un contrôle interne et/ou un calibre et est rarement présenté comme le Ct. La conversion des valeurs en termes linéaires, en utilisant les 2^{-Ct} ou $2^{-\Delta \Delta Ct}$ décrit plus précisément les variations d'expression et permet l'analyse statistique (Livak & Schmittgen, 2001)

IX.2.3. Les inconvénients de la qPCR

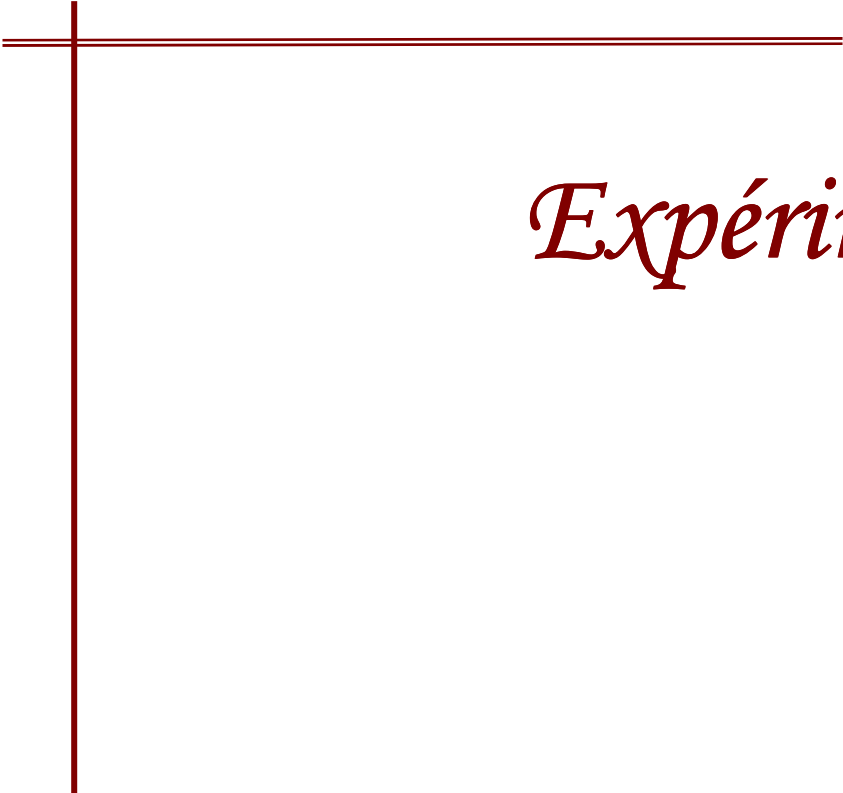
Comme pour la DGGE, les résultats obtenus en qPCR sont influencés par l'efficacité des étapes précédant l'amplification. Les acides nucléiques des échantillons

environnementaux sont souvent co-extraits avec des inhibiteurs de la PCR (Krause *et al.*, 2001) ce qui affecte leur qualité. Comme discuté précédemment, les calculs utilisés pour l'analyse des résultats qPCR supposent que l'amplification des échantillons (cible et référence) se fasse avec la même efficacité. Cette affirmation peut s'avérer fausse si l'étape de l'extraction ne permet pas d'obtenir des acides nucléiques de pureté et qualité comparables.

Autre étape fondamentale dans le développement d'une approche en qPCR est le choix des amorces. L'utilisation d'amorces non spécifiques mènera à la surestimation de l'abondance des molécules ciblées par l'amplification non spécifique. L'examen attentif des courbes de fusion permet de se rendre rapidement compte de ce problème.

Les amorces choisies doivent pouvoir détecter tous les membres du groupe ciblé, mais également permettre que les différentes séquences soient amplifiées avec les mêmes efficacités. L'utilisation des amorces soigneusement désignées a été soulignée par Skillman *et al.*, (2006a) qui ont trouvé que les amorces universelles ciblant les *Archaea* ne permettaient pas de détecter certaines espèces de méthanogènes à cause de biais d'appariement.

Tout comme pour la DGGE, les résultats de quantification du gène *rrs* en qPCR doivent être analysés avec prudence à cause des microorganismes qui en possèdent des copies multiples. Si suite à un traitement, le nombre des copies *rrs* augmente ceci peut effectivement être la conséquence d'une population bactérienne plus nombreuse, mais peut également refléter le remplacement d'une population microbienne possédant une copie du gène par une population de taille identique mais renfermant plus d'une copie du *rrs* dans son génome.



Expérimentations

X. STRATEGIE EXPERIMENTALE

L'objectif de ce travail de thèse était de relier la production de CH₄ par les ruminants avec la structure et l'activité de la population des *Archaea* méthanogènes du rumen. Deux **modèles** différents de manipulation de l'écosystème microbien ruminal connus pour modifier la méthanogenèse ont été utilisés : la défaunation et l'alimentation.

Bien que les tests *in vitro* soient plus rapides et moins coûteux, l'approche retenue au cours de toutes nos expériences était celle de l'**expérimentation *in vivo***. Ce choix était motivé par le fait qu'aucun système *in vitro* ne peut reproduire à l'identique les conditions biotiques et abiotiques du rumen et en particulier la relation animal hôte – microbiote. De plus, vu que les effets des différents facteurs utilisés sur la production de CH₄ étaient déjà bien connus, ce qui nous intéressait surtout était la réponse de l'écosystème microbien ruminal.

Les *Archaea* méthanogènes étaient au cœur de ce travail de thèse. Très peu d'espèces du rumen ont été cultivées à ce jour, d'où le choix de la **biologie moléculaire** pour caractériser cette population particulière. Des outils moléculaires ciblant spécifiquement leur gène marqueur *mcrA* ont été mis au point ou optimisés. Pour assurer une **vue globale de l'écosystème microbien ruminal**, les interactions fonctionnelles entre les *Archaea* méthanogènes et les autres microorganismes présents (bactéries et protozoaires) ont également été étudiées.

Afin de donner une première partie de réponse aux objectifs fixés, pour la première expérimentation, nous avons choisis **les conditions de laboratoire** où tous les paramètres pouvant interagir avec la production de CH₄ ont été contrôlés. Pour les deux autres expérimentations nous nous sommes mis dans des **conditions de pratique** d'un élevage intensif d'ovins ou de bovins.

X.1. PREMIERE EXPERIMENTATION

Influence de la defaunation sur la structure et l'activité de la communauté méthanogène du rumen chez le mouton à l'entretien

L'élimination des protozoaires du rumen se traduit généralement par une diminution de la production de CH₄ par les ruminants. Toutefois, les changements concomitants dans la structure et l'activité métabolique des *Archaea* méthanogènes, qui pourraient expliquer ces variations de la méthanogenèse, sont encore peu connus.

Quatre moutons de race Texel castrés et canulés du rumen ont été alimentés (1 repas/jour à 8h) avec une ration composée de 70% de fourrage et 30% de concentré. L'étude s'est déroulée en deux périodes successives. Dans la période « fauné », les moutons conventionnels ont été adaptés pendant deux semaines à leur environnement (cages, licols...). Ensuite, après une semaine de mesure de la production de méthane, suivie d'une semaine dédiée aux prélèvements de contenu ruminal, les quatre moutons ont été défaunés. Trois mois après la défaunation, la période « défauné » s'est déroulée comme la période précédente avec deux semaines d'adaptation, une semaine de mesure de la production de méthane et une semaine pour les prélèvements de contenu ruminal.

La production de CH₄ a été quantifiée par la technique de dilution de gaz traceur (SF₆) sur une période de 14 heures après le repas et sur 5 jours consécutifs. Sur cette même période, des échantillons de gaz ont été prélevés régulièrement par la canule pour décrire la cinétique postprandiale de la production de CH₄. Des prélèvements de contenu ruminal ont été réalisés aux moments les plus pertinents de la cinétique pour les paramètres microbiens et fermentaires. Les communautés méthanogène et bactérienne ont été étudiées en utilisant des outils de biologie moléculaire ciblant respectivement les gènes *mcrA* et *rrs*. Nous avons utilisé la quantification absolue en qPCR pour estimer l'abondance respective des deux populations microbiennes et la PCR-DGGE pour leurs diversités. Plus de détails sur la composition phylogénétique de la communauté bactérienne ont été obtenus en utilisant une puce à ADN (PhyloChip) ; pour les *Archaea* des banques de clones « Animaux Faunés » et « Animaux Défaunés » ont été construites. En outre, nous avons utilisé la quantification relative en qPCR pour comparer l'expression du gène fonctionnel *mcrA* chez les animaux faunés et défaunés.

Les émissions moyennes de CH₄ chez les animaux défaunés (28,6 L/j) ont significativement (P<0,05) diminué par rapport aux animaux faunés (31,6 L/j) sur les 14h de la période de mesure. Les concentrations des AGV totaux (AGVt) et du propionate ont été

plus élevées chez les animaux défaunés que chez les animaux faunés (101,2 et 87,5 mM et 19,8 et 15,8 mM respectivement, $P < 0,05$). Les cinétiques de production du CH_4 et celle des AGVt étaient comparables entre les animaux faunés et défaunés. Dans les deux cas, les fermentations ruminales étaient maximales 1 à 2 heures après le repas avec une production de CH_4 triplée et une concentration des AGVt doublée par rapport au niveau pré-prandial. Les processus fermentaires dessinaient ensuite une diminution lente et progressive, pour revenir, dans le cas du CH_4 , à l'état initial 14h après le repas.

Chez les moutons dépourvus de protozoaires, la concentration des copies du gène *rrs* était plus élevée que chez les moutons « conventionnels ». En revanche, les analyses en PCR-DGGE n'ont révélé aucun changement dans la diversité de la population bactérienne. Les puces à ADN ont montré que les phyla prédominants dans les deux groupes d'animaux étaient les *Actinobacteria* suivis par des *Proteobacteria* et *Firmicutes*.

Chez les moutons défaunés, alors qu'un nombre plus élevé de copies du gène *mcrA* ($P < 0,05$) a été retrouvé, l'expression de ce gène fonctionnel avait diminué 2.5 fois en comparaison avec les moutons faunés. Les profils PCR-DGGE n'ont pas montré des changements dans la composition de la communauté suite à la défaunation. Les principaux ordres méthanogènes aussi bien chez les moutons faunés que chez les moutons défaunés étaient les *Methanobacteriales* et les *Methanomicrobiales*. L'abondance des différents phyla par contre n'était pas la même entre les banques. Chez les animaux défaunés, 64% des clones étaient apparentés aux *Methanobacteriales* et 10% seulement aux *Methanomicrobiales* alors que chez les animaux faunés, ces ordres représentaient 35% et 25% des clones respectivement.

Dans notre étude, l'élimination des protozoaires dans le rumen a diminué la production de CH_4 principalement en diminuant l'activité métabolique des *Archaea* méthanogènes, mais des changements structurels dans cette communauté ont également été observés.

**“RUMINAL PROTOZOA INCREASE SHEEP METHANE EMISSIONS BY
STIMULATING METHANOGENS METABOLIC ACTIVITY”**

Milka Popova¹, Cécile Martin¹, Ourdia Bouzid², Pierre Peyret³, Corinne Petit³, Diego. P. Morgavi^{1*}

¹ INRA, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

² Microbiology, Utrecht University, 3584 CH Utrecht, Netherlands

³ Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement, Université Blaise Pascal (UMR CNRS 6023).

*Corresponding author. Tel: +33 4 73 62 40 57; Fax: +33 4 73 62 46 59

EM: diego.morgavi@clermont.inra.fr

Running title (50 characters including spaces): Effects of defaunation on methanogens community

Subject Category: Microbial population and community ecology

ARTICLE EN PRÉPARATION

Abstract

Elimination of protozoa from the rumen usually decreases methane production from ruminants. However, concomitant changes in the structure and metabolic activity of rumen methanogens explaining the variation in methanogenesis still unknown. Rumen *Archaeal* and bacterial communities from four adult Texel wethers consecutively faunated and defaunated were profiled using molecular biology tools targeting respectively the functional *mcrA* and *rrs* genes. Methanogens and bacterial numbers were assessed using qPCR absolute quantification diversity patterns were obtained by PCR-DGGE. Further insight in communities' composition was obtained by phylogenetic trees constructed on *mcrA* gene sequences for *Archaea* and hybridization of the 16S rRNA on a PhyloChip for *Bacteria*. In addition, we used relative qPCR quantification to assess changes in *mcrA* gene expression in faunated and defaunated animals. Animals not harboring protozoa had higher ($P < 0.05$) number of *mcrA* gene copies, but gene expression in these animals was decreased by 2.5 fold as compared to the same animals before protozoa removal. The presence or absence of protozoa did not influence methanogens and bacterial global diversity in the rumen, as revealed by PCR-DGGE profiles. Phylogenetic analysis showed that the major methanogenic orders in both faunated and defaunated animals were *Methanobacteriales* and *Methanomicrobiales*, but phyla abundance differed between libraries. In defaunated animals, 64 % of the clones clustered within the *Methanobacteriales* and 10 % with the *Methanomicrobiales* orders whereas in faunated animals, these orders represented 35 % and 25 % of the clones respectively. Microarray analysis revealed that predominant phyla in both faunated and defaunated animals were *Actinobacteria* followed by *Proteobacteria* and *Firmicutes*. In our study, elimination of protozoa in the rumen decreased methane production mainly by decreasing metabolic activity of methanogenic *Archaea*, however structural changes in this community were observed.

Keywords : gene expression / methane / methanogenic *Archaea* / protozoa / rumen

Introduction

Enteric methane (CH₄) from ruminants accounts for about 11-17% of CH₄ generated from anthropogenic activity (Steinfeld *et al.*, 2006). Methane generated in the rumen is formed from hydrogen (H₂) produced during the fermentation of the feed ingested by the animal (Hungate, 1967) and used by different archaeal methanogen species to reduce carbon dioxide (CO₂). By removing H₂ from the ruminal environment as a terminal step of carbohydrate fermentation, methanogens allow the microorganisms involved in fermentation (bacterial, protozoal and fungal species) to function optimally and support the complete oxidation of substrates. However, although this process is desirable from a fermentation perspective, it is energetically costly, as ruminant suffers a loss of ingested feed-derived energy of approximately 2–12% (Johnson and Johnson, 1995), depending upon the diet, when this potent greenhouse gas is exhaled into the atmosphere.

Various ways are developed to reduce enteric CH₄ emissions, mainly through rumen microbial manipulation and even vaccine against rumen methanogens (reviewed in Martin *et al.*, (2010)). For instance, dietary composition or feed additives are known to be effective on CH₄ production, but how they affect methanogen populations is largely unknown. It would be beneficial to explore this gap to help reduce CH₄ emissions from ruminant livestock. Similarly, removal of rumen protozoa (termed defaunation) to mitigate methanogenesis appears interesting (Hegarty, 1999) as the changes induced seem to be stable (Morgavi *et al.*, 2008). Indeed, rumen protozoa share a symbiotic relationship with methanogens, participating in interspecies hydrogen transfer. However, reports on the effect of ciliate removal on the methanogenic community are few and often contradictory showing increase (Mosoni *et al.*, in press) or decrease (Takenaka and Itabashi, 1995) in the quantity, by influencing (Ozutsumi *et al.*, 2005) or not (Morgavi *et al.*, 2006; Mosoni *et al.*, in press) the diversity of methanogens. These results suggest that CH₄ production decrease induced by defaunation is not directly linked to methanogenic community structure, but could be due to reduction in the amount of H₂ available.

Methanogenesis is achieved *via* a number of very similar pathways containing some enzymes and co-factors not found in non-methanogens (Baptiste *et al.*, 2005). Among them, methyl coenzyme-M reductase is the key enzyme of methanogenesis, which catalyzes the final step in these pathways, the reduction of the coenzyme M-bound methyl group to CH₄

(Reeve *et al.*, 1997). The functional gene *mcrA*, encoding the alpha subunit of this enzyme is widely used as a phylogenetic marker to enumerate the methanogen population and to assess its diversity (Luton *et al.*, 2002). Targeting an enzyme also offers the potential for the development of activity-based detection methods *via* the analysis of messenger RNA (Guo *et al.*, 2008; McSweeney *et al.*, 2009).

In the present study, we examined the effect of rumen protozoa removal on methanogenesis dynamics, fermentation patterns and microbial community structure *in vivo*. In-depth study of the methanogenic *Archaea* community was achieved using molecular biology tools targeting the functional *mcrA* gene. Methanogens diversity was assessed by a fingerprint technique (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE) and sequencing. Quantitative real-time PCR (qPCR) was used to monitor changes in methanogens abundance, as well as changes in *mcrA* gene expression, which was used as an indicator of the methanogenic activity. Both *Archaea* and *Bacteria* were also monitored using gene coding for the 16S ribosomal RNA (rRNA). Bacterial diversity was assessed by DGGE and changes in 16S rRNA abundance in animals harboring or not protozoa was monitored using a PhyloChip analysis.

Materials and methods

Animals, diet and experimental design

The experiment was conducted at the animal experimental facilities of the INRA's Herbivores Research Unit (Saint-Genès Champanelle, France). Procedures on animals were in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture and all other applicable national and European guidelines and regulations for experimentation with animals (see http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html for details). The defaunation protocol was approved by the Regional Ethics Committee on Animal Experimentation (n° CE20-08).

Four adult rumen fistulated Texel wethers, average body weight 61.5 ± 1.3 kg were used in this study. Animals were housed in individual pens and were fed a maintenance diet (700 g alfalfa pellet, 300 g cracked corn and 200 g grassland hay (53.4 %, 11.2 % and 66.7 % NDF and 34.7 %, 2.8 % and 36.4 % ADF respectively), given once daily at 0800 hours. Wethers completely consumed their daily ration in about 20 min. Access to water and mineral salt block supplement was unrestricted.

The same four wethers were consecutively faunated and defaunated. The study started with the “faunated” period which lasted four weeks: two weeks of adaptation to pens and halters, followed by one week for CH₄ measurements and one week for rumen content sample collection. At the end of the faunated period, wethers were defaunated by rumen emptying and washing as described before (Jouany *et al.*, 1979). The “defaunated” period started 3 months after the defaunation in order to allow rumen microbiota to adapt. As for the “faunated” period, the “defaunated” one lasted 4 weeks: 2 weeks for adaption, 1 week for CH₄ measurements and 1 week for rumen content sampling.

Methane production

Methane production was measured as described by Martin *et al.*, (2008a) during a 5-day period using brass permeation tubes charged with the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer gas (Johnson *et al.*, 1994). Mean permeation rate of SF₆ from the tubes was 690±91 ng min⁻¹. Representative breath samples from each animal were taken into pre-evacuated (-91.2 kPa) PVC collection devices (~ 2.5 l) by means of capillary and Teflon tubing fitted to a halter (Martin *et al.*, 2008a). The collection devices were put on at 0800 h before feeding and stopped at 2200 h after the last rumen gas sampling, allowing thus to measure the total gas production over 14 hours. In parallel gas sampling directly in the rumen was performed to follow methanogenesis dynamics post feeding (see supplemented material). Background concentrations of CH₄ and SF₆ were also measured on ambient air samples collected every day in the barn during the sampling period. Gas samples were analyzed by gas chromatography using a chromatograph fitted with electron capture detector (Varian-Chrompack, CP-9003, Les Ulis, France) for SF₆ detection and a second chromatograph fitted with a flame ionization detector (Perkin Elmer instruments, Autosystem XL, Courtaboeuf, France) to determine the concentrations of CH₄ (Martin *et al.*, 2008a).

Rumen content sampling for fermentation and microbial parameters determination

Both for faunated and defaunated wethers, total rumen content samples (~ 500 g) were collected just before feeding at 0800 h and then at 1000 h, 1300 h and 1800 h, three times in the week (monday, wednesday and friday) via the canulae. The pH was measured immediately after sampling.

An aliquot of the sample (~ 250 g) was strained through a polyester monofilament fabric (250 µm mesh aperture) to separate the liquid phase. This strained rumen fluid was used for volatile fatty acids (VFA) analysis, but also for protozoa counts, as previously described (Popova *et al.*, 2011).

Another aliquot of the rumen contents (~ 250 g) was homogenized, for 3 min on ice, using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde Switzerland). Approximately 0.5 g were transferred to a 2 ml Eppendorf tube and mixed with 1 ml of RNeasy[®] Tissue Collection: RNA Stabilization Solution (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Tubes were kept at 4 °C overnight to allow the solution to thoroughly penetrate the cells, as suggested by the manufacturer, and stored at -80 °C until molecular analyses.

Dry matter (DM) of total rumen contents was determined by ashing at 103 °C for 24 h.

Total nucleic acids extraction and complementary DNA (cDNA) synthesis

Total nucleic acids (tNA) were extracted as described elsewhere (Popova *et al.*, 2010a). Each tNA sample was divided into two equal fractions; DNA in one of the fractions was digested with rDNase, RNase-free (from the Total RNA Isolation Kit, Machenery Nagel, France) using a modified protocol (Popova *et al.*, 2010a). The absence of DNA in the RNA sample was confirmed by the absence of PCR amplification using *mcrA* and bacterial *rrs* primers and PCR conditions described below. The yield and the purity of the extracted tNA and total RNA samples were assessed by optical density measurement using a NanoQuant Plate on an Infinity Spectrophotometer (TECAN, Switzerland). RNA integrity was estimated with the Agilent RNA 6000 Nano Kit on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) according to the manufacturer's recommendations. The indicators of RNA integrity used were the RIN (maximum value 10), the 23S rRNA/16S rRNA ratio (expected value 2) and the absence of degradation (low baseline) (Schroeder *et al.*, 2006).

Total RNA (1 µg) was reverse transcribed in cDNA using Random Primers (Promega, Madison, WI; USA) 0.5 µg µg⁻¹ RNA and AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) as already described (Popova *et al.*, 2011).

Microbial communities' quantification and gene expression

Microbial communities were quantified using qPCR assays targeting the *mcrA*, bacterial *rrs* and *Archaeal rrs* genes. Primers used are presented in Table 1. Reaction composition and

qPCR parameters for each assay are summarized in Table 2, as suggested by MIQE Guidelines for qPCR (Bustin *et al.*, 2009). Assays were set up in triplicate, using SYBR Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc.) and were carried out using a StepOne™ system (Applied Biosystems, France). Negative controls without DNA template were run with every assay to assess the overall specificity. The large number of samples required several qPCR amplifications. To compare between different qPCR reactions the baseline-corrected normalized reporter (ΔR_n) of the threshold cycle was manually fixed (Table 2) (Bustin *et al.*, 2009). Quantification results are expressed as copy numbers g^{-1} DM of rumen contents. Absolute quantification involved the use of standard curves that had been prepared with PCR products corresponding to partial sequence of *mcrA* gene of *Methanobrevibacter ruminantium* DSM 1093 and almost the entire sequence of *rrs* gene of *Methanobrevibacter smithii* 861 and *rrs* gene of *Prevotella bryantii* B14 (DSM 11371). Standard curves were created using triplicate 7 log dilution series for *mcrA* and bacterial *rrs* genes and 6 log dilution series for *Archaeal rrs* gene quantification (Table 2).

Changes in the expression of the functional *mcrA* gene in defaunated vs. faunated animals was assessed using relative quantification by the threshold cycle (C_T) of the qPCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Livak & Schmittgen, 2001). Bacterial *rrs* cDNA was used as the reference gene. Statistical analysis of gene expression was performed on the ΔC_T and $2^{-\Delta C_T}$ values as suggested by Schmittgen and Livak, (2008). Equations used were as follows:

$$\Delta C_T = (C_T \text{ cDNA } mcrA \text{ Tx} - C_T \text{ cDNA } rrs \text{ Tx})$$

$$2^{-\Delta C_T} = 2^{-(C_T \text{ cDNA } mcrA \text{ Tx} - C_T \text{ cDNA } rrs \text{ Tx})}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-[(C_T \text{ cDNA } mcrA - C_T \text{ cDNA } rrs) \text{ DF} - (C_T \text{ cDNA } mcrA - C_T \text{ cDNA } rrs) \text{ F}]}$$

with Tx - each time point in faunated [F] and defaunated [DF] animals.

Fold change in *mcrA* gene expression in defaunated animals was assessed by the equation: $-1/2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Schmittgen & Livak, 2008).

Microbial diversity analysis by PCR-DGGE

For PCR amplification, 50 ng of tNA samples and 5 μ l of cDNA samples were used. For the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profiling, a GC-clamp (40 bp) was added to the 5'-end of each of the forward primers used (Muyzer *et al.*, 1993). PCR amplification and DGGE analysis of the *mcrA* and *rrs* genes were conducted as already described (Popova *et al.*, 2011). Primers used in PCR amplification are listed in Table 1 and

PCR conditions were those of Luton *et al.*, (2002) and of Sadet *et al.*, (2007) for *mcrA* and the bacterial *rrs* gene respectively.

Individual PCR products for *mcrA* DNA and cDNA, obtained for each sampling time in each faunated and defaunated wether (n= 64) were analyzed by DGGE. In addition, *mcrA* PCR products from the 4 faunated and 4 defaunated wethers were pooled in equal quantities (100 µg each) by sampling time after individual PCR amplification (n=16) and loaded onto DGGE gels to assess community diversity changes by groups independently of individual variations.

For bacterial *rrs* DNA and cDNA fragments, only PCR products from 0800 and 1000 h sampling times were studied in DGGE.

Gels were silver stained using a commercial kit (BioRad Laboratories, USA). The large number of samples required several gels to carry out the study. To normalize for differences between gels, a sample from a wether outside the study was used as standard. The same *mcrA* or *rrs* PCR products of this sample were run on every gel and used as standard for comparison of gels. The percentage of similarity of standards between gels was 92.01 % for the *mcrA* and 84.88 % for bacterial *rrs*. Gel images were acquired using an optical density calibrated scanner (Epson Scanner; Epson France) at a spatial resolution of 600 dpi. Images were analyzed with GelCompar II version 4.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Banding profiles were quantified by determining the total number of bands, the peak surface of each band, and the sum of all the peak surfaces of all bands (Fromin *et al.*, 2002). This information was used to calculate the community biodiversity using three indices: the Shannon index, the dominance index; and the evenness index (Fromin *et al.*, 2002).

DGGE profiles were normalized and compared 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 and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA).

Clone library construction and phylogenetic analysis

The *mcrA* PCR products were pooled in equal quantities (100 ng each) by sample type (DNA or cDNA) and period (faunated or defaunated). Pooled samples (DNA Faunated, DNA Defaunated, cDNA Faunated and cDNA Defaunated) were used to create clone libraries using the pGEM-T Easy Vector System II (Promega, Madison, WI), according to manufacture's recommendations. About 10% of the color screened positive transformants were selected randomly and checked for the correct insert size via *mcrA* PCR amplification in the same conditions as described above. Clones were sequenced commercially by LGC Genomics GmbH Germany, using M13 forward primer.

The nucleotide sequences obtained in this study were aligned using CLUSTALW alignment program and used to generate DNA distance matrices using DNADIST program in PHYLIP software (Felsenstein, 2005). The matrices were introduced in MOTHUR (Schloss *et al.*, 2009) to define operational taxonomic units (OTU) in each library using the furthest neighbor method with a cutoff of 3% for species level. Collector's curves were constructed to evaluate libraries richness and libraries were compared using LIBSHUFF. Representative sequences for each OTU were determined in MOTHUR and translated using the EMBOSS Transeq tool of EMBL-EBI. Inferred amino acid sequences were aligned to partial MCR sequences downloaded from GenBank. Phylogenetic trees were constructed from the alignments in PHYLIP and bootstrap analysis using neighbor-joining was performed using 100 replicates.

Sequences have been submitted to GenBank under the accession numbers HQ658174-HQ658345.

Microarray analysis using a PhyloChip:

Four total RNA samples from two sheep from both faunated and defaunated periods were amplified by MessagAmp kit (Ambion, Austin, USA) according to manufacturer's recommendation. Then, 5 µg of aRNA were labelled with Cy5 Post-Labeling Reactive Dye Pack (GE Healthcare, Chalfont St. Giles UK) and 1 µg of each sample was hybridized on PhyloChip. The microarray targeted the *rrs* gene of 1800 bacterial genus. (Milton *et al.*, 2007 and reference1). The oligonucleotids were spotted on triplicate by Agilent, format of chip 4x44K (Agilent technology, Santa Clara, California). The hybridization and washing were done in accordance with Agilent procedure. The data were extracted using feature extraction software.

The Array design, protocol and experimental data of the PhyloChip can be accessed at the Gene Expression Omnibus (GEO) web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/geo/>).

Statistical Analysis

Data were analyzed using the MIXED Procedure of SAS v9 in repeated time, except for total CH₄ production, with animal considered as random effect. The model for kinetics study data (CH₄, VFA, rumen contents DM, pH) included defaunation treatment (trt), sampling day (d), sampling time (ti), d(trt) and trt*ti interactions as fixed effects. For total CH₄ production data, the model included trt, d, d(trt) interaction as fixed effects. Having no effect for d and d(trt), trt and ti effects were recalculated without these effects. Only results for trt, ti and trt*ti are represented here. The model for copy numbers of bacterial *rrs*, *Archaeal rrs* and *mcrA* genes and 2^{-ΔC_T} values, included trt, ti, and trt*ti interactions as fixed effects. The model for diversity indexes values included trt, ti, sample type (DNA or cDNA) (st) and trt*ti interactions as fixed effects. Effects were declared significant at $P \leq 0.05$ and tendencies at $0.1 \leq P \leq 0.05$.

Results and Discussion

Methane output and fermentation parameters

The absence of protozoa reduced by 10.7 % ($P < 0.05$) CH₄ production (l 14 h⁻¹) as compared to the same wethers before defaunation (Table 3). Our results are in agreement with previously published studies (Hegarty, 1999; Morgavi *et al.*, 2008; Morgavi *et al.*, 2010).

Total VFA concentrations were higher ($P < 0.01$) when protozoa were removed (Table 3). Defaunation induced an increase in propionate molar concentration ($P < 0.05$) with a concomitant decrease in butyrate concentration ($P < 0.01$) and had no effect on acetate ($P > 0.05$). This shift affected the acetate/propionate ratio that was higher in animals harboring protozoa ($P < 0.01$) (Table 3). Previous studies reported no change in total VFA concentration following defaunation (Morgavi *et al.*, 2008; Takenaka & Itabashi, 1995), but the shift in VFA patterns have already been described *in vitro* (Ranilla *et al.*, 2007) and *in vivo* (Morgavi *et al.*, 2008; Ozutsumi *et al.*, 2005). The higher concentration in acetate and butyrate in faunated animals can be directly attributed to protozoa, as these VFA are main products of their metabolism (Eugène *et al.*, 2004). Also, Jouany *et al.*, (1988) suggested that defaunation

promotes propionate production whatever the diet. A reduction in the acetate : propionate molar ratio has been described as a common feature of several CH₄ mitigation strategies such as defaunation (Morgavi *et al.*, 2008) or the use of antimethanogenic compounds (Denman *et al.*, 2007). This indicates a concurrent reduction of CH₄ formation and redirection of hydrogen from CH₄ to reduced short-chain fatty acids.

We also followed methane and VFA production kinetics and results are presented and discussed in the supplemented material.

Total nucleic acid extraction and total RNA isolation

Nucleic acid extraction was performed on total rumen contents which content in DM was similar in faunated and defaunated animals (Table 3). Mean yields of tNA or RNA extraction from rumen contents of defaunated animals (1308.57 µg g⁻¹ DM rumen contents and 54.63 µg g⁻¹ DM rumen contents respectively) were higher (P<0.01) than from faunated animals (955.39 µg g⁻¹ DM rumen contents and 34.43 µg g⁻¹ DM rumen contents respectively). However, there was no significant difference (P>0.05) in the amount of extracted RNA when expressed per µg of the tNA extracted (data not shown), attesting that DNA and RNA extractions are done with the same efficiency between samples. RNA integrity was checked using Agilent RNA 6000 Nano Kit. Results were analyzed using the Software 2100 Expert, version B.02.07.SI482 (Beta) (Agilent Technologies, France). Electropherograms presented two major peaks corresponding to the 16S and 23S ribosomal RNA (rRNA). Mean RIN was of 7.2 (± 0.37) and mean rRNA 16S / rRNA 23S ratio of 0.97 (± 0.22). It has been demonstrated that DNA extraction method can lead to bias on our knowledge of microbiota (Zoetendal *et al.*, 2001). As this study aimed at simultaneous monitoring of microbial community structure and gene expression, DNA/RNA co-extraction seemed to be indispensable. Good quality DNA/RNA extract is important for subsequent accurate quantification, diversity or gene expression studies (Bera-Maillet *et al.*, 2009).

Quantification and diversity analysis of the bacterial community

Absolute qPCR quantification results of the bacterial *rrs* gene are presented in Table 4. Defaunation resulted in significant increase in the rumen bacterial *rrs* copy numbers g⁻¹ DM of rumen contents (P<0.05).

Diversity indices, calculated from the *rrs* DNA and cDNA PCR-DGGE individual profiles were not influenced by defaunation ($P>0.05$), sampling time ($P>0.05$) or sample type ($P>0.05$), except for the evenness index which was higher ($P<0.05$) for cDNA samples in defaunated animals, 0.95 (± 0.02) vs. 0.93 (± 0.02) when compared to cDNA samples from faunated one (Table 4). Cluster analysis of PCR DGGE profiles of the bacterial *rrs* DNA and cDNA templates did not show a change in the bacterial community composition associated with defaunation (data not shown).

Enhance in bacterial numbers can be explained by the absence of the predator as protozoa are known to engulf bacteria. This is in agreement with previous results, showing that rumens that do not contain protozoa have enhanced total bacterial (Mosoni *et al.*, in press), but also cellulolytic and amylolytic bacterial populations (Mosoni *et al.*, in press; Ozutsumi *et al.*, 2006). However other studies (Yanez-Ruiz *et al.*, 2007) reported no difference in total bacterial DNA between faunated and defaunated lambs. The absence of change in the diversity of the bacterial population between faunated and defaunated animals has already been reported (Mosoni *et al.*, in press; Whitelaw *et al.*, 1984). In contrast other studies, on cattle (Ozutsumi *et al.*, 2005) or lambs (Yanez-Ruiz *et al.*, 2007), showed different bacterial communities in faunated and protozoa free animals. The contradictory results on total bacteria quantification or diversity can be explained by different experimental designs. Our wethers were successively defaunated, as lambs in Yanez-Ruiz *et al.*, (2007) or cattle in Ozutsumi *et al.*, (2005) studies have been kept protozoa free from birth and have never been exposed to protozoa. Mosoni *et al.*, (in press) reported no changes in DGGE profiles of the total bacterial community in defaunated animals after refaunation. However authors observed a clear negative effect of protozoa on growth of *Ruminococcus flavefaciens* and *Ruminococcus albus*, two rumen cellulolytic bacteria. Protozoa presence or absence probably influence bacterial community composition, but changes are rather in the species pool size than in the species composition.

Further insight into the bacterial diversity in faunated and defaunated animals was obtained using DNA microarrays. A mean of 169 (± 1.9) different sequences were detected in each sample, which is similar to the estimate of Edwards *et al.*, (2004) of 177 OTUs. In all four samples, the predominant phyla were those of *Actinobacteria* (41 % $\pm$ 1%) and *Proteobacteria* (37 % $\pm$ 2%), followed by *Firmicutes* (15% $\pm$ 0.17%). The predominance of *Actinobacteria* was not probably observed and may be explained by the selectivity of the

probes. In fact our microarray has been designed 3 years ago based on the available 16S rRNA sequences at that time. Before results analysis we checked probes specificity on the Ribosomal Database Project (RDP) website and noticed several incongruent with previously found affiliations. No specific probes were eliminated. Other studies reported that the most predominant phyla in the rumen were *Firmicutes* followed by *Bacteroidetes* and *Proteobacteria* (Kim *et al.*, 2011). However, this latter study used all the published sequences in the RDP (Ribosomal Database project) database without distinguishing between ruminant species, geographical location or diet. Brulc *et al.*, (2009) reported a great variation in taxonomy distribution of sequences in the rumen of tree steers fed the same diet: in two of the animals more than half of the sequences were affiliated to the *Firmicutes*, whereas in the third animal, *Proteobacteria* was the predominant phylum. Authors concluded that even though the three animals were fed the same diet, the community structure, predicted phylotype, and metabolic potentials in the rumen were markedly different with respect to nutrient utilization.

We did not notice changes in the bacterial diversity in the absence of protozoa. However a perceptible variation in the signal intensities between faunated and defaunated state of the animals was observed (data not shown). It is possible that the small number of samples used in this analysis (2 “faunated” and 2 “defaunated”) did not allow us to detect significant changes in the ruminal flora.

Quantification, metabolic activity and diversity of methanogenic *Archaea*

The population of methanogenic *Archaea* was significantly higher ($P < 0.05$) in animals not harboring protozoa as compared to the same animals before defaunation. Our results are in agreement with those of Mosoni *et al.*, (in press), but on the contrary of other studies where the number of methanogens decreased (Takenaka & Itabashi, 1995) or did not change when protozoa were removed (Ohene-Adjei *et al.*, 2007). So the decrease in CH₄ emissions, we observed with defaunated animals, could be the result of a shift in the methanogenic community composition towards less active or less efficient in CH₄ production members. This supports the observations of Newbold *et al.*, (1995) who suggested that the number of methanogenic *Archaea* and CH₄ production are not closely linked.

We studied the *mcrA* gene expression using the $\Delta\Delta C_T$. A Student's test was applied to the bacterial *rrs* cDNA 2^{-C_T} values (data not shown). Results showed that *rrs* gene expression remained unchanged over the day in faunated and defaunated animals, so we used it as an

external reference gene to assess changes in the expression of *mcrA* gene. In faunated animals ΔC_T values were higher ($P < 0.05$) and $2^{-\Delta C_T}$ values tended to be higher ($P = 0.09$), as compared to the same animals after protozoa removal (Table 4). There was a 2.5 fold decrease in *mcrA* expression in defaunated animals as compared to the same animals before protozoa removal. This supports the data obtained in previous studies using coconut oil and defaunation (Machmüller *et al.*, 2003) or plant extracts (Guo *et al.*, 2008) to decrease methanogenesis, where no direct effect on the methanogenic community members was noticed, but methane reduction was accompanied with decrease in methanogens activity. Methanogenic *Archaea* have been observed in ecto- (Stumm *et al.*, 1982) and endosymbiotic (Finlay *et al.*, 1994) relationships with rumen ciliates. Association between methanogens and ciliates seems to be controlled by H_2 accessibility in the rumen (Stumm *et al.*, 1982).

As for bacteria, there was no significant difference in diversity indices obtained from the PCR-DGGE individual profiles, except for the evenness index which was higher ($P < 0.05$) in faunated animals (Table 5), indicating an over-representation of certain bands. Similar to these results, cluster analysis of *mcrA* DNA and cDNA PCR-DGGE individual profiles indicated no differences in methanogens community composition associated with presence/absence of protozoa, or sampling time (data not shown). DGGE profiles of samples pooled by sampling time are presented in Figure 1. When the clustering analysis was applied, the dendrogram obtained had two main nodes. One of them grouped the *mcrA* DNA samples and the other one the *mcrA* cDNA samples. Comparing *mcrA* DNA and cDNA profiles of pooled samples showed differences between templates, suggesting a difference between present and metabolically active methanogens. Also, some of the bands retrieved in cDNA profiles were not found in DNA profiles, suggesting the presence of small methanogenic population that is highly metabolically active. In our study, DGGE profiles of the *mcrA* sequences resulted in low number of bands (Table 5). A DGGE monitoring of the 16S rDNA sequences of *Archaea* in Venezuela sheep revealed 14 different bands (Wright *et al.*, 2008) suggesting a poor methanogenic community.

Globally, the community composition did not change after defaunation, even if some species were found only in faunated or defaunated animals. Previous studies have shown that population changes following defaunation seem to develop slowly, as a decrease in methanogens' diversity was observed only in long term defaunated (2 years) animals

(Morgavi *et al.*, 2006). At the beginning of the “defaunated” period of our experiment, animals were protozoa free for approximately 3 months.

Phylogenetic analysis of *mcrA* sequences

Four clone libraries were constructed using PCR amplicons generated from primers targeting the *mcrA* gene: DNA Faunated (72 sequences, 32 OTU), DNA Defaunated (79 sequences, 27 OTU), cDNA Faunated (24 sequences, 11 OTU), cDNA Defaunated (15 sequences, 13 OTU). Collector’s curves for the DNA libraries reached the horizontal asymptote showing that the number of sequenced clones was sufficient to assess the whole community diversity. This was not the case in the cDNA libraries therefore these results will be no further presented and discussed. DNA Faunated and DNA Defaunated libraries comparison using the Libshuff method showed significant difference ($P < 0.025$) between libraries.

Deduced amino acid sequence similarity searches revealed that most of the sequences from both libraries were closely related (93 % -100 %) to recently published uncultured rumen isolates from the rumen of sheep (Denman *et al.*, 2007), cow (Tatsuoka *et al.*, 2004) and wallaby (Evans *et al.*, 2009), as well as to several unpublished sequences from faunated and unfaunated bovine rumen (submitted to GenBank by Ozutsumi *et al.*, 2006). Phylogenetic relationship of the clones, based on their amino acid sequences is presented in Figure 2. Phylogenetic trees were constructed for both nucleic and amino acid sequences with or without sequences from the cDNA library. No major differences were observed in the clustering pattern between the constructed trees (data not shown). Clustering pattern did not revealed *mcrA* sequences specific to the Faunated or Defaunated DNA library (Figure 2). Examination of the OTU showed that for both libraries 60 % of the sequences clustered either with the *Methanobacteriales* or *Methanomicrobiales* orders. Members of the *Methanobacteriales* in the Faunated library represented 35 % of the clones, and their abundance increased to 64 % in the second clone library generated from the same animals after defaunation. Inversely, *Methanomicrobiales* represented 25 % in the Faunated library and 10 % in the Defaunated one. Approximately 8 % from the clones of the faunated library and 9 % of the clones from the Defaunated library were closely related (92 % - 96%) to the *mrtA* gene of uncultured archaeon. This cluster also grouped OTU (represented by the following sequences : DNA F D09 and H02 and DNA DF CO3 and D05) similar (95% - 97

%) to the deduced amino acid sequence of the *mcrA* gene of rumen isolates from the wallaby (Evans *et al.*, 2009). *Methanobrevibacter* strains belonging to the *Methanobacteriales* order accounted for the majority of the methanogens in rumen of cattle and sheep across three continents (Wright *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007). The majority of protozoan-associated *Archaea* can be placed in the same three genus-level groups found to dominate the total rumen *Archaea*, the genera *Methanobrevibacter* and *Methanomicrobium* and the RCC clade (Janssen & Kirs, 2008). Machmüller *et al.*, (2003) supposed that in the absence of protozoa, the proportion of *Methanobacteriales* will decrease for the benefit of *Methanomicrobiales*, which seem to be essentially free living. This statement is on the contrary of our results and data from 3 other studies showing notable variations in the abundance of different groups of protozoan-associated *Archaea*. Members of the *M. ruminantium* clade were abundant (62.6%) in the study reported by Chagan *et al.* (1999) while *Methanomicrobium* spp. dominated in the study of Regensbogenova *et al.* (2004b) and members of the RCC clade dominated in the study of Ohene-Adjei *et al.* (2007). The diversity of free-living or protozoa associated methanogens is probably influenced by other factors such as diet or physiology of the host animal. This is supported by Christophersen *et al.* (2004) who suggested that in some individual animals, the free-living and protozoan-associated *Archaea* appeared to belong to the same species but that in other individuals they did not.

In our study elimination of protozoa from the rumen of sheep resulted in changes in the *Archaeal* community but it was not clear if this was due to the disappearance of protozoan-associated methanogens or due to broader changes in rumen function as a result of defaunation that, in turn, affected the total *Archaeal* community structure. However methanogenic *Archaea* were less active in the rumen of sheep not harboring protozoa as compared to the same animals before defaunation. This suggests a pivotal role of hydrogen availability in methane production. For better understanding of the microbial mechanisms involved, one should explore the balance between hydrogen producers and non-hydrogen producers in the microbial community of the rumen. This involves considering the rumen ecosystem as a whole. Future CH₄ mitigation strategies should therefore aim either at decreasing H₂ production in the rumen or finding a new hydrogen sink.

Acknowledgements

This experiment has been granted by INRA and the regional council of the French “Auvergne” region. The authors greatly thank the staff of the animal experimental facilities of the INRA’s Herbivores Research Unit for animal care, S. Alcouffe and M. Fabre for help in defaunation and sampling, as well as D. Graviou, G. Gentes and Y Rochette for help in sample analysis. M. Popova is the recipient of INRA – Région Auvergne scholarship.

Figure legends

Figure 1 Cluster analysis of *mcrA* pooled PCR-DGGE profiles. Scale bars indicate similarity among profiles calculated with the Pearson product–moment correlation coefficient. The clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). Sample type – *mcrA* DNA or cDNA sequences, treatment – faunated (F) or defaunated (Archer & Powell) animals, sampling time – 0800 h (before feeding), 1000h, 1300h, 1800h.

Figure 2. Phylogenetic placement of inferred amino acid sequences for the *mcrA* gene. GenBank accession numbers are presented in brackets for those sequences used. Only sequences from the Faunated (F) and Defaunated (Archer & Powell) DNA clone libraries are presented here. Sequences in bold are representative of the corresponding OTU and annotations in brackets after the sequence name represent the total number of sequences in the OUT with a cutoff of 3%. Points indicate bootstrap values ≥ 70 % based on 100. *Methanopyrus kandleri* was used as an outgroup reference. Scale bar represents 0.1 amino acid substitutions per site.

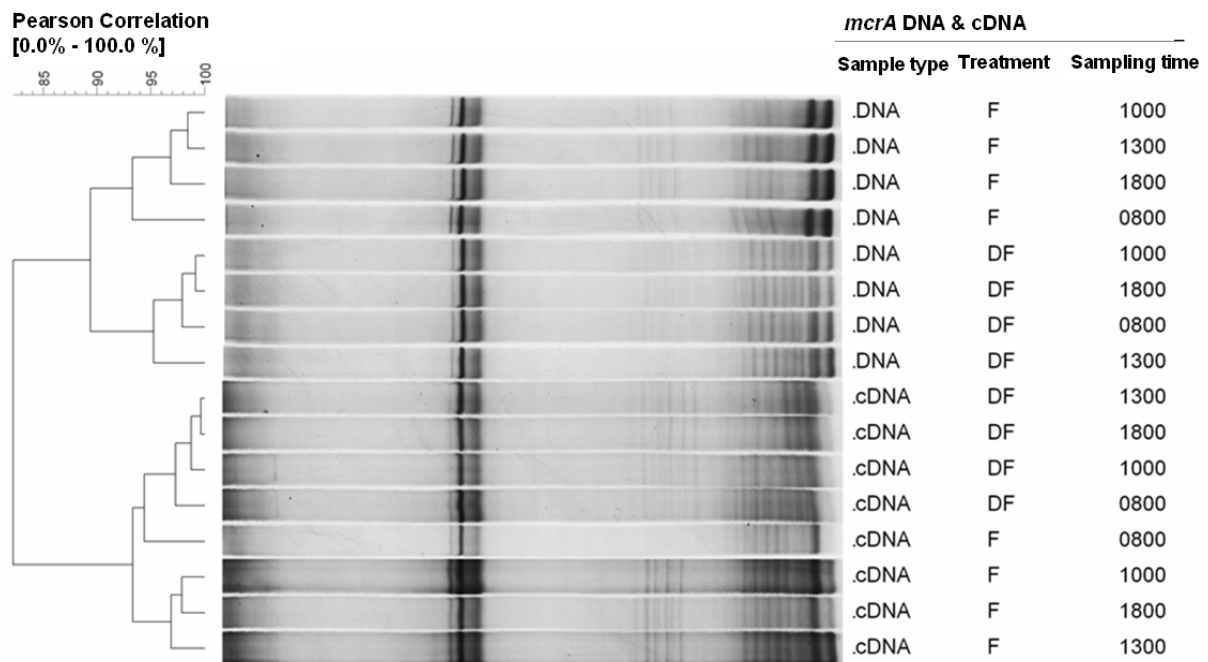


Figure 1.

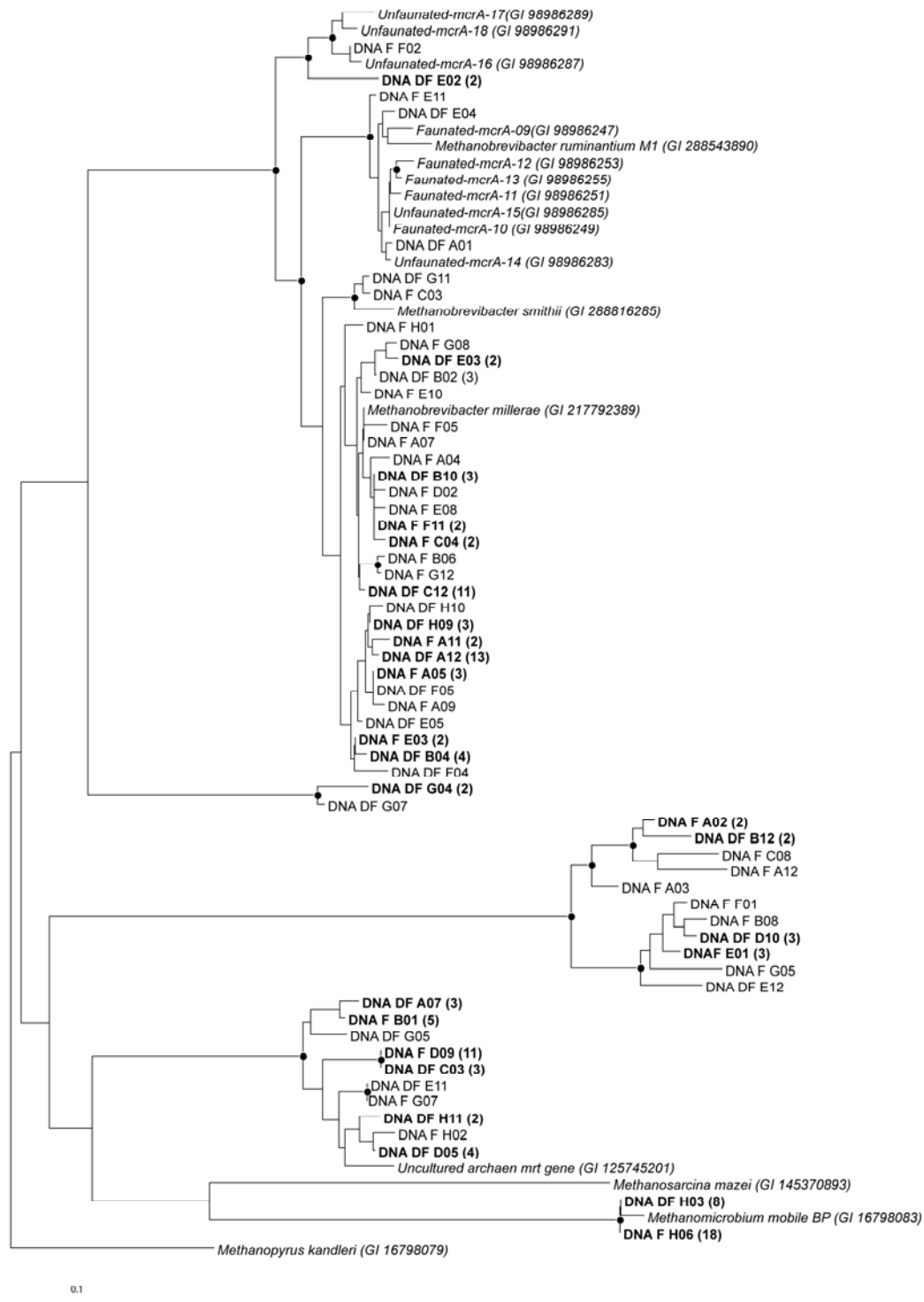


Figure 2

Tables

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Primers name	Oligonucleotide Sequences	Target	Experiment	Reference
534R	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG	<i>rrs</i>	PCR-DGGE	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
341f	5'-(GC)-CC TAC GGG AGG CAG CAG	<i>Bacteria</i>		
<i>mcrAr</i>	5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT	<i>mcrA</i>	PCR-DGGE	(Luton <i>et al.</i> , 2002)
<i>mcrAf</i>	5'-(GC)-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR	Methanogenic		
	TAY GCW ACA GC	<i>Archaea</i>		
q <i>mcrA</i> -R	5'-GBARGTCGWA WCCGTAGAATCC	<i>mcrA</i>	qPCR	(Denman <i>et al.</i> , 2007)
q <i>mcrA</i> -F	5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC	Methanogenic <i>Archaea</i>		
799R2	5'-AACAGGATTAGATACCCCTG	<i>rrs</i>	qPCR	(Edwards <i>et al.</i> , 2007)
520F	5'-AGCAGCCCGCGTAAT	<i>Bacteria</i>		
1406-1389R	5'-AGGAATTGGCGGGGGAGCAC	<i>rrs</i>	qPCR	(Ohene-Adjei <i>et al.</i> , 2007)
896-915F	5'-GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA	<i>Archaea</i>		

Table 2. Reaction set up for qPCR assays and validation parameters following MIQE guidelines

	<i>mcrA</i>	<i>rrs Bacteria</i>	<i>rrs Archaea</i>
Reaction volume (μl)	25	20	20
MgCl ₂ (mM)	1	/	/
Primers (μM)	0.3	0.3	0.5
SYBR Premix Ex Taq TM 2X (μl)	12.5	7.5	7.5
H ₂ O mQ (μl)	<i>qs 25</i>	<i>qs 20</i>	<i>qs 20</i>
Initial denaturation step	50 °C for 2 min 95°C for 1 min	95°C for 1 min	95°C for 1 min
Termocycles	95°C for 15 s; 60 °C for 1 min	95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min	95 °C for 15 s, 63 °C for 15 s; 72 °C for 30 s
Dissociation curve analysis	0.4°C min ⁻¹ from 60 to 95°C	0.6 °C min ⁻¹ from 60 to 95°C	0.6 °C min ⁻¹ from 65°C to 96°C
Amplification efficiency %	94.99 (±1.91)	94.02 (±2.8)	97.97 (±0.03)
Slope ¹	-3.456 (±0.05)	-3.465 (±0.073)	-3.372 (±0.001)
R ^{2 2}	0.999 (±0.001)	0.996 (±0.003)	1 (±0.001)
ΔRn of the threshold cycle ³	31961	27352	17270
Standard curves	2.5 × 10 ² to 2.5 × 10 ⁹	1 × 10 ² to 1 × 10 ⁹	1 × 10 ³ to 1 × 10 ⁸

¹ Regression coefficient calculated from the regression line in the standard curve² R² value indicates the closeness of fit between the standard curve regression line and the individual Cr data points from the standard reactions³ Baseline-corrected normalized reporter of the threshold cycle (ΔRn (cycle) = Rn (cycle) – baseline, where Rn = normalized reporter)

Table 3 Methane emissions and fermentation parameters in faunated and defaunated sheep

Item	Treatment	Sampling time				Mean	SEM	Effect	
		0800h	1000h	1300h	1800h			Trt	Time
Methane l 14 h⁻¹	Faunated	/	/	/	/	31.62	1.91	<0.05	/
	Defaunated	/	/	/	/	28.56			/
VFA mM	Faunated	56.81a	107.18b	99.63b	86.26c	87.47	4.26	<0.01	<0.01
	Defaunated	65.01a	118.02b	118.97 b	102.77 c	101.19			NS
Acetate %^a	Faunated	69.04a	67.15b	69.81a	71.66c	69.41	0.94	NS	<0.01
	Defaunated	67.44a	67.76a	69.02b	70.35c	68.64			
Propionate %^a	Faunated	15.83a	20.55b	17.67b	15.78ac	17.46	0.56	<0.05	<0.01
	Defaunated	18.29a	19.79b	19.82b	18.17ac	19.02			<0.05
Acetate/Propionate	Faunated	4.37a	3.27b	3.96c	4.55a	4.04	0.16	<0.01	<0.01
	Defaunated	3.74a	3.23b	3.54c	3.93a	3.61			
Butyrate %¹	Faunated	10.08a	9.70b	10.53a	10.25a	10.14	0.39	<0.01	NS
	Defaunated	8.62a	8.02b	8.96a	9.08a	8.67			
Minor VFA %^{1 2}	Faunated	5.05a	2.60b	1.88c	1.84c	2.84	0.90	NS	<0.01
	Defaunated	4.51a	2.66b	2.31b	2.27b	2.94			
Dry Matter of rumen contents %	Faunated	14.16a	20.89b	18.71c	15.38a	17.29	0.26	NS	<0.01
	Defaunated	14.90a	18.74b	18.09b	15.80a	16.89			
pH of rumen contents	Faunated	6.76a	6.29b	5.99c	6.01c	6.26	0.04	NS	<0.01
	Defaunated	6.77a	6.24b	5.93c	5.99c	6.23			NS

¹ mM of individual VFA per mM of total VFA produced² minor VFA – valerate, iso-valerate, iso-butyrate, caproate

(a, b, c) Different letters within the same treatment indicate significant differences between the sampling times P<0.05.

Table 4 Microbial numbers and gene expression in faunated and defaunated wethers

Item	Treatment	Sampling time				Mean	SEM	Effect	
		0800h	1000h	1300h	1800h			Trt	Time Trt*Time
Ciliates ml ⁻¹ ($\times 10^6$)	Faunated	1.51	1.14	1.43	1.41	1.37	0.16	/	NS /
Log ₁₀ (<i>mcrA</i> copies g ⁻¹ DM ¹)	Faunated	9.23	9.12	9.28	9.2	9.21	1.2	<0.05	NS NS
	Defaunated	9.51	9.49	9.48	9.45	9.48			
Log ₁₀ (<i>Archaeal rrs</i> copies g ⁻¹ DM ¹)	Faunated	8.8	8.59	8.81	8.89	8.77	0.1	<0.01	NS NS
	Defaunated	9.45	9.43	9.38	9.49	9.44			
Log ₁₀ (bacterial <i>rrs</i> copies g ⁻¹ DM ¹)	Faunated	11.40	11.41	11.27	11.57	11.41	0.07	<0.05	NS NS
	Defaunated	11.71	11.65	11.66	11.78	11.7			
ΔC_T ²	Faunated	12.36	13.37	12.31	13.26	12.83	0.36	0.02	0.03 NS
	Defaunated	13.51	15.14	14.19	13.71	14.14			
2 ^{-ΔC_T} ($\times 10^5$)	Faunated	26.5	12.3	29.7	91.0	19.4	5.0	0.09	0.04 NS
	Defaunated	8.6	2.9	7.2	8.1	6.7			

¹DM dry matter of rumen contents² $\Delta C_T = (C_T \text{ } mcrA \text{ Tx} - C_T \text{ bacterial } rrs \text{ Tx})$, Tx – sampling time

Table 5 Diversity indices calculated from individual PCR DGGE profiles of the *mcrA* (n = 64) and the *rrs* (n = 16) genes

Item	Treatment	Sample type		SEM	Trt	Sample	Effect	
		DNA	cDNA				Trt*Time	Trt*Sample
<u>DGGE diversity in <i>mcrA</i> profiles</u>								
Shannon diversity index	Faunated	0.95	0.89	0.042	NS	NS	NS	NS
	Defaunated	0.88	0.87					
Dominance index	Faunated	0.12	0.14	0.014	NS	NS	NS	NS
	Defaunated	0.14	0.15					
Evenness index	Faunated	0.93	0.95	0.024	$P<0.01$	NS	NS	NS
	Defaunated	0.90	0.91					
Bands number	Faunated	10.70	9.06	0.99	NS	NS	$P<0.05$	NS
	Defaunated	9.93	9.25					
<u>DGGE diversity in <i>rrs</i> profiles</u>								
Shannon diversity index	Faunated	1.49	1.55	0.045	NS	NS	NS	NS
	Defaunated	1.48	1.48					
Dominance index	Faunated	0.039	0.034	0.004	NS	NS	0.08	NS
	Defaunated	0.042	0.039					
Evenness index	Faunated	0.91	0.93	0.009	NS	0.06	NS	$P<0.01$
	Defaunated	0.91	0.95					
Bands number	Faunated	43.75	47.75	3.981	NS	NS	NS	NS
	Defaunated	44.63	37.87					

Ruminal protozoa increase sheep methane emissions by stimulating methanogens metabolic activity

Milka Popova¹, Cécile Martin¹, Ourdia Bouzid², Pierre Peyret³, Corinne Petit³, Diego. P. Morgavi^{1*}

SUPPLEMENTARY INFORMATION

***Archaeal* community dynamics and fermentation kinetics in the rumen of faunated and defaunated sheep**

In order to follow methane production kinetics, animals were fitted with rumen gas canulae (Jouany and Senaud, 1979) allowing repeated gas sampling directly in the rumen. Gas samples were taken 10 times daily at 0800 hours (before feeding), 0900, 1000, 1100, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2200 hours in Venojet glass dry vacuum tubes (Terumo Corporation, Leuven, Belgium) and transported immediately to the laboratory for analysis by gas chromatography, as described.

The kinetics of CH₄ production are shown in Figure S1A. The curves remained the same independently of the presence or absence of protozoa ($P>0.05$). Production of CH₄ peaked 1 h after feeding with a three-fold increase as compared to production before feeding. Hourly emissions slowly decreased afterwards. The same patterns of postprandial CH₄ production were obtained by respiratory chambers (Denman *et al.*, 2007; Whitelaw *et al.*, 1984) and on field measures (Harper *et al.*, 1999). It has been shown that the periodicity in CH₄ production reflects ruminating and feeding activity (Harper *et al.*, 1999). The high rate of CH₄ production is associated with the new income of feed components with readily fermentable soluble carbohydrates and the lower steady rates – with the fermentation of the insoluble part (cellulose). The presence or absence of protozoa did not influence fermentation kinetics, but only the total amount of CH₄ produced on the 14 hours, which was lower in defaunated than in faunated animals. This confirms the strong positive interaction between protozoal numbers and CH₄ emissions (Morgavi *et al.*, 2010).

Total VFA concentration marked a two-fold increase 2 h after feeding and as for CH₄, production kinetics were not influenced by defaunation ($P<0.05$) (Table 3). The molar proportions of acetate and propionate were respectively lower and higher 2 hours after feeding

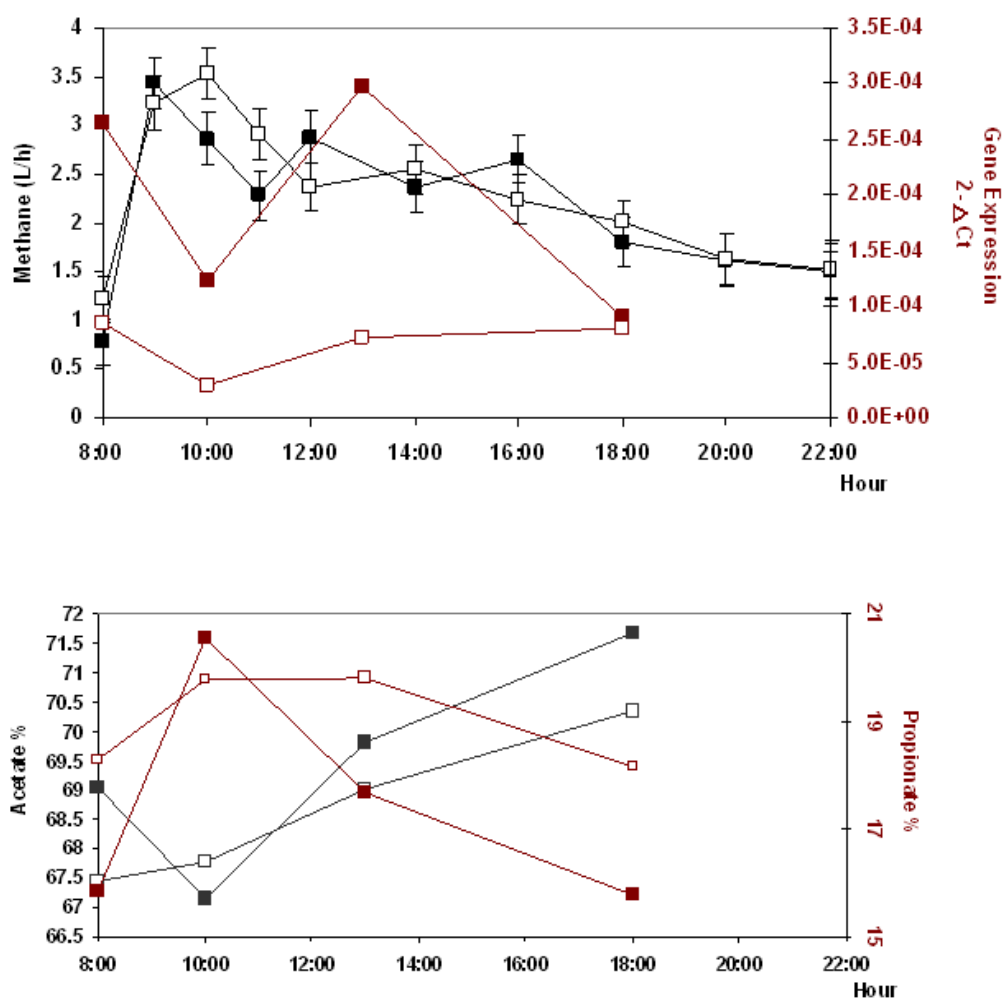
(at the pick of CH₄ production) as compared to proportions before feeding (Figure S1B). These results are in agreement with observation of Janssen (2010) who concluded that rumen fermentations and methane productions are regulated by the availability of the hydrogen substrate. When readily fermentable organic matter is available, rumen fermentation is most active and there are important quantities of hydrogen produced. Higher hydrogen concentrations would stimulate hydrogenotrophic pathways (propionate production and methanogenesis mainly) but would also have an inhibitory effect on hydrogen producing pathways (acetate synthesis mainly) (Janssen, 2010).

Methanogenic *Archaea* populations in the faunated and defaunated animals showed no significant change in numbers across the 14-h monitoring period, which is consistent with previous studies (Denman *et al.*, 2007). We noticed a slight decrease in expression dynamics of *mcrA* two hour after feeding, though changes were not significant (Figure S1A). Lower methanogenic activity may be due to the deviation of hydrogen substrate to propionate production. Though CH₄ production peaked with the arrival of new organic matter, its proportion may be small in the total amount of fermentation products (Janssen, 2010).

Figure Legends

Figure S1 Kinetics of fermentation parameters and *mcrA* gene expression in faunated (full symbols) and defaunated (empty symbols) sheep fed once daily at 0800h.

A. Methane production in the rumen and *mcrA* gene expression; B Acetate and propionate concentration as % of total VFA. Time points with a different letter, within the same curve, are significantly different ($P < 0.05$). Values are mean of 20 observations (4 animals and 5 sampling days), vertical bars represent the SEM.



Cited Literature

Archer DB, Powell GE (1985). Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen. *Archives of Microbiology* 141: 133-137.

Bera-Maillet C, Mosoni P, Kwasiborski A, Suau F, Ribot Y, Forano E (2009). Development of a RT-qPCR method for the quantification of *Fibrobacter succinogenes* S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *Journal of Microbiological Methods* 77: 8-16.

Brulc JM, Antonopoulos DA, Berg Miller ME, Wilson MK, Yannarell AC, Dinsdale EA et al (2009). Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 1948-1953.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments in *Clinical Chemistry* 55: 611-622.

Chagan I, Tokura M, Jouany J-P, Ushida K (1999). Detection of methanogenic *Archaea* associated with rumen ciliate protozoa. *The Journal of General and Applied Microbiology* 45: 305-308.

Christophersen CT, Wright A-D, Vercoe PE (2004). Examining diversity of free-living methanogens and those associated with protozoa in the rumen. *Journal of Animal and Feed Sciences* 13: 51-54.

Denman SE, Tomkins NW, McSweeney CS (2007). Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 313-322.

Edwards JE, Huws SA, Kim EJ, Kingston-Smith AH (2007). Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 323-35.

Edwards JE, McEwan NR, Travis AJ, John Wallace R (2004). 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86: 263-281.

Eugène M, Archimède H, Sauvant D (2004). Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science* 85: 81-97.

- Evans PN, Hinds LA, Sly LI, McSweeney CS, Morrison M, Wright A-DG (2009). Community Composition and Density of Methanogens in the Foregut of the Tammar Wallaby (*Macropus eugenii*). *Applied and Environmental Microbiology* 75: 2598-2602.
- Felsenstein J. (2005). Distributed by the author.
- Finlay BJ, Esteban G, Clarke JK, Williams GA, Embley TM, Hirt RP (1994). Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 117: 157-161.
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N et al (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4: 634-43.
- Guo YQ, Liu JX, Lu Y, Zhu WY, Denman SE, McSweeney CS (2008). Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 47: 421-426.
- Hegarty RS (1999). Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research* 50: 1321-1328.
- Janssen PH, Kirs M (2008). Structure of the *Archaeal* Community of the Rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 3619-3625.
- Johnson K, Huyler M, Westberg H, Lamb B, Zimmerman P (1994). Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science & Technology* 28: 359-362.
- Johnson KA, Johnson DE (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 2483-2492.
- Jouany JP, Demeyer DI, Grain J (1988). Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 21: 229-265.
- Jouany JP, J S, J L, A V (1979). Défaunation du rumen de mouton. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 19: 619-624.
- Kim M, Morrison M, Yu Z (in press). Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- Luton PE, Wayne JM, Sharp RJ, Riley PW (2002). The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521-3530.

Machmüller A, Soliva Carla R, Michael K (2003). Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition Development*. 43: 41-55.

Martin C, Morgavi DP, Doreau M (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351-365.

Martin C, Rouel J, Jouany JP, Doreau M, Chilliard Y (2008). Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*.: 2007-0774.

McSweeney C, Kang S, Gagen E, Davis C, Morrison M, Denman S (2009). Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38: 341-351.

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: 6906-10.

Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1024-1036.

Morgavi DP, Jouany JP, Martin C (2008). Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 69-72.

Morgavi DP, Jouany JP, Martin C, Ranilla MJ (2006). *Archaeal* community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. *International Congress Series* 1293: 127-130.

Mosoni P, Martin C, Forano E, Morgavi DP (in press). Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science*.

Newbold CJ, Lassalas B, Jouany JP (1995). The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Letters in Applied Microbiology*. 21: 230-234.

Ohene-Adjei S, Teather RM, Ivan M, Forster RJ (2007). Postinoculation Protozoan Establishment and Association Patterns of Methanogenic *Archaea* in the Ovine Rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4609-4618.

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: 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: 158-162.
- Popova M, Martin C, Eugène M, Mialon MM, Doreau M, Morgavi DP (in press). Diet composition influences methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Animal Feed Science and Technology*.
- Popova M, Martin C, Morgavi DP (2010). Improved protocol for high-quality co-extraction of DNA and RNA from rumen digesta. *Folia Microbiologica (Praha)* 55: 368-72.
- Ranilla MJ, Jouany JP, Morgavi DP (2007). Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. *Letters in Applied Microbiology*. 45: 675-80.
- Regensbogenova M, Pristas P, Javorsky P, Moon-van der Staay SY, Van Der Staay GWM, Hackstein JHP et al (2004). Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology* 39: 144-147.
- Rouviere PE, Wolfe RS (1988). Novel biochemistry of methanogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 7913-6.
- Sadet S, Martin C, Meunier B, Morgavi DP (2007). PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1: 939-944.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB et al (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7537-7541.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols*. 3: 1101-8.
- Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M et al (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*. 7: 3.
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, de Haan C (eds) (2006) *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Stumm CK, Gijzen HJ, Vogels GD (1982). Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition* 47: 95.

Takenaka A, Itabashi H (1995). Changes in the population of some functional groups of rumen bacteria including methanogenic bacteria by changing the rumen ciliates in calves. *Journal of General and Applied Microbiology* 41: 377-387.

Tatsuoka N, Mohammed N, Mitsumori M, Hara K, Kurihara M, Itabashi H (2004). Phylogenetic analysis of methyl coenzyme-M reductase detected from the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* 39: 257-260.

Whitelaw FG, Eadie JM, Bruce LA, Shand WJ (1984). Methane formation in faunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions. *British Journal of Nutrition* 52: 261-275.

Wright A-D, Ma X, Obispo N (2008). *Methanobrevibacter* Phylotypes are the Dominant Methanogens in Sheep from Venezuela. *Microbial Ecology* 56: 390-394.

Wright A-DG, Auckland CH, Lynn DH (2007). Molecular Diversity of Methanogens in Feedlot Cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied Environmental Microbiology*. 73: 4206-4210.

Wright A-DG, Toovey AF, Pimm CL (2006). Molecular identification of methanogenic *Archaea* from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel *Archaea*. *Anaerobe* 12: 134-139.

Yanez-Ruiz DR, Williams S, Newbold CJ (2007). The effect of absence of protozoa on rumen biohydrogenation and the fatty acid composition of lamb muscle. *British Journal of Nutrition* 97: 938-48.

Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans ADL, Abee T, de Vos WM (2001). DNA Isolation Protocols Affect the Detection Limit of PCR Approaches of Bacteria in Samples from the Human Gastrointestinal Tract. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 405-410.

X.2. DEUXIEME EXPERIMENTATION

Effets de la nature du concentré sur la communauté méthanogène du rumen et du cæcum chez l'agneau à l'engraissement

La nature et la quantité d'amidon alimentaire peuvent influencer l'efficacité et le site de la digestion des aliments chez les ruminants (Huntington et al., 2006). Notamment un effet négatif sur la digestion des fibres est observé avec des rations riches en céréales ; cet effet est accentué avec des céréales riches en amidon rapidement dégradable (ARD) (blé, orge) comparé à l'amidon lentement dégradable (ALD) (maïs) (Martin et al., 1999). Néanmoins, avec l'ARD, une compensation post-ruminale de la digestion des fibres a été observée (Martin et al., 1999).

Si l'effet de la quantité d'amidon dans la ration sur la méthanogenèse est relativement bien connu, celui de l'effet de la nature de la céréale ne l'est pas. Un seul essai conduit sur taurillons à l'engraissement a montré que le rendement en méthane (CH_4 g/kg MSI) était 30% plus faible chez les animaux consommant de maïs comparé à ceux consommant de l'orge (Beauchemin & McGinn, 2005). Alors qu'on aurait pu s'attendre à l'inverse. En revanche l'impact de la nature de l'amidon sur la sur les *Archaea* méthanogènes du rumen et du cæcum reste encore mal connu

Dans cette expérimentation, nous avons utilisé deux types de céréales, blé et maïs pour déplacer le site de digestion des parois végétales. Notre hypothèse de départ était que la diminution de la méthanogenèse avec des céréales riches en ALD est probablement partiellement compensée par une production de méthane plus importante au niveau du cæcum. Le cæcum constitue, en effet, dans le tube digestif des ruminants, un deuxième compartiment où la digestion est d'origine microbienne. Ainsi le premier objectif de cette étude était de décrire en termes de structure et activité la communauté méthanogène dans les deux fermenteurs digestifs. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux effets de la nature du concentré sur les *Archaea* du rumen, afin d'expliquer les variations dans la production de méthane.

Nous avons travaillé avec deux lots de six agneaux nouveaux nés. Après la mise-bas, les brebis de chaque lot ont été progressivement adaptées à des rations riches soit en blé soit en maïs, de façon à ce que les agneaux ne connaissent qu'un seul aliment concentré. Après sevrage, les agneaux ont été à leur tour progressivement adaptés aux deux régimes

riches en céréale. La production de méthane *in vivo* par les deux lots a été mesurée après 21 semaines d'engraissement. Les agneaux ont ensuite été abattus à poids égal et des échantillons représentatifs de contenus ruminal et caecal ont été prélevés.

Nous avons comparé, par des incubations *in vitro* le potentiel méthanogène des contenus ruminal et caecal. Parallèlement, des liquides filtrés de chaque contenu digestif ont été incubés en présence de maïs ou blé finement broyé afin d'estimer leur capacité à dégrader le substrat. Les communautés bactérienne et méthanogène ont été étudiées *ex vivo* par des méthodes moléculaires ciblant respectivement le gène *rrs* et le gène fonctionnel *mcrA*. Nous avons utilisé la qPCR pour quantifier le nombre de copies et la PCR-DGGE pour étudier le polymorphisme de ces séquences géniques. Les changements dans l'expression de *mcrA* ont été utilisés pour estimer l'activité métabolique des *Archaea* méthanogènes dans chaque compartiment digestif et dans les différentes conditions expérimentales.

Les émissions journalières de méthane (g/j) et le rendement (g/kg MSI) *in vivo* étaient respectivement 57 % (P<0,05) et 27 % (P<0,05) plus bas chez les agneaux recevant la ration « maïs » par rapport à ceux recevant la ration « blé ». Cette diminution de la méthanogenèse pourrait être la conséquence d'une meilleure digestion de la ration à base de blé par rapport à celle à base de maïs. *In vitro* la production de méthane n'a pas été influencée par la ration. Toutefois, après 6 h et 24 h d'incubation les contenus caecaux produisaient respectivement 5 (P<0,01) et 3 (P<0,01) fois moins de CH₄ (μmol) que les contenus ruminiaux. En comparaison aux animaux alimentés avec la ration « maïs », les liquides filtrés provenant des contenus digestifs des animaux nourris avec le régime « blé », ont produit des quantités plus importantes de méthane avec le blé comme substrat.

L'abondance et la diversité des méthanogènes dans le rumen étaient similaires entre les deux groupes d'agneaux, mais des différences ont été observées entre les compartiments digestifs. Le nombre total des copies *mcrA* était 22 fois plus élevé (P<0,01) dans le rumen par rapport au cæcum pour les deux régimes. Une analyse en cluster des profils PCR-DGGE a montré des communautés méthanogènes différentes entre les deux compartiments digestifs. La ration alimentaire n'a pas influencé l'expression de *mcrA* dans le rumen des agneaux. Toutefois, l'expression de ce gène était 4 fois plus faible dans le cæcum des animaux nourris avec de blé, alors que l'expression n'a diminué que de 2 fois dans le cæcum des animaux nourris avec de maïs par rapport à leurs rumens respectifs.

Nos résultats ont montré que la nature de l'amidon alimentaire influence fortement la production de méthane par des agneaux en croissance. La baisse dans la méthanogenèse avec la ration « maïs » s'expliquerait par une digestion plus faible de la matière organique dans le

rumen, bien que des effets significatifs sur les fermentations ruminales ou le microbiote n'ont pas été observés. En revanche, le plus faible potentiel méthanogène que nous avons observé avec les contenus caecaux incubés *in vitro* peut être dû à une population méthanogène moins nombreuse mais aussi moins métaboliquement active. De plus, la comparaison de la diversité des méthanogènes a révélé des phyla spécifiques à chaque compartiment digestif. Nous prévoyons de séquencer certaines des séquences retrouvées pour une étude plus détaillée de cette communauté.

“METHANOGENIC *ARCHAEA* COMMUNITY STRUCTURE AND ACTIVITY IN THE RUMEN AND CÆCUM OF LAMBS FED CORN OR WHEAT BASED HIGH CONCENTRATE DIETS”

M. Popova, C. Martin, D. P. Morgavi*

INRA, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

*Corresponding author. Tel: +33 4 73 62 40 57; Fax: +33 4 73 62 46 59
EM: diego.morgavi@clermont.inra.fr

ARTICLE EN PRÉPARATION

Abstract

Amount and nature of dietary starch are known to influence the extent and site of feed digestion in ruminants. It is well established now that readily degradable starch may have negative effects on cell wall digestion in the rumen. However, the impact of the nature of dietary starch on methanogenesis as well as on methanogens of the rumen and cæcum is still poorly understood. This study examined methane (CH₄) production and methanogens community abundance, diversity and metabolic activity in the rumen and cæcum of growing lambs fed a high concentrate wheat based or corn based (n = 6) diet. Total tract CH₄ production was assessed using the SF₆ tracer technique. In addition, we compared *ex situ* methanogenic potential of rumen and caecal contents, as well as the *in vitro* capacity of rumen and caecal strained fluids to degrade readily fermentable substrates. Methanogenic *Archaea* and total bacteria communities were studied *ex vivo* using culture independent methods targeting respectively the functional *mcrA* gene and the bacterial *rrs* gene. Gene copies were quantified using qPCR and gene sequence diversity was examined using PCR-DGGE. Changes in *mcrA* expression between animals fed corn or wheat diets, but also between rumen and cæcum were assessed using relative qPCR quantification.

In vivo daily CH₄ emissions (g/d) and CH₄ yield (g/kg dry matter intake) were respectively 57 % (P<0.05) and 27 % (P<0.05) lower in lambs receiving the corn diet compared to those receiving the wheat diet. Decrease in methanogenesis may be the consequence of a better digestion of the wheat diet relative to the corn diet. *In vitro* methane production was not influenced by animal's diet.

However, after 6 h and 24 h of incubation caecal contents produced respectively 5 ($P<0.01$) and 3 ($P<0.01$) times less CH₄ (μmol) than rumen contents. Rumen or caecal strained fluids from animals fed wheat diet produced more CH₄ when readily fermentable substrate was added than strained fluids from corn-fed lambs. Methanogen abundance and diversity were similar in the rumen of the two groups of lambs, however differences were observed between fermentative compartments. Total *mcrA* copy numbers were 22 times higher ($P<0.01$) in the rumen when compared to the caecum for both diets. Cluster analysis using PCR-DGGE showed different methanogenic communities in the two digestive compartments. No significant difference was observed in *mcrA* expression in the rumen of lambs fed wheat or corn diet. However, *mcrA* gene expression was 4 fold lower in the caecum of wheat fed animals, whereas expression decreased only 2 times in the caecum of corn fed animals when compared to their rumen. Though we had no direct evidence for compensation of reduced rumen methane production with higher caecum methanogenesis, methanogens ecology in the caecum should be better considered.

1. Introduction

Global warming, caused by increasing atmospheric concentrations of greenhouse gases (GHGs), is a major environmental, economic and social threat. The livestock production sector is an important contributor of GHG emissions (Steinfeld *et al.*, 2006; IPCC 2007). Ruminants production emit mainly enteric methane (CH₄) which is a natural by-product arising from microbial fermentation of feed within the rumen and, to some extent, in the caecum (Murray *et al.*, 1976). Microbial populations in the digestive tract of ruminants ferment carbohydrates, proteins and to a lesser extent, lipids to produce gases (carbon dioxide, CO₂ and dihydrogen, H₂) and volatile fatty acids: acetate, propionate and butyrate as the main ones. Methanogenic *Archaea* play a critical role, in that they prevent H₂ from accumulating by using it to reduce CO₂ to CH₄.

A number of mitigation options have been proposed, e.g. vaccines, chemical additives, animal breeding, (for reviews, see Beauchemin (2008); Martin *et al.* (2010a)), but diet manipulation is the most direct, and up to date, arguably, the most effective means of lowering CH₄ emissions from ruminants in most systems (Beauchemin *et al.*, 2009). A meta-analysis of the bibliography showed that at high concentrate proportions in the diet the CH₄ production decreased proportionally (Sauvant & Giger-Reverdin, 2009). In parallel, high

concentrate diets have been shown to decrease methanogens diversity in sheep (Wright *et al.*, 2004a) and feedlot bulls (Popova *et al.*, 2011). Concerning the effect of the nature of concentrate on methanogenesis, few direct comparisons have been carried out. Methane emissions, on the basis of gross energy intake were lower for feedlot cattle fed corn finishing diets than for animals receiving barley finishing diets (Beauchemin & McGinn, 2005). The authors suggested that this was mediated through the lower ruminal pH observed with the corn diet. However a shift in the site of plant wall digestion from the rumen to the intestines may occur with slowly degradable starch (Hoover, 1978; Huntington *et al.*, 2006).

Information on microbial communities and particularly methanogenic *Archaea* of the ruminant caecum are scarce, but important differences were reported when compared to rumen microbiota (Lin *et al.*, 1997; Romero-Perez *et al.*, 2011). Due to difficulties to cultivate these microorganisms, molecular biology tools are largely used in microbial ecology of the rumen (McSweeney *et al.*, 2009). Two main molecular markers are used to target methanogens, the *rrs* gene coding for the 16S ribosomal RNA (rRNA) and *mcrA* gene coding for methyl coenzyme-M reductase (Luton *et al.*, 2002), a crucial enzyme to the terminal step of methanogenesis (Thauer, 1998). Targeting a gene which codes for an enzyme also offers the potential for development of activity based detection methods by analysis of messenger RNA. Thus molecular biology tools that target the *mcrA* gene in DNA and mRNA extracted from the rumen are a reliable method to estimate the abundance, diversity and activity of methanogens from different environments.

In this work, we hypothesized that the nature of the starch would switch the digestion of the plant cell walls from the rumen to the intestine and thus favour methane production in the caecum. Our aim was to compare the methanogenic community in terms of structure (number, diversity) and metabolic activity in the rumen and caecum of growing lambs fed either corn (slowly degradable starch) or wheat (readily fermentable starch) diets. In parallel, we investigated the effect of the nature of the cereal on *in vivo* methane production by lambs. We also measured the methanogenic potential of rumen and caecum contents *ex situ*, as well as their capacity to degrade wheat or corn as substrates *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Animals, diet and experimental design

The study was conducted at the animal experimental facilities of INRA's Herbivore Research Unit in Saint-Genès Champanelle (France). Animal procedures were in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture and applicable European guidelines and regulations for animal experimentation (http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html). The experimentation protocol was approved by the Regional Ethics Committee on Animal Experimentation (No CE2-10).

Twelve INRA 401 new-born male lambs and their mothers were separated in two homogenous groups based on lambs age and weight at birth. In each group, ewes were adapted progressively to high concentrate wheat or corn diets, so that lambs were exposed to only one type of concentrate from their birth. Lambs were separated from their mothers at the age of 9 weeks. The six lambs of each group were housed and fed together till the end of fattening (~ 24 weeks). Three weeks before slaughter animals were housed in individual pens for methane and digestion measures. Through the whole experimental period, animals were fed twice daily at 0800 h and 1300 h. Offered feed consisted of 0.70 kg hay, 0.55 kg corn or 0.55 kg wheat concentrate and 0.01 kg bicarbonate. Ingredients and chemical composition of the experimental diets as intake are presented in Table 1.

2.2. Intake, digestibility and methane production

For practical reasons animals were separated in two sub-groups, each one containing 3 lambs fed corn and 3 fed wheat and having similar live weights. Measures of intake, digestibility and methane production in each sub-group were done 3 weeks before slaughter. Lambs in the first sub-group were slaughtered 3 weeks before those in the second one.

Intake, total tract digestibility and daily methane production were measured during a 5-day period at the end of fattening, while the lambs were in individual pens. Feed intake and excreta were measured and recorded daily during the sample collection period to calculate dry matter intake (DMI). Total tract digestibility was determined from total collection of faeces during the measurement period. Faeces were weighed and mixed before sampling a 10 % aliquot. Feed and faeces samples from the 5 days were pooled by animal for dry matter determination (103°C for 24 h) and chemical analysis as previously reported (Martin *et al.*, 2008b). The NDF and ADF contents were determined by sequential procedures after pretreatment with amylase and were expressed inclusive of residual ash (Van Soest *et al.*, 1991). Polarimetric method was used for starch quantification (AFNOR, 1985).

Methane production was determined using the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique (Johnson *et al.*, 1994), as described by Martin *et al.*, (2008a). Mean permeation rates of SF₆ from the brass permeation tubes were 703±128 ng/min. A calibrated permeation tube was introduced in the rumen of each lamb through the mouth. Representative breath samples from each animal were taken into pre-evacuated (-91.2 kPa) yoke shaped PVC collection devices (~ 2.5 l) by means of capillary and Teflon tubing fitted to a halter (Martin *et al.*, 2008a). The collection devices were changed every day at 0800 h before feeding, allowing thus to measure the total gas production over 24 h. Background concentrations of CH₄ and SF₆ were also measured on ambient air samples collected every day in the barn during the sampling period. Gas samples were analyzed by gas chromatography as described elsewhere (Martin *et al.*, 2008a).

2.3 Rumen content sampling for fermentation and microbial parameters.

Lambs were slaughtered at INRA-Theix's experimental abattoir at average age of 171 ± 5.7 days and average body weight of 28.2 ± 0.94 kg. Animals were last fed 24 h before slaughter. The entire gastrointestinal tract was removed as soon as possible after slaughter and representative samples of homogenized rumen and cæcum contents were collected and weighed along with whole rumen and cæcum contents. Rumen pH was measured with a portable pH-meter (CG840, electrode Ag/AgCl, Schott Geräte, Hofheim, Germany) at 5 locations immediately after opening the rumen. Cæcum pH was measured only on the liquid phase. Aliquots of rumen (~250 g) and cæcum (~ 50 g) contents were strained through polyester monofilament fabric (250 µm mesh aperture) to separate the liquid phase. For volatile fatty acids (VFA), 0.8 mL of both rumen and caecal fluid filtrates were mixed with 0.5 mL of 4 mg/ml (w/v) crotonic acid and 20 mg/ml (w/v) metaphosphoric acid in 0.5 M HCl, kept at 4 °C for at least 2 h, centrifuged (16 500 x g for 10 min at 4°C) and the supernatant stored at -20 °C until analysis. VFA were analyzed by gas chromatography using crotonic acid as the internal standard (Morgavi *et al.*, 2003) on a CP 9002 Gas Chromatography (Chrompack, Middelburg, Germany). One mL of rumen fluid was added to 1 mL MFS solution (35 ml/litre formaldehyde, 0.14 M NaCl, 0.92 mM methylgreen) and stored in the dark at room temperature until protozoa were counted. Rumen fluid - MFS solutions were diluted in an equal volume of Phosphate Buffer Saline (PBS) before protozoa enumeration (Ranilla *et al.*, 2007) under a microscope (× 400) in a Neubauer Chamber.

Another aliquot of the total digesta (rumen and cæcum) contents (30 g each) were diluted with 15 ml ice cold PBS pH 6.8 and homogenized, for three one minute cycles with one minute intervals on ice, using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde Switzerland). Approximately 0.5 g were transferred to a 2 ml Eppendorf tube and mixed with 1 ml of RNALater® Tissue Collection:RNA Stabilization Solution (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Tubes were kept at 4°C overnight to allow the solution to thoroughly penetrate the cells, as suggested by the manufacturer, and stored at -80°C until molecular analyses.

2.4. Rumen content sampling for *in vitro* fermentation

Total rumen and cæcum contents, as well as corresponding strained fluids were used as inocula for *in vitro* incubations. One batch of fermentation vials containing 30 ml of anaerobic buffer solution (Goering & Van Soest, 1970) and kept at 39 °C under O₂-free CO₂ gas were inoculated with approximately 30 g of total digesta contents to measure the methanogenic potential. Another batch of fermentation vials were prepared the same way, but contained 0.5 g of ground corn or 0.5 g of ground wheat as substrate. These latter vials were inoculated with 15 ml of strained rumen or cæcum fluid in order to assess the capacity to degrade these substrates. A summary of the incubation experiments is presented in Table 2. Vials without inocula were used as negative control. Fermentations were carried out at 39°C for 24h. Gas production was measured at 6 and 24 h of incubation with the aid of a pressure transducer and samples were collected for analysis of constituents by gas chromatograph (Micro GC 3000A, Agilent Technologies, France). At the end of incubation, pH of the vial contents was measured and samples for VFA analysis were taken as described before.

2.5 Total nucleic acids extraction and cDNA synthesis

Total nucleic acids (tNA) were extracted as described by Popova *et al.* (2010a). Each tNA sample was divided into two equal fractions; DNA in one of the fractions was digested with rDNase, RNase-free (from the Total RNA Isolation Kit, Machenery Nagel, France) using a modified protocol, as described by Popova *et al.* (2010a).

The yield and the purity of the extracted tNA and RNA samples were assessed by optical density measurements using a NanoQuant Plate on an Infinity spectrophotometer (TECAN, Switzerland). RNA integrity was estimated with the Agilent RNA 6000 Nano Kit

on an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Results were analysed using the Software 2100 Expert, version B.02.07.SI482 (Beta) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Indicators of RNA integrity were the RNA Integrity Number (RIN, maximum value 10), the 23S rRNA/16S rRNA ratio (optimum value 2) and the absence of degradation (low baseline) (Schroeder *et al.*, 2006). Total RNA (1 µg) was reverse transcribed in cDNA using Random Primers (Promega, Madison, WI, USA) 0.5 µg/µg RNA, as described by Popova et al (2010a)

2.6 Microbial diversity analysis by PCR-DGGE

The *mcrA* and *rrs* genes were used as molecular markers for methanogen and bacterial populations, respectively. For PCR amplification, 50 ng of total nucleic acids samples and 5 µL of cDNA samples were used.

PCR amplification of the *mcrA* sequences used the primers previously described to be specific for methanogens (Table 3) with the addition of a GC clamp (40 bp) at the 5'-end of the forward primer (Muyzer *et al.*, 1993). Each reaction contained in a 50 µL final volume, 1.25 units of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen), 1X PCR Buffer (supplied with the enzyme), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix (Sigma, Saint Louis, MO, USA) and 0.25 µM each primer. PCR was performed using MyCycler thermal Cycler (BioRad Laboratories) according to the protocol of Luton *et al.*, (2002).

The V3 region of the bacterial *rrs* gene was amplified in PCR using primers 341f-GC clamp and 534r (Table 3). Each reaction contained in 50 µL final volume 1.25 units of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen), 1X PCR Buffer (supplied with the enzyme), 0.2 mM dNTP mix and 0.25 µM of each primer. PCR was performed using MyCycler thermal Cycler (BioRad Laboratories) as described by Sadet et al. (2007).

PCR amplification products were analysed by agarose gel (20 mg/ml of TAE Buffer 1X, 40 mM Tris base, 40 mM glacial acetic acid, 1 mM EDTA) electrophoresis using ethidium bromide staining. Amplicon size and concentration were estimated using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and an imaging system ChemImager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

PCR products were loaded onto a 6 to 8 mg/ml (w/v) gradient polyacrylamide gel with different ranges of denaturant concentrations (100 % denaturant was defined as 7 mol/L urea and 400 (v/v) formamide (Muyzer *et al.*, 1993)). The *mcrA* PCR products were applied to a

gradient of 10 to 30 % denaturant. The denaturant gradient used to separate the bacterial *rrs* PCR products was 30 to 55 %. DGGE was run in 0.5 X TAE Buffer for 5.3 h (for *mcrA*) and 5 h (for *rrs*) at 60 °C using a fixed voltage of 200 mV in DGGE 2001 (CBS Scientific Co, Del Mar, CA, USA). Approximately 100 ng of PCR product for both *mcrA* and *rrs* were loaded per well of the polyacrylamide gel.

Gels were silver stained using a commercial kit (BioRad Laboratories). The large number of samples required several gels to complete the study. To normalize for differences among gels, an outside sample taken from a wether was used as the standard. The same *mcrA* or *rrs* PCR products of this rumen sample were run on every gel and used as standard for comparison of gels. The similarity of standards between gels was 88 % for the *mcrA* and 91 % for bacterial *rrs*.

Gel images were acquired using an optical density calibrated scanner (Epson Scanner, Epson, France) at a spatial resolution of 600 d.p.i. and each band was considered an operational taxonomical unit. Images were analyzed with GelCompar II version 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Banding profiles were quantified 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, 2002 #217). This was used to calculate the community biodiversity using three indices: the Shannon index, the dominance index and the evenness index according to (Fromin *et al.*, 2002; Sadet *et al.*, 2007).

DGGE profiles were normalized and compared using hierarchical clustering to join similar profiles into groups (Fromin *et al.*, 2002). To this end, all images of DGGE gels were matched using the internal control sample and bands were quantified after 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 and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA).

2.7 Microbial communities' quantification and gene expression

Real time quantitative PCR (qPCR) was carried out using a StepOneTM system (Applied Biosystems, Courtabeuf, France). Assays were in triplicate using SYBR Premix Ex TaqTM (Takara Bio Inc, Otsu, Japan) and used 20 ng of tNA or 20 µL of total cDNA.

Negative controls without DNA template were run with every assay to assess overall specificity.

Primers used to quantify *mcrA* and *rrs* DNA or cDNA templates are in Table 3. Reaction set up and temperature cycles were described by Popova *et al.*, (2011). Average amplification efficiency, slope and R2 of qPCR assays targeting *mcrA* gene were of 91.8 %, -3.53 and 0.999, respectively. Average amplification efficiency, slope and R2 of qPCR assays targeting *rrs* gene were of 95 %, -3.35 and 0.999, respectively.

Gene copies in rumen and caecum content samples were quantified and results were expressed as gene copies per g DM of rumen content or total gene copies in whole rumen or caecum contents. Absolute quantification involved use of standard curves that had been prepared with PCR products corresponding to a partial sequence of *mcrA* gene of *Methanobrevibacter ruminantium* 1093 (DSM) and almost the entire sequence of *rrs* gene of *Prevotella bryantii* B14 (DSM 11371). Standard curves were created using triplicate fold dilutions series ranging from 2.5×10^2 to 2.5×10^8 copies for *mcrA* gene and from 1×10^2 to 1×10^8 copies for bacterial *rrs* gene.

Expression of the functional *mcrA* gene was assessed using relative quantification by the threshold cycle, Ct of the qPCR. Changes in gene expression due to diet were assessed comparing the 2-Ct, Δ Ct (see below) and 2- Δ Ct values for the corn and wheat diets. Fold change in gene expression in caecum compared to rumen contents of the same animal was computed using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method, where:

$$\Delta\text{Ct} = (\text{Ct } mcrA - \text{Ct } rrs)$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct } mcrA - \text{Ct } rrs)_{\text{caecum}} - (\text{Ct } mcrA - \text{Ct } rrs)_{\text{rumen}}$$

Statistical analysis of gene expression was on the, Δ Ct and 2- Δ Ct values as suggested by Schmittgen and Livak (2008).

2.8 Calculations and Statistical Analysis

Hydrogen recoveries for the *in vitro* assays of both rumen and caecum inocula (total contents without substrate and strained fluids with substrate) were calculated as described by (Demeyer *et al.*, 1996).

Recovery (%): H accepted/H released

H accepted . $4M + 2P + 2B$.

H released . $2A + P + 4B$

where M is methane, A is acetate, P is propionate, B is butyrate.

All data was analyzed using PROC MIXED of SAS (2003) with a Tukey's adjustment. To determine effects of the diet on intake, total tract digestion and *in vivo* CH₄ output, the model included diet as a fixed effect with animal(diet) as a random effect. The model for statistical analysis of all other *in vivo* data and data from *in vitro* incubations of total contents, included animal, diet (D), fermentative compartment (FC) and D*FC as fixed effects with animal(diet) as a random effect. For data from *in vitro* incubations of strained fluids, the model included animal, diet (D), fermentative compartment (FC), inocula (I) and their interactions D*FC, D*I, FC*I; D*FC*I as fixed effects with animal(diet) as a random effect. In this latter case, interactions D*FC, D*I and FC*I were never significant, so they are not presented in this paper.

Effects were declared significant at $P \leq 0.05$ and trends were declared for $P \leq 0.10$.

3. Results

3.1 Dry matter intake, total tract digestibility and CH₄ output

Grain source in the diet (wheat or corn) had no effect on DM, NDF or starch intake (Table 4). Mean daily weight gain was similar between the two diets (0.19 kg for corn vs. 0.17 kg for wheat diet, $P > 0.05$; data not shown). Total tract DM digestion tended to be higher in lambs fed the wheat diet when compared to lambs fed the corn based diet (Table 4).

Daily methane emissions (CH₄ g/d) and methane yield (CH₄ g/kg DMI) were reduced by more than 56 % ($P < 0.05$) and 26 % ($P < 0.05$), respectively, in lambs fed corn based diet, relative to wheat-fed animals (Table 4). When methane was expressed by total tract digested DM, emissions only tended to be lower (-20 %, $P = 0.10$) in animals fed corn diet, compared to animals fed wheat based diet. There was no significant difference between groups when methane was expressed by NDF or starch intake or by total tract digested NDF or starch (Table 4). However we noticed numerically lower values for CH₄ g/kg starch intake (- 24,7 %) and CH₄ g/kg digested starch (-29 %) in animals fed corn based diet compared to those fed wheat diet.

3.2 *In vivo* fermentation patterns

Total rumen contents (wet weight as well as dry matter) were higher ($P < 0.05$) in animals fed corn diets than in animals fed wheat diet, in contrast to cæcum contents that were lower

($P < 0.05$) (Table 5). In both group of animals, caecum contents were lower (5.6 times for wheat diet and 11.3 times for corn diet) than rumen contents. Diet had no effect on DM contents of the digesta, but DM content in the caecum was higher than in the rumen for both wheat fed and corn fed lambs.

The pH of digesta contents was similar between diets and fermentative compartments (Table 5). The total VFA concentrations were nearly 30 % lower ($P < 0.01$) in the caecum contents when compared to rumen contents for both diets. The molar proportion of acetate was higher (+11 %, $P < 0.01$), in the caecum when compared to the rumen of both groups of animals. Diet had no effect on propionate molar proportion and concentration, which respectively tended to decrease (-25 %, $P = 0.06$) or was lower (-68.53 %, $P < 0.01$) in caecum than in rumen contents. Acetate : propionate ratio was 32 % higher in the caecum of both group of animals, but this difference was not significant (Table 5).

3.3 *In vitro* fermentation patterns

There was no difference in the methanogenic potential neither of rumen nor caecal contents of animals fed different diets (Table 6). On the other hand, gas production from caecum total contents was approximately 5 fold lower ($P < 0.01$) than from rumen contents, 6 hours after incubation. There was no difference between rumen and caecum contents in the total quantity (μmol) of gas produced at the end of the experiment (24 hours of incubation). Methane quantity (μmol of CH_4), as well as methane molar proportion in the total gas sample (μmol of CH_4 / μmol of total gas) were lower for the caecum contents when compared to the rumen contents both at the beginning and the end of incubation. The hydrogen recovery was significantly lower with caecum inoculates. Total caecum contents produced 26 % less VFA ($P < 0.01$) than rumen contents after 24 hours of fermentation. VFA patterns were not influenced neither by diet nor fermentative compartment.

The capacity to degrade a readily fermentable substrate of rumen and caecal contents of animals in the two groups is summarized in Table 7. Total gas production with wheat meal as substrate, compared to corn, was higher after 6 h of incubation and tended to be higher at 24 h of incubation for both strained fluids. The quantity of methane produced (μmol), and methane proportion in the gas sample were higher ($P < 0.01$) with strained rumen or caecum fluid coming from wheat fed lambs, as compared to corn fed lambs, both at the beginning and the end of the experiment. Incubation of caecum contents always yielded less methane and

hydrogen recovery was lower than in rumen contents (Table 7). After 6 hours of fermentation, methane production (quantity and yield) was higher ($P<0.01$) in vials inoculated with wheat meal relative to vials containing corn meal.

Total VFA concentrations were lower in vials containing strained rumen and caecum fluids from corn fed lambs when compared to sample fluids from wheat fed lambs (Table 7). Acetate molar proportion was higher ($P<0.01$) in the caecum than in the rumen contents and also when wheat meal was used to inoculate the vials ($P<0.01$). Inversely, butyrate molar proportion was higher ($P<0.01$) when vials were inoculated with corn meal.

3.4 Microbial community structure

Total protozoa numbers were 2-fold higher in lambs receiving wheat diet, as compared to lambs receiving corn diet, although the effect was not clearly significant ($P=0.08$) (Table 8). Small Entodiniomorphs ($<100\ \mu\text{m}$) were predominant and tended ($P=0.06$) to be more abundant with the wheat based diet. *Dasytricha* and *Isotricha* sp were more abundant in animals fed wheat diet ($P<0.01$).

The concentration of *mcrA* gene copies, as well as the total number of *mcrA* and *rrs* copies were higher ($P<0.01$) in the rumen contents than in the caecum contents, whatever the diet (Table 8). The concentrations and total numbers of *mcrA* copies in rumen and caecum contents of animals fed wheat diet were higher ($P<0.01$) in lambs fed wheat diet relative to lambs fed corn diet. The relative abundance of the *mcrA* gene copies, expressed as *mcrA* total copies / *rrs* total copies was higher in the rumen when compared to the caecum for both diets, but also higher in the rumen of lambs fed wheat compared to the rumen of corn fed lambs.

The ΔCt values were higher ($P<0.05$) in the caecum than in the rumen for both groups of animals, though when the results were expressed as $2^{-\Delta\text{Ct}}$ the difference were no longer significant ($P=0.47$). The expression of the bacterial *rrs* gene remained constant in the rumen and caecum contents, as assessed by a Student's test on the *rrs* $2^{-\text{Ct}}$ values (data not shown). The expression of *mcrA* gene was decreased by more than 2 times ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = -2.167$) in the caecum of corn fed lambs when compared to their rumen. In wheat fed lambs, *mcrA* expression in the caecum was 4 times lower than in the rumen ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = -4.091$).

Cluster analysis of the *mcrA* DNA sequences from PCR-DGGE profiles partially separated the rumen from the caecum samples (Figure 1). Three main clusters were formed, two of them grouping exclusively rumen and caecum samples but the third one contained a

mixture of both. Although, within each cluster, samples tended to group by diet, the separation was not clear. Neither the number of bands nor any of the diversity indices calculated from the PCR-DGGE profiles presented significant differences related to diet or fermentative compartment (Table 6). However, several bands were uniquely found either in the rumen or the cæcum contents.

For bacterial *rrs*, PCR-DGGE analysis separated, with few exceptions, rumen and cæcum samples, (Figure 2). Cæcum samples grouped more closely together than did the rumen samples. The diversity indices were similar between diets and fermentative compartments.

4. Discussion

Mean daily methane production (g/d) of lambs fed wheat, obtained using the SF6 technique in our study were similar to values obtained from lambs (~ 20 kg final weight) housed in simple open-circuit respiratory chamber and fed a diet composed of 60 % Chinese wild rye and 40 % concentrate mixture (DM basis) (Mao *et al.*, 2010). We observed a significant reduction in daily CH₄ emissions (g/d) and methane yield (CH₄ g/kg DMI) with lambs receiving the corn based diet. This may be due to a lower ruminal DM digestion for lambs fed corn diets in accordance with the lower ruminal digestion of corn starch as compared to wheat (Martin *et al.*, 1999). In addition, values of CH₄ g/kg digested or ingested starch were numerically lower with lambs fed corn compared to those fed wheat. Beauchemin and McGinn (2005) measured methane emissions from feedlot cattle fed finishing diets containing corn (slowly degradable starch) or barley grain (rapidly degradable starch) and methane yield was lower for the corn than for the barley finishing diet. This effect could be mediated through a shift in the site of digestion from the rumen to the cæcum (Hoover, 1978; Huntington *et al.*, 2006). In fact, in our study methane production was similar between groups of animals when expressed as function of the total tract digested dry matter (CH₄ g/kg digested DM). However, though methane production (CH₄ g/d; CH₄ g/kg DMI) decreased with corn based diet, acetate:propionate ratio was not influenced by diet; neither were total VFA production and profiles. Inhibition of methanogenesis may be due to a lower ruminal pH with the corn diet (Beauchemin & McGinn, 2005; Martin *et al.*, 2010b). We did not observe a difference in the ruminal pH due to diet. It should be noted though that pH and VFA

production in our study were measured only once, at slaughter when animals have been fasted for 24 hours.

The lower VFA concentration in the cæcum is probably linked to the lower proportion of organic matter in digestive contents reaching this organ (Huntington, 1997; Huntington *et al.*, 2006). The molar proportion of acetate increased in the cæcum of both groups of lambs, which may be explained by the reductive acetogenesis which occurs in this compartment (Demeyer, 1991a).

We did not observe the effect of diet on *in vitro* methane production from rumen and cæcum total contents. Besides, we noticed a clear effect of the fermentative compartment on almost all fermentation patterns, which is consistent with previous studies (Demeyer, 1991a; Romero-Perez *et al.*, 2011; Váradyová *et al.*, 2000). After 6 hours of fermentation total gas production was less active with the cæcum contents, a proof of the lower fermentation rates in this fermentative compartment (Hoover, 1978). Though the quantity of gas produced at the end of incubation was similar between rumen and cæcum contents, the latter produced less total VFA.

Higher total gas production, for both rumen and caecal fluids, when wheat meal was used as substrate confirms our initial hypothesis that wheat is more readily degradable than corn. When strained fluids of rumen and cæcum contents were incubated with either wheat or corn as substrate, less methane was produced from the cæcum contents whatever the diet or the nature of the inoculums. Despite, earlier observations that microbial community of the gut can rapidly adapt when readily fermentable substrates are present (Hoover, 1978), fermentation rate in the vials containing cæcum digesta remained lower relative to rumen. These results, in agreement with previous studies (Romero-Perez *et al.*, 2011; Váradyová *et al.*, 2000), suggest a different capacity of organic matter degradation of the rumen and cæcum microbiota. Most of the gastrointestinal degradability is known to occur in the rumen which is due to lack of cell wall degrading enzymes in the small intestine and the short retention time of ingests in the cæcum as compared to the rumen.

We observed a higher molar proportion of acetate with cæcum fluid inoculate. Acetate production in the rumen is a hydrogen producing pathway, which results in higher methane yield. Reductive acetogenesis is another pathway of acetate production reported in the cæcum, which is an alternative hydrogen sink to methanogenesis (Demeyer, 1991a). Lower values for hydrogen recoveries in the cæcum (both for total contents and strained fluids incubations)

may indicate the presence of reductive acetogenesis as a substantial source of acetate in the cæcum (Demeyer, 1991a).

Total protozoa numbers tended to increase in the rumen of animals fed wheat diet, likely due to the greater amount of ruminal degradable starch (Mackie *et al.*, 1978). An increase in the proportion of starch in the diet favoured the development of protozoa in the rumen of feedlot bulls (Popova *et al.*, 2011). However, other studies showed that above certain proportion of starch contents, the protozoa concentration falls (Martin *et al.*, 2007), due to an acidification of the ruminal contents. Moreover, in a review paper based on 21 *in vivo* studies employing various dietary treatments containing lipids, starch and plant extracts, Morgavi *et al.* (2010) reported an average decrease of 0.6 g CH₄/kg DM intake per reduction of 1×10^5 protozoa cells/mL. Thus, the decrease in methane production (CH₄ g/d or CH₄ g/kg DMI) in our study in lambs fed corn diet may be related to the lower concentration of protozoa in their rumen fluid.

The concentration and total numbers of bacterial *rrs* gene copies were not influenced by diet, but they were higher in the rumen when compared to the cæcum. This is consistent with a recent work which estimated that microbial numbers are reduced by eight orders of magnitude from the rumen, through the abomasum, and into the duodenum of lactating dairy cows (Frey *et al.*, 2010). Microbial diversity in our study was more influenced by the digestive site than the diet, as illustrated by the clustering analysis of the DGGE profiles. In the study of Romero-Pérez *et al.*, (2011) also, the sample type (rumen liquor or rectal fecal samples) had a larger effect on bacterial communities than diet and temperature. Bacterial communities, assessed by capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) profiles of *rrs* genes showed different structure between the forestomach and faecal contents of cows (Michelland *et al.*, 2009). Environmental conditions like pH and degree of anaerobiosis but also source and amount of substrate, are well known to vary greatly between rumen and cæcum. Moreover, protozoa are absent in the latter digestive compartment.

Methanogens represented a small part of rumen microbiota, less than 1 %, which is consistent with the finding that 0.3 % to 3.3 % of *rrs* sequences retrieved in the rumen belong to the domain *Archaea* (Lin *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1998). Diet did not influence the concentration or total number of *mcrA* copies in the rumen contents of lambs, though *in vivo* methane production was decreased in the corn fed group. This finding is comparable to results

reported with feedlot bulls fed starch rich diet supplemented with linseed that produced less methane than bulls fed fibre rich diet (Popova *et al.*, 2011); no difference in ruminal methanogen numbers was also observed with high and low RFI (residual feed intake) steers fed high and low energy diets (Zhou *et al.*, 2010), although in the latter study there were no measures of CH₄ production. Accordingly, the total number of rumen methanogens may not be a key factor affecting CH₄ production (Popova *et al.*, 2011). In agreement with previous findings (Frey *et al.*, 2010), methanogens numbers were lower in the caecum compared to the rumen contents. Inversely to our observations in the rumen, total *mcrA* copies were more abundant in the caecum of wheat fed lambs compared to corn fed lambs.

Methanogens diversity was not affected by the nature of the cereal in our study, which disagrees with other reports (Wright *et al.*, 2004a). Methanogens diversity was greater with grazing sheep compared to sheep receiving high concentrate diets (Wright *et al.*, 2004a); Popova *et al.*, (2011) observed more diverse methanogenic population when concentrate rich in fiber was fed to feedlot bulls, compared to starch rich concentrate; Zhou *et al.*, (2010) pointed out changes at the species and strain levels when steers were switched from low to high energy diets. However to our knowledge there is no other direct comparison of effects of cereal type on methanogens' diversity in growing lambs.

In our study, cluster analysis of DGGE profiles showed a slightly different methanogenic community between fermentative compartments, though there was no significant difference in the diversity indices. In another study, targeting the *Archaeal rrs* gene, the richness index of the community in the rumen was higher than that of the faeces (Michelland *et al.*, 2010). Methanobacteriales have been reported to be the predominant methanogens in the bovine (Lin *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 2009) and ovine (Wright *et al.*, 2008) rumen. No dominant *Archaeal* group have been identified in other sampling location of the gastro-intestinal tract in these ruminants (Lin *et al.*, 1997). One explanation for differences observed may be the environmental conditions that change from the rumen to the caecum. Also a different *Archaeal* community may be expected because of the absence of protozoa in the caecum.

Transcription dynamics of the functional *mcrA* gene are controlled by hydrogen availability (Reeve *et al.*, 1997). The relationship between gene expression and methane production *in vitro* (Guo *et al.*, 2008) and *in vivo* (Popova *et al.*, 2010b; Popova *et al.*, 2011) in ruminants has already been established. However, in the current trial we were not able to

link *in vivo* methane production in lambs and methanogenic activity of ruminal *Archaea*; there were no significant differences in the ΔCt and $2^{-\Delta\text{Ct}}$ values, though significant decreases in CH_4 g/d and CH_4 g/kg DMI were. The $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method to assess gene expression requires two calibrators (Schmittgen & Livak, 2008), while only one reference is used in ΔCt and $2^{-\Delta\text{Ct}}$ values. Thus, the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method allows to better take into account variability biases related for instance to extraction or amplification efficiencies (Livak & Schmittgen, 2001; Schmittgen & Livak, 2008). As the lambs were different in each diet group, it was not possible to use the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method to compare expression in the rumens of wheat and corn fed lambs. In our previous study (Popova *et al.*, 2011) we observed a decrease in CH_4 production associated with lower methanogenic activity, assessed by *mcrA* $2^{-\text{Ct}}$ expression analysis, in the rumen of 20 feedlot bulls. The divergent results in ruminal gene expression and methane production observed here are probably due to the lower number of animals we used. Abecia *et al.*, (2010) also reported great variation in gene expression between animals.

We used the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method to compare gene expression in the rumen and cæcum of the same animal. Mean values showed that *mcrA* expression was lower in the cæcum of both groups of lambs when compared to their rumen. This is consistent with the lower fermentation rate and hydrogen recovery observed in total cæcum contents incubations. Organic matter is less available in the cæcum of ruminants (Huntington *et al.*, 2006) and as a consequence less hydrogen per unit of feed is produced (Janssen, 2010) suggesting down regulating gene transcription. Moreover, it seemed that methanogenic *Archaea* were less active in the cæcum of animals receiving wheat diet (4 fold decrease) than those fed corn (2 fold decrease). This may be due to the expected higher amount of organic matter reaching the cæcum when corn was fed, allowing a greater hydrogen production per unit of feed.

5. Conclusions

Data presented here showed that the nature of dietary starch greatly influenced methane production in growing lambs. Differences in methane emissions between lambs fed corn or wheat based diet are probably due to differences in ruminal DM digestion. However, effects of diet on the microbial ecosystem of the rumen and of the cæcum were less obvious. Our study is among the first aiming to characterize methanogens community structure (in terms of numbers and diversity) and activity in the two microbial fermentation compartments of the ruminant digestive tract. Based on results obtained, we can affirm that several *Archaeal*

species are better adapted to either the rumen or cæcum environments. Further research, using more sophisticated fingerprint technique is required for more detailed study of this community. The contribution of microbial populations of the cæcum to the nutrition and health of ruminants is seldom addressed but warrants further investigation.

Acknowledgements

This experiment has been granted by the regional council of the French “Auvergne” region. The authors greatly thank the staff of the animal experimental facilities and the abattoir of the INRA’s Herbivores Research Unit for animal care, help in methane measures, and sampling, as well as D. Graviou, G. Gentes, L. Genestoux and Y Rochette for help in sample analysis. M. Popova is the recipient of INRA – Région Auvergne scholarship.

Cited Literature

- Abecia, L., E. Molina-Alcaide, A. I. Martin-Garcia, G. Martinez, and D. R. Yanez-Ruiz. 2010. Animal variation in methane production, expression of *mcrA* gene and microbial numbers in the rumen of goats fed alfalfa hay with or without oats. In: Greenhouse gases and animal agriculture conference, Banff, Canada. p 164.
- AFNOR. 1985. Aliments des animaux. Méthodes d’analyses françaises et communautaires. Dosage de l’amidon. In: A. F. Normalisation (ed.) Méthode polarimétrique. p 123–125 Paris, France.
- Beauchemin, K. A., M. Kreuzer, F. O'Mara, and T. A. McAllister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 21-27.
- Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, and S. M. McGinn. 2009. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews* 4.
- Beauchemin, K. A., and S. M. McGinn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of Animal Science* 83: 653-661.
- Demeyer, D. 1991. Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition*. 22: 50-61.
- Demeyer, D. I., D. Fiedler, and K. G. De Graeve. 1996. Attempted induction of reductive acetogenesis into the rumen fermentation *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development* 36: 233-240.
- Denman, S. E., N. W. Tomkins, and C. S. McSweeney. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 313-322.
- Edwards, J. E., S. A. Huws, E. J. Kim, and A. H. Kingston-Smith. 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology* 62: 323-335.
- Frey, J. C. et al. 2010. Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. *J Appl. Microbiol.* 108: 1982-1993.

- Fromin, N. et al. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (dge) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4: 634-643.
- Goering, H. K., and P. J. Van Soest (Editors). 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications) Agricultural Research Service, United States Washington.
- Guo, Y. Q. et al. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 47: 421-426.
- Hoover, W. H. 1978. Digestion and absorption in the hindgut of ruminants. *Journal of Animal Science* 46: 1789-1799.
- Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *Journal of Animal Science* 75: 852-867.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, and C. J. Richards. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *Journal of Animal Science* 84: E14
- Janssen, P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology* 160: 1-22.
- Johnson, K., M. Huyler, H. Westberg, B. Lamb, and P. Zimmerman. 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science & Technology* 28: 359-362.
- Leahy, S. C. et al. 2010. The genome sequence of the rumen methanogen *methanobrevibacter ruminantium* reveals new possibilities for controlling ruminant methane emissions. *PLoS ONE* 5: e8926.
- Lin, C., L. Raskin, and D. A. Stahl. 1997. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: Comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 281-294.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16s rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148: 3521-3530.
- Mackie, R. I., F. M. C. Gilchrist, A. M. Robberts, P. E. Hannah, and H. M. Schwartz. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *Journal of Agricultural Science* 90: 241-254.
- Wang, Y.-Y. Zhou, and J.-X. Liu. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* 129: 56-62.
- Martin, C., H. Dubroeuq, D. Micol, J. Agabriel, and M. Doreau. 2007. Methane output from beef cattle fed different high-concentrate diets. In: *Proc. of British Society of Animal Science*, Southport, UK. p 46.
- Martin, C. et al. 2010a. Effect of release rate of the sf6 tracer on methane and carbon dioxide emission estimates based on ruminal and breath gas samples. In: *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*, Banff, Canada. p 85.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010b. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351-365.
- Martin, C., C. Philippeau, and B. Michalet-Doreau. 1999. Effect of wheat and corn variety on fiber digestion in beef steers fed high-grain diets. *J. Anim Sci.* 77: 2269-2278.

- Martin, C., J. Rouel, J. P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008a. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science* 2007-0774.
- Martin, C., J. Rouel, J. P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008b. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science* 86: 2642-2650.
- McSweeney, C. et al. 2009. Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38: 341-351.
- Michelland, R. J. et al. 2010. Comparison of the *Archaeal* community in the fermentative compartment and faeces of the cow and the rabbit. *Anaerobe* 16: 396-401.
- Michelland, R. J. et al. 2009. Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1642-1650.
- Morgavi, D. P., H. Boudra, J. P. Jouany, and D. Graviou. 2003. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by sh-containing reducing agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6906-6910.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1024-1036.
- Murray, R. M., A. M. Bryant, and R. A. Leng. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition* 36: 1-14.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16s rna. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M. M., Doreau, M. & Morgavi, D. P. Diet composition influences methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Animal Feed Science and Technology* (in press).
- Popova, M., C. Martin, and D. P. Morgavi. 2010a. Improved protocol for high-quality co-extraction of DNA and rna from rumen digesta. *Folia Microbiol (Praha)* 55: 368-372.
- Popova, M., C. Martin, Y. Rochette, D. Graviou, and D. P. Morgavi. 2010b. Methane emissions and rumen methanogens in sheep harbouring or not protozoa. In: *Proc. of the 7th Joint Symposium RRI-INRA "Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems"*, Aberdeen, UK
- Ranilla, M. J., J. P. Jouany, and D. P. Morgavi. 2007. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* 45: 675-680.
- Reeve, J. N., J. Nolling, R. M. Morgan, and D. R. Smith. 1997. Methanogenesis: Genes, genomes, and who's on first? *Journal of Bacteriology* 179: 5975-5986.
- Romero-Perez, G. A., K. H. Ominski, T. A. McAllister, and D. O. Krause. 2011. Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 258-268.
- Sadet, S., C. Martin, B. Meunier, and D. P. Morgavi. 2007. Pcr-dgge analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1: 939-944.
- Sauvant, D., and S. Giger-Reverdin. 2009. Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane chez les ruminants. *INRA Productions Animales* 22: 375-384.

- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time pcr data by the comparative ct method. *Nature Protocols* 3: 1101-1108.
- Schroeder, A. et al. 2006. The rin: An rna integrity number for assigning integrity values to rna measurements. *BMC Molecular Biology* 7: 3.
- Sharp, R., C. J. Ziemer, M. D. Stern, and D. A. Stahl. 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* 26: 71-78.
- Steinfeld, H. et al. (Editors). 2006. *Livestock's long shadow: Environmental issues and options*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Thauer, R. K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. 1998. *Microbiology* 144 (Pt 9): 2377-2406.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Váradyová, Z., I. Zelenák, and P. Siroka. 2000. *In vitro* study of the rumen and hindgut fermentation of fibrous materials (meadow hay, beech sawdust, wheat straw) in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 83: 127-138.
- Wright, A.-D., X. Ma, and N. Obispo. 2008. *Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep from Venezuela. *Microbial Ecology* 56: 390-394.
- Wright, A.-D. G. et al. 2004. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in western australia. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1263-1270.
- Zhou, M., E. Hernandez-Sanabria, and L. L. Guan. 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6524-6533.
- Zhou, M., E. Hernandez-Sanabria, and L. L. Guan. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3776-3786.

Table 1 Ingredients and chemical composition of the experimental diets

Ingredient	Wheat Diet	Corn Diet
	% DM basis	
Hay	55.0	56.8
Cereal	44.1	42.3
Bicarbonate	0.84	0.87

Chemical composition	Wheat	Corn	Hay
Dry matter %	88.6	95.5	93.6
NDF % DM	13.9	11.4	60.3
ADF % DM	5	2.3	31.8
CP % DM	10.5	10.1	7.2
Starch % DM	72.9	68.1	nd

nd, not detected

Table 2 Summary of the *in vitro* experiments

Fermentative compartment	Diet	Sample type	Substrate		
			No ^a	Corn ^a	Wheat ^a
Rumen	Corn	Total content	2 (24)	/	/
		Strained fluid	/	1 (12)	1 (12)
Cæcum	Corn	Total content	2 (24)	/	/
		Strained fluid	/	1 (12)	1 (12)
Rumen	Wheat	Total content	2 (24)	/	/
		Strained fluid	/	1 (12)	1 (12)
Cæcum	Wheat	Total content	2 (24)	/	/
		Strained fluid	/	1 (12)	1 (12)

^a Values indicate the number of samples per animal, values in brackets indicate the total number of samples

Table 3

Oligonucleotides used for PCR-DGGE and qPCR analysis

Oligonucleotides	Oligonucleotide Sequences	Target	Amplicon length (bp)	Use in	References
534R – 341f-GC	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG 5'-(GC)-CC TAC GGG AGG CAG CAG	<i>rrs Bacteria</i>	193	PCR-DGGE	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993)
<i>mcrA</i> r – <i>mcrA</i> f-GC	5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT 5'-(GC)-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC	<i>mcrA</i> Methanogens	460-490	PCR-DGGE	(Luton <i>et al.</i> , 2002)
<i>qmcrA</i> -R – <i>qmcrA</i> -F	5'-GBARGTCGWA WCCGTAGAAATCC 5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC	<i>mcrA</i> Methanogens	140	qPCR	(Denman <i>et al.</i> , 2007)
799R2 – 520F	5'-AACAGGATTAGATACCCCTG 5'-AGCAGCCGCGGTAAT	<i>rrs Bacteria</i>	280	qPCR	(Edwards <i>et al.</i> , 2007)

Table 4

Intake, total tract digestibility and methane output from lambs fed wheat or corn based diets (values are mean of 6 observations)

Item	Diet		SEM	Diet	Effect	
	Wheat	Corn			SG ^a	Diet*SG
<u>Intake g/d</u>						
DM	815	706	70.0	NS	NS	NS
ADF	152	119	13.7	NS	NS	NS
NDF	311	257	27.5	NS	NS	NS
Starch	372	357	18.5	NS	NS	NS
<u>Total tract digestion (% intake)</u>						
DM	62	57	1.8	0.08	NS	NS
ADF	42	30	7.3	NS	NS	NS
NDF	41	33	5.2	NS	NS	NS
Starch	96	87	4.5	NS	NS	NS
<u>Methane output</u>						
CH ₄ (g/d)	12.84	8.19	1.254	<0.05	NS	<0.05
CH ₄ (g/kg DMI)	15.17	11.97	0.763	<0.05	NS	<0.05
CH ₄ (g/kg digested DM)	25.28	20.92	1.683	0.10	NS	<0.05
CH ₄ (g/kg NDF intake)	41.16	32.93	4.212	NS	NS	NS
CH ₄ (g/kg digested NDF)	101.16	108.29	23.730	NS	NS	NS
CH ₄ (g/kg starch intake)	31.56	25.32	2.852	NS	NS	0.05
CH ₄ (g/kg digested starch)	35.84	27.78	3.370	NS	NS	<0.05

^a SG, slaughter sub-group;

Table 5 Characteristics of digestive content and fermentation parameters in lambs fed wheat or corn based diets (values are mean of 6 observations)

Item	Diet				SEM	Effect ¹		
	Wheat		Corn			D	FC	D*FC
	Rumen	Cæcum	Rumen	Cæcum				
<u>Digestive content</u>								
Total wet weight (g)	3023.3 ^a	430.5 ^b	3921.7 ^a	273.3 ^c	20.34	<0.01	<0.01	<0.01
Total dry weight (g)	423.2 ^a	76.1 ^b	622.2 ^c	55.1 ^b	45.12	0.087	<0.01	<0.05
Dry matter %	14.00	17.80	15.85	20.67	1.147	NS	<0.01	NS
<u>Fermentation parameters</u>								
pH	6.66	6.79	6.68	6.52	0.088	NS	NS	NS
Total VFA (mM)	66.91	46.91	68.64	57.68	4.997	NS	<0.01	NS
Acetate ³	0.69	0.78	0.68	0.76	0.152	NS	<0.01	NS
Propionate ³	0.17	0.16	0.19	0.13	0.016	NS	0.06	0.10
Butyrate ³	0.12 ^a	0.01 ^b	0.08 ^a	0.10 ^a	0.141	NS	<0.05	<0.01
Minor VFA ^{2, 3}	0.03	0.02	0.04	0.02	0.003	NS	<0.01	NS
Acetate/Propionate	4.43	5.03	3.75	7.12	0.851	NS	NS	NS

¹ D, diet; FC, fermentative compartment

² minor VFA – valerate, iso-valerate, iso-butyrate, caproate

³ % mM of individual VFA per mM of total VFA produced

^{a, b, c} Different letters within the same row indicate significant differences P<0.05

Table 6. Methanogenic and fermentative potential of total rumen and caecal contents from lambs receiving corn or wheat based diet (values are mean of 24 observations)

Item	Diet				Effects ¹	
	Wheat		Corn		D	FC
	rumen	caecum	rumen	caecum	SEM	
<u>Gas production at 6 hours of incubation</u>						
Total gas x 10 ³ (μmol)	4.46	2.60	4.94	3.07	3.347	NS
Methane (μmol)	220.71	41.68	209.47	48.23	22.702	NS
Methane (μmol / μmol gas)	0.11	0.04	0.10	0.01	0.007	NS
<u>Gas production at 24 hours of incubation</u>						
Total gas x 10 ³ (μmol)	37.43	45.29	44.25	46.41	4.33	NS
Methane (μmol)	673.64	247.93	647.34	175.26	68.604	NS
Hydrogen recovery (%)	73.45	56.72	77.71	47.85	4.510	NS
Methane (μmol/μmol total gas)	0.15	0.07	0.14	0.06	0.007	NS
<u>VFA production at 24 hours of incubation</u>						
Total VFA (mM)	110.84	91.15	115.83	88.49	6.697	NS
Acetate % ²	0.61	0.64	0.61	0.61	0.019	NS
Propionate % ²	0.21	0.22	0.23	0.25	0.021	NS
Butyrate % ²	0.12	0.10	0.11	0.10	0.015	NS
Acetate/Butyrate	3.03	3.43	2.66	2.49	0.543	NS
Minor VFA % ^{2,3}	0.06	0.05	0.06	0.04	0.005	NS
pH	5.89	6.03	5.56	5.79	0.138	NS

¹ D, diet; FC, fermentative compartment, the interaction D*FC was never significant. NS, not significant

² % mM of individual VFA per mM of total VFA produced

³ minor VFA – valerate, iso-valerate, iso-butyrate, caproate

Table 7. Capacity to degrade readily fermentable substrates of strained rumen and caecum liquids from lambs fed wheat or corn based diets (values are mean of 24 observations)

Animals diet		Wheat				Corn				Effects ¹				
Fermentative compartment.		Rumen		Caecum		Rumen		Caecum		SEM		D	FC	S
Substrate		Wheat	Corn	Wheat	Corn	Wheat	Corn	Wheat	Corn	Wheat	Corn			
<u>Item</u>														
<u>Gas production at 6 hours of incubation</u>														
Total gas x 10 ³ (μmol)		2.64	2.14	2.30	1.82	2.21	1.59	2.28	1.68	0.275	NS	NS	<0.01	
Methane (μmol)		298.47	226.91	155.40	117.11	216.87	141.15	54.16	39.67	32.081	<0.05	<0.01	<0.01	
Methane (μmol /μmol total gas)		0.11	0.10	0.06	0.06	0.09	0.08	0.03	0.02	0.018	<0.01	<0.01	<0.01	
<u>Gas production at 24 hours of incubation</u>														
Total gas x 10 ³ (μmol)		4.59	4.60	3.79	3.54	4.33	3.99	3.69	3.47	0.229	NS	<0.01	0.07	
Methane (μmol)		618.97	604.53	295.35	302.04	532.60	466.41	178.84	186.49	52.714	<0.05	<0.01	NS	
Hydrogen recovery (%)		68.11	74.10	50.43	53.24	72.57	70.66	45.36	47.67	3.500	NS	<0.01	0.101	
Methane (μmol/μmol total gas)		0.13	0.13	0.08	0.08	0.12	0.12	0.05	0.05	0.010	0.06	<0.01	NS	
<u>VFA production at 24 hours of incubation</u>														
Total VFA (mM)		122.18	119.47	118.48	111.03	96.96	104.12	96.47	86.59	5.205	<0.01	NS	NS	
Acetate % ²		0.58	0.54	0.63	0.60	0.59	0.53	0.60	0.59	0.020	NS	<0.05	<0.01	
Propionate % ²		0.23	0.25	0.17	0.17	0.21	0.22	0.25	0.25	0.030	NS	NS	NS	
Butyrate % ²		0.14	0.15	0.15	0.17	0.14	0.19	0.11	0.12	0.023	NS	NS	<0.01	
Acetate/Butyrate		2.76	2.30	4.72	4.09	2.97	2.50	2.38	2.38	0.642	NS	NS	NS	
Minor VFA % ^{2,3}		0.05	0.06	0.05	0.05	0.06	0.06	0.04	0.04	0.011	NS	NS	NS	

¹ D, diet; FC, fermentative compartment; S, substrate; the interaction D*FC*S was never significant; NS, not significant

² % mM of individual VFA per mM of total VFA produced;

³ minor VFA – valerate, iso-valerate, iso-butyrate, caproate

Table 8. Microbial parameters in lambs fed wheat or corn diets (values are mean of 6 observations)

Fermentative compartment	Diet		Wheat		Corn		SEM	D	Effect ¹	
	Rumen	Cæcum	Rumen	Cæcum	Rumen	Cæcum			FC	D*FC
<u>Quantification</u>										
Total protozoa log (cells/ml)	5.89	/ ²	5.55	/ ²	0.108	0.056	/	/		
Entodiniomorphs (< 100 µm) log (cells/ml)	5.89	/ ²	5.54	/ ²	0.102	<0.05	/	/		
Entodiniomorphs (> 100 µm) log(cells/ml)	3.84	/ ²	3.44	/ ²	0.263	NS	/	/		
<i>Dasytricha</i> log(cells/ml)	3.93	/ ²	2.72	/ ²	0.146	<0.01	/	/		
<i>Isotricha</i> log(cells/ml)	4.25	/ ²	2.81	/ ²	0.187	<0.01	/	/		
<i>mcrA</i> log(copies/g DM)	8.81	8.34	8.46	7.66	0.088	<0.01	<0.01	0.08		
<i>rrs</i> log(copies/g DM)	12.10 ^a	12.18 ^a	12.04 ^a	11.77 ^b	0.078	<0.05	NS	<0.05		
<i>mcrA</i> log(total numbers)	11.41 ^a	10.20 ^b	11.26 ^a	9.40 ^c	0.095	<0.01	<0.01	<0.05		
<i>rrs</i> log(total numbers)	14.70 ^a	14.06 ^b	14.82 ^a	13.51 ^c	0.074	<0.05	<0.01	<0.01		
<i>mcrA/rrs</i> (x 10 ⁻²)	5.16 ^a	1.42 ^b	2.89 ^c	0.80 ^b	2.3	<0.01	<0.01	<0.05		
<u><i>mcrA</i> expression</u>										
ΔCt	10.45	12.79	11.21	12.01	0.874	NS	<0.05	NS		
2 ^{-ΔCt} (x 10 ⁻⁵)	11.1	4.40	17.1	9.30	5.55	NS	NS	NS		
<u>Diversity</u>										
<u><i>mcrA</i> DNA DGGE profiles</u>										
Number of bands	18.33	16.50	17.54	16.45	1.632	NS	NS	NS		
Evenness index	0.38	0.38	0.39	0.39	0.008	NS	NS	NS		
Shannon Diversity Index	1.09	1.07	1.12	1.09	0.050	NS	NS	NS		
Dominance Index	0.11	0.11	0.09	0.10	0.015	NS	NS	NS		
<u><i>rrs</i> DNA DGGE profiles</u>										
Number of bands	44.00 ^a	44.66 ^a	47.17 ^a	32.33 ^b	1.9590	<0.05	<0.01	<0.01		
Evenness index	0.40	0.40	0.40	0.44	0.023	NS	NS	NS		
Shannon Diversity Index	1.50	1.52	1.55	1.53	0.087	NS	NS	NS		
Dominance Index	0.04	0.04	0.03	0.09	0.01	NS	NS	NS		

¹ D, diet; FC, fermentative compartment; NS, not significant;² Protozoa population not present in ceecal contents^{a-c} values in the same row are significantly different

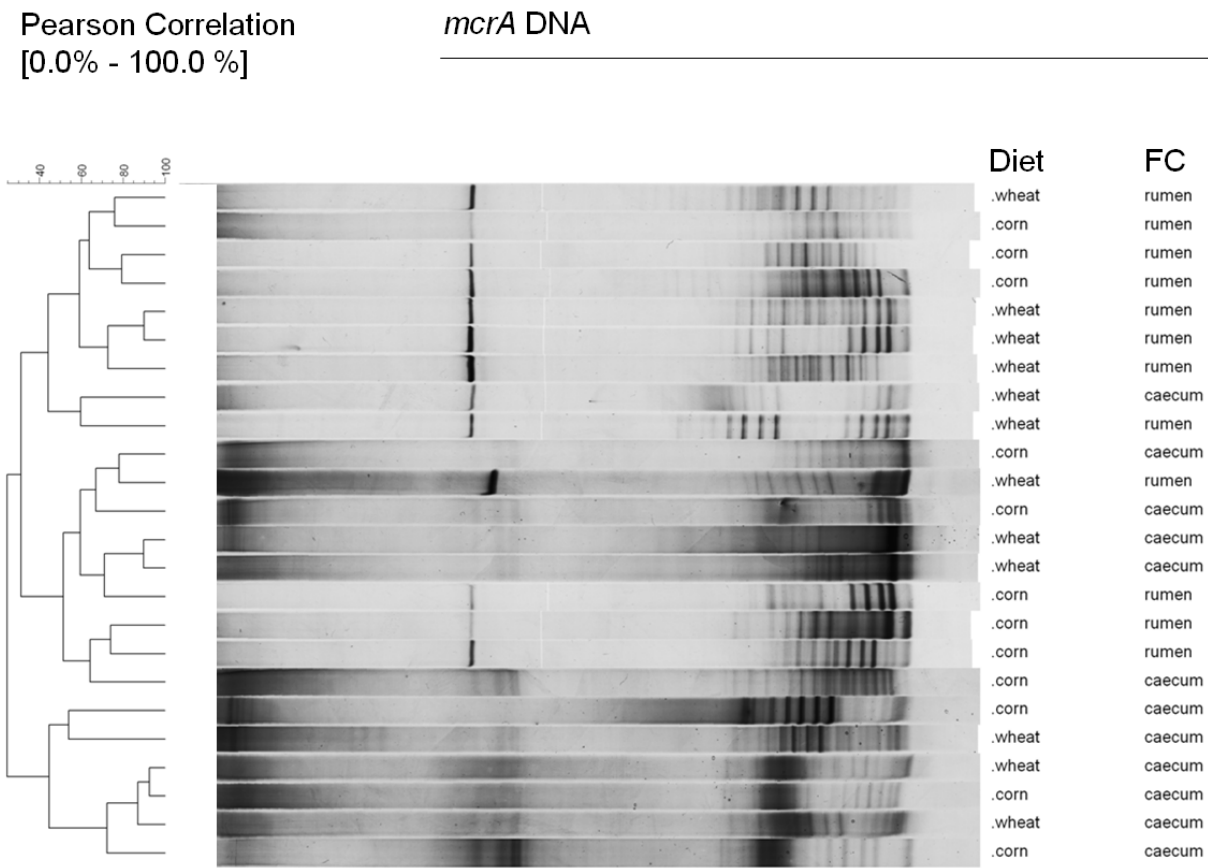


Figure 1. PCR-DGGE profiles of *mcrA* DNA sequences of methanogens from rumen and caecum of lambs (n=12) fed a wheat or corn diet. The similarity among profiles was calculated with the Pearson product–moment correlation coefficient and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). FC, fermentative compartments

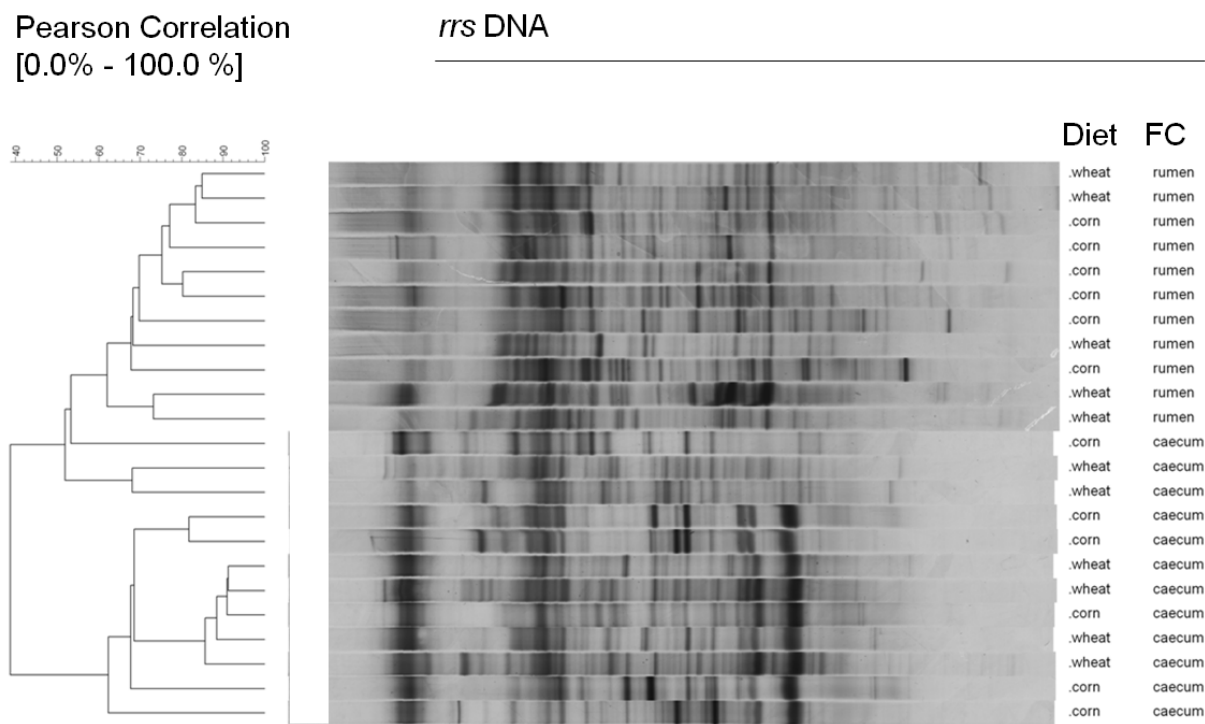


Figure 2. PCR-DGGE profiles of *rrs* DNA sequences of bacteria from rumen and caecum of lambs (n=12) fed a wheat or corn diet. The similarity among profiles was calculated with the Pearson product–moment correlation coefficient and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA). FC, fermentative compartments

X.3. TROISIEME EXPERIMENTATION

Effet des rations riches en fibres et en amidon sur la diversité et l'activité des *Archaea* méthanogènes chez des taurillons Charolais en engraissement

La production de viande bovine en France est majoritairement assurée (60%) par le troupeau allaitant, essentiellement de taurillons (24%) et de vaches (25%). Les taurillons sont engraisés dans des ateliers spécialisés intensifs (chargement et niveau alimentaire élevés) pour maximiser la productivité. Si la qualité reste primordiale, le consommateur intègre de nouvelles exigences quant au respect de l'animal et son environnement. Le projet « DEFIVIANDE » a été mis en place pour apporter des éléments chiffrés aux opérateurs de la filière viande bovine ainsi qu'aux organismes d'élevage pour les aider à adapter les modes de production et à choisir les animaux et les pratiques d'élevage les plus aptes à répondre à ces nouveaux défis tout en maintenant une compétitivité durable.

Ce travail a été conduit en collaboration entre l'**Unité de Recherches sur les Herbivores** de l'INRA de Clermont Ferrand Theix, l'**Unité Expérimentale** de l'INRA de Bourges avec le soutien des entreprises **Valorex** et **McKey**. La durée prévue du projet était de 2 ans, l'équipe DIMA y a participé que la première année.

La production de méthane était mesurée sur une cinquantaine de taurillons Charolais à l'engraissement recevaient un régime fibreux (F) ou un régime riche en amidon complété avec des graines de lin extrudées (SL) (Eugène *et al.*, in press). L'abondance, la diversité et l'activité métabolique des méthanogènes étaient étudiées chez 20 animaux (10 par régime). En effet les animaux ont été abattus en fin d'engraissement et tous les échantillons de contenu ruminal ont été prélevés à ce moment là. Pour des contraintes logistiques les animaux étaient abattus sur deux jours consécutifs ce qui imposait que la moitié parmi eux soit à jeûne depuis 24h et l'autre moitié – depuis 48h. Pour minimiser les différences entre animaux, mais également parce que nous ne savons pas à quel point l'écosystème ruminal puisse être perturbé par le jeûne prolongé, nous avons travaillé uniquement sur les taurillons abattus le premier jour.

Les émissions journalières de méthane étaient plus basses chez les taurillons alimentés avec la ration SL que chez ceux alimentés avec la ration F. Les *Archaea* méthanogènes ont été étudiées en utilisant des outils moléculaires ciblant le gène fonctionnel *mcrA*. L'abondance des méthanogènes était semblable dans les deux groupes d'animaux, mais les nombres de protozoaires étaient 65 % plus bas dans le groupe F. Le régime SL a diminué la diversité des

méthanogènes, ainsi que leur activité métabolique, évaluées par PCR-DGGE et le reverse-transcriptase qPCR respectivement. Au contraire, aucun changement n'a été observé dans les nombre et diversité bactériens entre les régimes. Les données indiquent que la réduction de la production journalière de méthane avec le régime SL a été associée aux changements du microbiote ruminal, particulièrement l'activité méthanogène. La caractérisation de l'activité et de la structure l'écosystème microbien entier devrait fournir une meilleure prédiction de la méthanogenèse.

**EFFECT OF FIBRE- AND STARCH-RICH FINISHING DIETS ON
METHANOGENIC *ARCHAEA* DIVERSITY AND ACTIVITY IN THE RUMEN
OF FEEDLOT BULLS”**

M. Popova, C. Martin, M. Eugène, M.M. Mialon, M. Doreau, D. P. Morgavi*
INRA, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

*Corresponding author. Tel: +33 4 73 62 40 57; Fax: +33 4 73 62 46 59
EM: diego.morgavi@clermont.inra.fr

ACCEPTE POUR PUBLICATION DANS ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGIES SPECIAL
ISSUE



Contents lists available at ScienceDirect

Animal Feed Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anifeedsci



Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls

M. Popova, C. Martin, M. Eugène, M.M. Mialon, M. Doreau, D.P. Morgavi*

INRA, UR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France

ARTICLE INFO

Available online xxx

Keywords:
Methanogens
Methane
Bulls
mcrA
qPCR
DGGE

ABSTRACT

Methanogenesis plays an important role in maintaining low hydrogen partial pressure in the rumen and consequently in feed digestion. Diet composition and lipid supplementation are known to influence the extent of methane (CH₄) production in ruminants. However, the impact of diet composition on rumen methanogens is poorly understood. This study examined CH₄ production and methanogen community abundance, diversity and metabolic activity in the rumen of fattening bulls fed a fibrous diet (F; *n* = 10) or a starch rich diet supplemented with extruded linseed (SL; *n* = 10). Net CH₄ emissions from bulls fed SL were lower than emissions from bulls fed F. Methanogenic *Archaea* were studied using culture independent methods targeting the functional *mcrA* gene. Methanogen abundance was similar in the two groups of bulls, but protozoa numbers were 65% lower in the F group. The SL diet decreased methanogen diversity and metabolic activity, which were evaluated by PCR-DGGE and reverse transcriptase qPCR, respectively. In contrast, no changes occurred in bacterial numbers and diversity between diets. Data indicate that reduction in net CH₄ production with the SL diet was associated with changes in rumen microbiota, particularly methanogen activity. Characterization of the activity and structure of the whole rumen microbiota should provide a better prediction of methanogenesis.

This paper is part of the special issue entitled: Greenhouse Gases in Animal Agriculture – Finding a Balance between Food and Emissions, Guest Edited by T.A. McAllister, Section Guest Editors; K.A. Beauchemin, X. Hao, S. McGinn and Editor for Animal Feed Science and Technology, P.H. Robinson.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Methane (CH₄) is produced in the gastrointestinal tract of ruminants by a particular group of microbes, the methanogenic *Archaea* (Baldwin and Allison, 1983). Methanogens use dihydrogen (H₂) to reduce carbon dioxide to CH₄, thus keeping H₂ partial pressure low and favouring fermentation of feeds. However, CH₄ is an undesirable end product of rumen fermentation as it represents an energy loss to the host animal and because it is a greenhouse gas.

Various strategies have been proposed to reduce enteric CH₄ emissions, mainly by dietary manipulation (Martin et al., 2010). CH₄ production/kg product in feedlot cattle decreases with increasing proportion of starch in the diet (Beauchemin and McGinn, 2005; Doreau et al., 2011). Lipid supplementation, within levels that do not affect dietary digestion and animal

Abbreviations: cDNA, complementary DNA; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis; DM, dry matter; qPCR, real time quantitative polymerase chain reaction; SF₆, sulfur hexafluoride; tNA, total nucleic acids.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 73 62 40 57; fax: +33 4 73 62 46 59.

E-mail address: diego.morgavi@clermont.inra.fr (D.P. Morgavi).

0377-8401/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.060

Please cite this article in press as: Popova, M., et al., Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. Anim. Feed Sci. Technol. (2011), doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.060

Table 1

Chemical composition of the experimental diets.

	Diet ^a		Barley straw
	F	SL	
Organic matter (g/kg DM ^b)	800	824	852
Crude protein (g/kg DM)	159	200	41
aNeutral detergent fibre (g/kg DM)	379	196	601
aAcid detergent fibre (g/kg DM)	206	104	383
Starch (g/kg DM)	75	337	31
Ether extract (g/kg DM)	28	47	–
Gross energy (MJ/kg DM)	18.9	19.7	19.3

^a Diet rich in fibre (F) or rich in starch and supplemented with lipids (SL).^b DM, Dry matter.

performance, has also been shown to generally decrease CH₄ production (Beauchemin et al., 2008; Eugène et al., 2008; Martin et al., 2008, 2010). It was recently shown that the combined effect of a high starch diet supplemented with extruded linseed reduced CH₄ production in feedlot bulls compared to a diet higher in fibre (Eugène et al., in this issue).

Previous findings suggest that there is no link between CH₄ production in ruminants and the numbers of methanogens in faunated and defaunated sheep (Newbold et al., 1995; Popova et al., 2010a) or with a coconut oil supplemented diet (Machmüller et al., 2003). In contrast, there was a shift in methanogen diversity in the rumen of steers following a switch from a low to high concentrate diet (Zhou et al., 2010), but CH₄ production was not measured. The methanogenic communities in ruminants with high and low residual feed intake fed a low energy diet were also reported to differ (Zhou et al., 2009). Understanding the ecology of methanogens in ruminants fed different diets can help to elucidate the microbial mechanisms of CH₄ production in the rumen.

The methanogenic pathway involves a series of co-enzymes, many of them unique and ubiquitous to methanogens (Rouviere and Wolfe, 1988). For instance, methyl coenzyme-M reductase is crucial to the terminal step of methanogenesis and the *mcrA* gene coding for this enzyme can be used as a phylogenetic and functional marker to enumerate methanogens and to assess their diversity in an ecosystem (Luton et al., 2002). Targeting a gene which codes for an enzyme also offers the potential for development of activity based detection methods by analysis of messenger RNA. Thus molecular biology tools that target the *mcrA* gene in DNA and mRNA extracted from the rumen are a reliable method to estimate the abundance, diversity and activity of rumen methanogens.

The aim of our work was to compare the methanogenic community in terms of number, diversity and metabolic activity in the rumen of young bulls fed two feedlot diets differing in the amount of fibre and energy dense starch and lipid components.

2. Materials and methods

2.1. Animals, diet and experimental design

The study was conducted at the animal experimental facilities of INRA's Experimental Unit in Bourges (France) and at the Herbivore Research Unit in Saint-Genès Champanelle (France). Animal procedures were in accordance with the guidelines for animal research of the French Ministry of Agriculture and applicable European guidelines and regulations for animal experimentation (www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html).

Animals and treatments are described in Eugène et al. (in this issue). Briefly, bulls were divided in two groups and fed two fattening diets for 16–18 mo until slaughter. The two dietary treatments consisted of a diet rich in fibre (F) and a diet rich in starch supplemented with lipids (SL). Both diets were composed of concentrate and of barley straw offered *ad libitum*. Concentrate of the F diet (on a dry matter (DM) basis) consisted mainly of cereal by-products (403 g/kg, wheat and maize bran), dehydrated lucerne pellets (224), dehydrated beet pulp (212), rapeseed and palm kernel meal (75) and other ingredients (86). The concentrate of the SL diet consisted mainly of cereals (464; barley, maize and oat grains), dehydrated beet pulp (60), rapeseed meal (214) and a linseed mixture (120) containing extruded linseed and other components to achieve a theoretical level of 12 g/kg of DM as omega-3 fatty acids from linseed. Ingredients such as molasses and soya meal (142) completed the diet. Eugène et al. (in this issue) includes details of the analysis methods and the full list of ingredients. The complete chemical composition of the diets is in Table 1. Feed intake was recorded 5 d/wk and bulls were weighed every 2 wk. From the total of 50 bulls used by Eugène et al. (in this issue), 10 bulls were randomly selected from each diet group for our study.

2.2. CH₄ production

CH₄ production was measured at the start, middle and end of the fattening period. Each bull was measured individually during a 5 d period using the sulfur hexafluoride (SF₆) tracer technique (Eugène et al., in this issue). Only results of CH₄ production at the end of fattening from the 20 bulls were used in the data presented here.

2.3. Rumen content sampling for fermentation and microbial parameters

Bulls were slaughtered at INRA-Theix's experimental abattoir at average age of 18 ± 1.3 mo and body weight of 711 ± 55.8 kg. The entire gastrointestinal tract was removed as soon as possible after slaughter and representative samples of homogenised rumen contents were collected and weighed along with whole rumen contents.

The pH was measured with a portable pH-meter (CG840, electrode Ag/AgCl, Schott Geräte, Hofheim, Germany) at 5 locations immediately after opening the rumen. An aliquot of rumen contents (~ 250 g) was strained through polyester monofilament fabric ($250 \mu\text{m}$ mesh aperture) to separate the liquid phase. For volatile fatty acids (VFA), 0.8 ml rumen fluid filtrate was mixed with 0.5 ml of 4 mg/ml (w/v) crotonic acid and 20 mg/ml (w/v) metaphosphoric acid in 0.5 M HCl, kept at 4°C for at least 2 h, centrifuged ($16,500 \times g$ for 10 min at 4°C) and supernatant stored at -20°C until analysis. VFA were analysed by gas chromatography using crotonic acid as the internal standard (Morgavi et al., 2003) on a CP 9002 Gas Chromatography (Chrompack, Middelburg, Germany). One ml of rumen fluid was added to 1 ml MFS solution (35 ml/l formaldehyde, 0.14 M NaCl, 0.92 mM methylgreen) and stored in the dark at room temperature (i.e., 21°C) until protozoa were counted. Rumen fluid/MFS solutions were diluted in an equal volume of Phosphate Buffer Saline (PBS) before protozoa enumeration (Ranilla et al., 2007) under a microscope ($\times 400$) in a Neubauer Chamber.

Another aliquot of total rumen contents (~ 30 g) was diluted with 15 ml ice cold PBS pH 6.8 and homogenised, for three 1 min cycles with 1 min intervals on ice, using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde Switzerland). Approximately 0.5 g were transferred to a 2 ml Eppendorf tube and mixed with 1 ml of RNeasy Lysis Reagent:RNA Stabilization Solution (Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Tubes were kept at 4°C overnight to allow the solution to thoroughly penetrate the cells, as suggested by the manufacturer, and stored at -80°C until molecular analyses.

2.4. Total nucleic acids extraction and cDNA synthesis

Total nucleic acids (tNA) were extracted as described by Popova et al. (2010b). Each tNA sample was divided into two equal fractions; DNA in one of the fractions was digested with rDNase, RNase-free (from the Total RNA Isolation Kit, Macherey Nagel, France) using a modified protocol, as described by Popova et al. (2010b).

The yield and purity of extracted tNA and RNA samples were assessed by optical density measurements using a NanoQuant Plate on an Infinity spectrophotometer (TECAN, Switzerland). RNA integrity was estimated with the Agilent RNA 6000 Nano Kit on an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Results were analysed using the Software 2100 Expert, version B.02.07.SI482 (Beta; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Indicators of RNA integrity were the RNA Integrity Number (RIN, maximum value 10), the 23S rRNA/16S rRNA ratio (optimum value 2) and the absence of degradation (low baseline; Schroeder et al., 2006).

Total RNA ($1 \mu\text{g}$) was reverse transcribed in cDNA using Random Primers (Promega, Madison, WI, USA) $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ RNA. To allow template/primers to anneal, the mixture was brought to 70°C for 5 min followed by 5 min on ice. After annealing, a buffer mixture containing AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), dNTP and DEPC-treated water was added to each tube and reverse transcription was performed for 60 min at 37°C using MyCycler thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA). In a final volume of $40 \mu\text{l}$, each reaction had 0.625 mM each dNTP, 30 units of AMV reverse transcriptase and $1.25\times$ reaction buffer supplied with the enzyme.

A negative control with no template was completed for the reaction mixture. In addition, a negative control without addition of reverse transcriptase was completed for each sample. These negative controls were also used in subsequent PCR and qPCR reactions to confirm the amplification of cDNA templates free of DNA contamination.

2.5. Microbial diversity analysis by PCR-DGGE

The *mcrA* and *rrs* genes were used as molecular markers for methanogen and bacterial populations, respectively. For PCR amplification, 50 ng of total nucleic acids samples and $5 \mu\text{l}$ of cDNA samples were used.

PCR amplification of the *mcrA* sequences used the primers previously described to be specific for methanogens (Table 2) with the addition of a GC clamp (40 bp) at the 5'-end of the forward primer (Muyzer et al., 1993). Each reaction contained in

Table 2
Oligonucleotides used for PCR-DGGE and qPCR analysis.

Oligonucleotides	Oligonucleotide Sequences	Target	Amplicon length (bp)	Use in	References
534R – 341F-GC	5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG 5'-(GC)-CC TAC GGG AGG CAG CAG	<i>rrs</i> Bacteria	193	PCR-DGGE	Muyzer et al. (1993)
mcrAr – mcrAf-GC	5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT 5'-(GC)-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC	<i>mcrA</i> Methanogens	460–490	PCR-DGGE	Luton et al. (2002)
qmcrA-R – qmcrA-F	5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC 5'-TTCGGTGGATCDACARAGGC	<i>mcrA</i> Methanogens	140	qPCR	Denman et al. (2007)
799R2 – 520F	5'-AACAGGATTAGATACCCTG 5'-AGCAGCCGCGGTAAAT	<i>rrs</i> Bacteria	280	qPCR	Edwards et al. (2007)

a 50 µl final volume, 1.25 units of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen), 1× PCR Buffer (supplied with the enzyme), 3 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.25 µM each primer. PCR was performed using MyCycler thermal Cycler (BioRad Laboratories) according to the protocol of Lutton et al. (2002).

The V3 region of the bacterial *rrs* gene was amplified in PCR using primers 341f-GC clamp and 534r (Table 2). Each reaction contained in 50 µl final volume 1.25 units of HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen), 1× PCR Buffer (supplied with the enzyme), 0.2 mM dNTP mix and 0.25 µM of each primer. PCR was performed using MyCycler thermal Cycler (BioRad Laboratories) as described by Sadet et al. (2007).

PCR amplification products were analysed by agarose gel (20 mg/ml of TAE Buffer 1×, 40 mM Tris base, 40 mM glacial acetic acid, 1 mM EDTA) electrophoresis using ethidium bromide staining. Amplicon size and concentration were estimated using a Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and an imaging system ChemImager (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

PCR products were loaded onto a 6–8 mg/ml (w/v) gradient polyacrylamide gel with different ranges of denaturant concentrations (100% denaturant was defined as 7 mol/l urea and 400 (v/v) formamide (Muyzer et al., 1993)). The *mcrA* PCR products were applied to a gradient of 10–30% denaturant. The denaturant gradient used to separate the bacterial *rrs* PCR products was 30–55%. DGGE was run in 0.5× TAE Buffer for 5.3 h (for *mcrA*) and 5 h (for *rrs*) at 60 °C using a fixed voltage of 200 mV in DGGE 2001 (CBS Scientific Co, Del Mar, CA, USA). Approximately 100 ng of PCR product for both *mcrA* and *rrs* were loaded per well of the polyacrylamide gel.

Gels were silver stained using a commercial kit (BioRad Laboratories). The large number of samples required several gels to complete the study. To normalize for differences among gels, an outside sample from a wether was used as the standard. The same *mcrA* or *rrs* PCR products of this rumen sample were run on every gel and used as standard for comparison of gels. The similarity of standards between gels was 90.3% for the *mcrA* and 88.6% for bacterial *rrs*.

Gel images were acquired using an optical density calibrated scanner (Epson Scanner, Epson, France) at a spatial resolution of 600 d.p.i. and each band was considered an operational taxonomical unit. Images were analysed with GelCompar II version 4.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Banding profiles were quantified 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 was used to calculate the community biodiversity using three indices: (i) the Shannon index (*H*) calculated as:

$$H = -\sum \left(\frac{ni}{N} \right) \ln \left(\frac{ni}{N} \right)$$

(ii) the dominance index (*c*) calculated as:

$$c = \sum \left(\frac{ni}{N} \right)^2; \text{ and}$$

(iii) the evenness index (*e*) calculated as:

$$e = \frac{H}{\ln S}$$

according to Fromin et al. (2002) and Sadet et al. (2007).

DGGE profiles were normalised and compared using hierarchical clustering to join similar profiles into groups (Fromin et al., 2002). To this end, all images of DGGE gels were matched using the internal control sample and bands were quantified after 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 and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA).

2.6. Microbial communities' quantification and gene expression

Real time quantitative PCR was carried out using a StepOne™ system (Applied Biosystems, Courtabeuf, France). Assays were in triplicate using SYBR Premix Ex Taq™ (Takara Bio Inc, Otsu, Japan) and were used 20 ng of tRNA or 20 µl of total cDNA. Negative controls without DNA template were run with every assay to assess overall specificity.

Primers used to quantify *mcrA* DNA or cDNA templates are in Table 2. Reaction volume was set to 25 µl supplemented with additional 1 mM MgCl₂ and 0.3 µM of each primer. The PCR parameters for *mcrA* sequence amplification were an initial denaturation step (50 °C for 2 min and 95 °C for 1 min) and 40 cycles of amplification (95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min). Amplicon specificity was checked via dissociation curve analysis of PCR end products by increasing the temperature at a rate of 0.4 °C/min from 60 to 95 °C. Average amplification efficiency, slope and *R*² of qPCR assays targeting *mcrA* gene were of 96%, −3.43 and 0.995, respectively.

Bacterial *rrs* DNA quantification used primers targeting the V3 region of the bacterial *rrs* gene (Table 2). Assays were in a total volume of 20 µl and the final concentration of *rrs* primers was 0.5 µM. The PCR parameters for *rrs* sequence amplification were an initial denaturation step at 95 °C for 10 min and 40 cycles of amplification (95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min); the amplified product specificity was determined by dissociation curve analysis obtained by temperature increase from 60 to 95 °C at the rate of 0.6 °C/min. Average amplification efficiency, slope and *R*² of qPCR assays targeting *rrs* gene were of 89%, −3.64 and 0.999, respectively.

Gene copies in rumen content samples were quantified and results expressed as gene copies/g DM of rumen content or total gene copies in whole rumen contents. Absolute quantification involved use of standard curves that had been prepared with PCR products corresponding to a partial sequence of *mcrA* gene of *Methanobrevibacter ruminantium* 1093 (DSM) and almost the entire sequence of *rrs* gene of *Prevotella bryantii* B14 (DSM 11371). Standard curves were created using triplicate fold dilutions series ranging from 2.5×10^2 to 2.5×10^8 copies for *mcrA* gene and from 1×10^2 to 1×10^8 copies for bacterial *rrs* gene.

Expression of the functional *mcrA* gene was assessed using relative quantification by the threshold cycle (Ct) of the qPCR. Statistical analysis of gene expression was on the 2^{-Ct} values as suggested by Schmittgen and Livak (2008).

2.7. Statistical analysis

To determine treatment effects of the diet on CH₄ and VFA production, pH, gene copy numbers and diversity indexes data from each animal were analysed using PROC MIXED of SAS (2003) with Tukey's adjustment. The model included diet as a fixed effect with bull (diet) as a random effect. Effects were declared significant at $P \leq 0.05$ and trends were declared for $P < 0.10$.

3. Results

3.1. Dry matter intake, CH₄ output and fermentation parameters

At the end of the fattening period, bulls fed the fibrous diet consumed more feed and had more rumen contents ($P < 0.01$) than those fed SL (Table 3). Bulls fed F produced 21% more CH₄ (g/d) than those receiving SL ($P < 0.01$). However, there was no difference between groups when emissions were calculated as g CH₄/kg DM intake or relative to gross energy intake.

At slaughter, total VFA molar concentration were not higher in bulls fed F compared to those fed SL. However the proportion of acetate was lower, whereas proportions of the isoacids (iso-valerate, iso-butyrate) were higher in bulls fed SL (Table 3). There was no difference between diets in propionate and butyrate molar proportions or in the acetate:propionate molar ratio. Ruminal pH was similar between the two groups of bulls.

3.2. Microbial community structure

Total nucleic acids (DNA and RNA) were extracted from whole rumen contents with similar yields between diets. The amount of RNA extracted when expressed as proportion of the tRNA sample was equally similar across samples and diets (data not shown). After DNA digestion, RNA integrity was checked using an Agilent RNA 6000 Nano Kit. Electropherograms presented two major peaks corresponding to the 16S and 23S ribosomal RNA (rRNA). Mean RIN was $7.4 (\pm 0.14)$ and mean rRNA 16S/rRNA 23S ratio was 0.97 ± 0.22 .

Results of qPCR quantification of the Archaeal *mcrA* and bacterial *rrs* gene copies are summarized in Table 4. The *mcrA* gene concentration as well as total copy number in the rumen contents were similar between both groups of bulls. The concentration of bacterial *rrs* copies tended ($P = 0.09$) to increase in bulls fed SL, but there was no difference in total *rrs* copies in rumen contents between diets. There was an increase of >65% in protozoal numbers in bulls fed SL as compared to those

Table 3

Dry matter intake, CH₄ output and rumen fermentation parameters in bulls ($n = 20$) fed a fibre or a starch-rich diet supplemented with lipids.

	Diet ^a		SEM	P
	F	SL		
DM intake (kg/d)	10.2	7.9	0.29	<0.01
Total rumen contents (kg DM ^b)	6.4	4.7	0.33	<0.01
pH	6.7	6.9	0.05	0.12
CH ₄ output				
CH ₄ (g/d)	357	282	16.21	<0.01
CH ₄ /GE intake (g/kg) ^c	108	102	0.56	0.47
CH ₄ /DM intake (g/kg)	35	35.7	2.63	0.17
Fermentation parameters				
Total VFA (mM)	81.8	68.7	5.67	0.12
Acetate (mmol/mol)	678	647	0.09	0.03
Propionate (mmol/mol)	176	179	0.74	0.80
Butyrate (mmol/mol)	98	107	0.62	0.32
Iso butyrate (mmol/mol)	13	19	0.10	<0.01
Valerate (mmol/mol)	10	14	0.09	0.02
Iso valerate (mmol/mol)	20	30	0.37	<0.01
Acetate/propionate	3.9	3.7	0.19	0.36

^a Diet rich in fibre (F) or rich in starch and supplemented with lipids (SL).

^b DM, dry matter.

^c GE, gross energy.

Please cite this article in press as: Popova, M., et al., Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. Anim. Feed Sci. Technol. (2011), doi:10.1016/j.anifoodsci.2011.04.060

Table 4Rumen microbial parameters in bulls ($n = 20$) fed a fibre or a starch-rich diet supplemented with lipids.

	Diet ^a		SEM	P
	F	SL		
Microbial numbers				
Bacterial <i>rrs</i> copy number/g DM ^b ($\log_{10}$)	11.77	12.21	0.17	0.09
Total bacterial <i>rrs</i> copies ($\log_{10}$)	15.05	15.59	0.19	0.11
<i>mcrA</i> copy number/g DM ($\log_{10}$)	9.02	9.07	0.16	0.83
Total <i>mcrA</i> copies ($\log_{10}$)	12.77	12.78	0.17	0.97
Protozoa cell/ml ($\times 10^5$)	4.28	13.2	1.42	<0.01
Microbial diversity				
<i>rrs</i> DNA band number	45.8	49.8	1.8	0.13
<i>rrs</i> DNA Shannon diversity index	1.54	1.58	0.02	0.11
<i>rrs</i> DNA evenness diversity index	0.93	0.93	0.004	0.61
<i>rrs</i> DNA dominance diversity index	0.035	0.031	0.002	0.14
<i>mcrA</i> DNA band number	19.6	14.5	0.9	<0.01
<i>mcrA</i> DNA Shannon diversity index	1.17	1.03	0.03	<0.01
<i>mcrA</i> DNA evenness diversity index	0.91	0.9	0.008	0.55
<i>mcrA</i> DNA dominance diversity index	0.08	0.10	0.006	<0.01
Gene expression				
<i>mcrA</i> cDNA band number	12.78	8	0.8	<0.01
<i>mcrA</i> cDNA Shannon diversity index	0.95	0.79	0.04	<0.01
<i>mcrA</i> cDNA evenness diversity index	0.86	0.88	0.02	0.39
<i>mcrA</i> cDNA dominance diversity index	0.14	0.19	0.02	<0.05
<i>mcrA</i> 2 ^{-Ct} ($\times 10^{-7}$)	1.72	0.867	0.187	<0.01

^a Diet rich in fibre (F) or rich in starch and supplemented with lipids (SL).^b DM, dry matter.

fed F (Table 4). Small Entodiniomorphs (<100 μm) were predominant and tended ($P=0.09$) to be more abundant in bulls fed SL as compared to those fed F (983 versus 970 cells/1000 cells). *Dasytricha* were more abundant ($P=0.05$) in F, but they represented just 30 cells per 1000 protozoal cells and there was no difference in large Entodiniomorphs and *Isotricha* sp. that represented on average 4.4 and 16.8 cells per 1000 protozoa, respectively.

Diversity indices were calculated from the *mcrA* and *rrs* DNA PCR-DGGE profiles (Table 4). The *mcrA* profiles in both DNA and cDNA samples had higher number of bands and Shannon diversity index ($P<0.01$) and lower dominance index in bulls fed F than in those fed SL, but the evenness index was similar between diets. There was no difference between diets neither in the number of bands nor in the values of the diversity indexes for the *rrs* DNA PCR-DGGE profiles.

Cluster analysis of *mcrA* DNA PCR-DGGE profiles revealed differences in the rumen methanogenic community between bulls fed F and SL (Fig. 1). Most SL samples grouped together and formed a well defined cluster with similarity of 88.6% among samples. The band patterns for bulls fed F, although well separated from those receiving SL, did not generate a distinct cluster. The similarity between samples was 74.9%. Concerning PCR-DGGE profiles for *mcrA* cDNA sequences (Fig. 2), samples from the 20 bulls had a high similarity without an obvious distinction in clusters between diets. Cluster analysis of the *rrs* DNA sequences did not show any difference in the bacterial community structure due to diet (data not shown). The *mcrA* cDNA amplicons were generated during qPCR from all samples. The *mcrA* 2^{-Ct} values were lower in bulls fed SL than in bulls fed F (Table 4).

4. Discussion

DM intake, CH₄ production and fermentation patterns are consistent with those obtained over the fattening period for the 50 bulls used in the companion paper (Eugène et al., in this issue). Net CH₄ emissions (CH₄ g/d) were reduced by 21% in bulls fed SL compared to those fed F. Higher DM intake by bulls fed F resulted in a higher total weight of rumen contents compared to bulls fed SL. As a consequence of the higher DM intake with F, there was no difference in CH₄ emissions between diets when expressed as g CH₄/kg DM intake. These results may be due to the higher starch and lipid content of the SL diet as compared to diet F. However the lipids supplemented by extruded linseed accounted for only 20 g/kg of DM in the SL diet, and previous studies showed that diets rich in starch reduced CH₄ production in feedlot cattle (Beauchemin and McGinn, 2005; Doreau et al., 2011). Moreover, the supply of lipids from linseed decreased the amount of CH₄ emitted by dairy cows (Martin et al., 2008), although Woodward et al. (2006) found no effect of lipid supplementation on methanogenesis in a long term study with dairy cows, suggesting that effects of lipids on CH₄ emissions are transitory. In their review, Martin et al. (2010) reported a decrease in CH₄ production of 4.8% with each supplement of 10 g linseed lipids/kg DM added to the ration, and suggested that effect of lipids on methanogenesis may depend on diet.

There were no large differences in rumen fermentation parameters between diets. As a result of the high starch content of the SL diet, there was a decrease in the proportion of acetate in rumen fluid. However, the acetate:propionate ratio remained constant in the two groups. Lack of differences in the acetate propionate ratio precludes a stoichiometric shift in H₂ utilisation. In addition, rumen pH which is also highly positively correlated to CH₄ production (Lana et al., 1998), was not

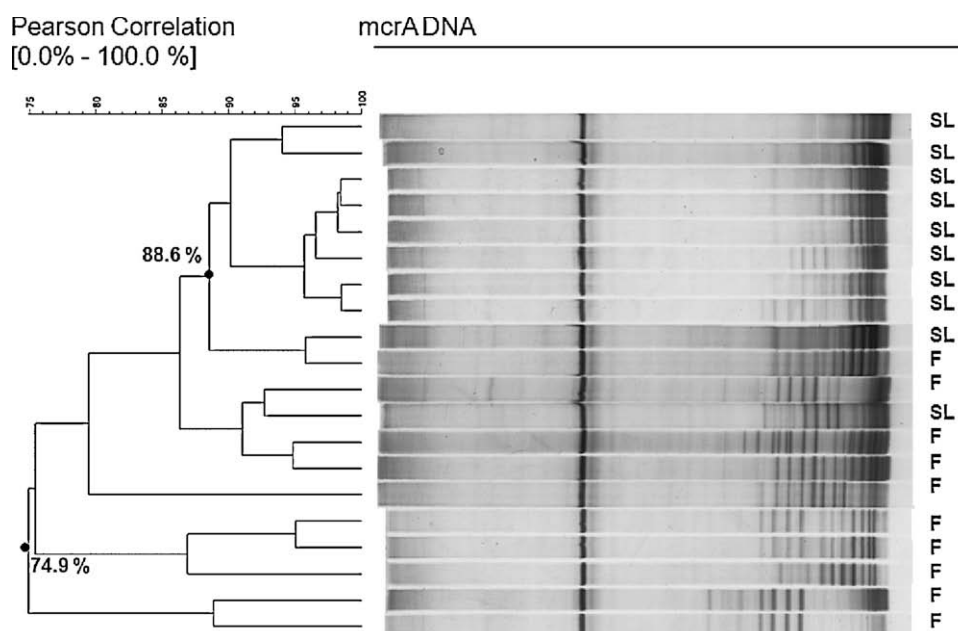


Fig. 1. PCR-DGGE profiles of present rumen methanogens (mcrA DNA) in bulls ($n = 20$) fed a fibre (F) or a starch-rich diet supplemented with lipids (SL). The similarity among profiles was calculated with the Pearson product-moment correlation coefficient and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA).

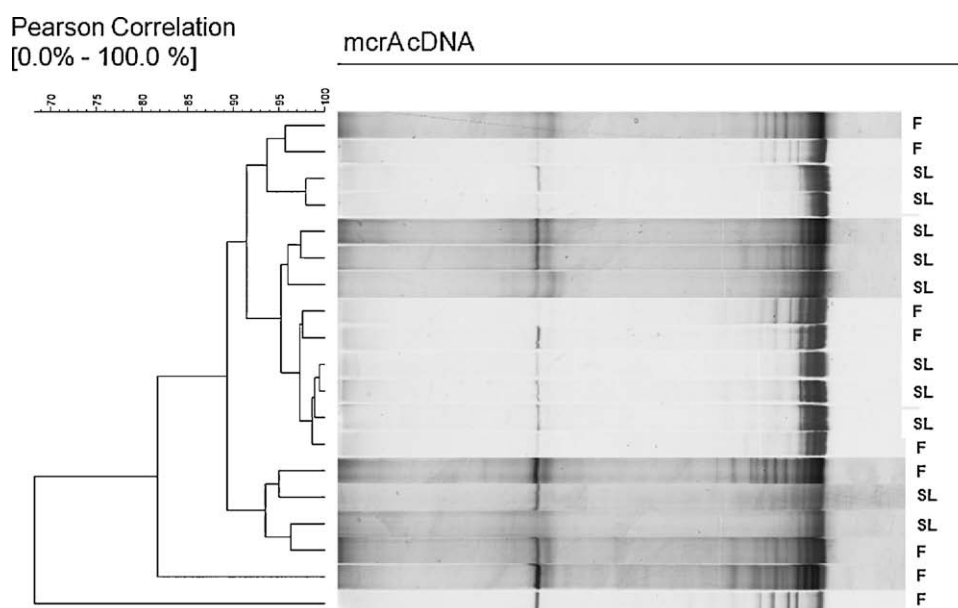


Fig. 2. PCR-DGGE profiles of metabolically active rumen methanogens (mcrA cDNA) in bulls ($n = 20$) fed a fibre (F) or a starch-rich diet supplemented with lipids (SL). The similarity among profiles was calculated with the Pearson product-moment correlation coefficient and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA).

affected by the starch rich diet (Table 3 and Eugène et al., in this issue). The absence of ruminal fermentation changes partly explains the lack of differences in CH_4 emission/kg DM intake. Martin et al. (2010) suggested that a low acetate:propionate ratio and depressed CH_4 production may not always be linked in high concentrate feeding in ruminants.

Lipids are known to have toxic effects on rumen microbes. Linolenic acid, abundant in linseed oil, has inhibitory activity against a range of common rumen bacteria in pure culture with cellulolytic bacteria being particularly sensitive (Maia et al., 2007). As discussed above, the concentration of linseed lipids in the rumen of SL fed bulls was low and unlikely to affect rumen microbes as evaluated by the absence of quantitative (qPCR) and qualitative (DGGE) changes in bacteria. However, the tools we used targeted total bacteria and so gave only a global overview of this microbial community. In contrast protozoa

increased in numbers, likely due to the higher proportion of starch in the SL diet (Mackie et al., 1978). Additionally, as mentioned above for bacteria, the concentration of linolenic acid in the SL diet was probably not toxic to protozoa. The increase in isobutyric and isovaleric acids, which results from deamination of valine and leucine respectively, can also be associated with higher protein degradation by protozoa (Eugène et al., 2004). This is consistent with the higher protozoal concentrations in the rumen of the bulls fed diet SL.

That the total number and concentration of *mcrA* copy numbers in the rumen contents of bulls was not influenced by diet is comparable to results reported with high and low RFI steers fed high and low energy diets (Zhou et al., 2010), although in the latter study there were no measures of CH₄ production. Lipid supplementation of diets depressed CH₄ production in sheep by 14% without affecting numbers of methanogen numbers (Machmüller et al., 2003), suggesting that the number of rumen methanogens may not be a key factor affecting CH₄ production in all situations.

Intake of fibrous concentrate enhanced development of a more diverse methanogenic community as shown by the higher number of bands and higher Shannon index of PCR-DGGE profiles from F compared to SL. Also, individual variability among bulls fed diet SL was less marked, as they grouped together in a well defined distinct cluster. As the SL diet was rich in starch and contained oil, it may have had a specific selection pressure on the methanogenic community. However, PCR-DGGE analysis of *mcrA* cDNA sequences did not reveal an impact of diet on metabolically active community members. Changing from a low to a high concentrate diet has been reported to have an impact on the structure of the methanogenic community (Zhou et al., 2010), and these authors suggested that diet composition may specifically select methanogens that differ in their methanogenic pathway and differences at the strain or genotype level may play an important role in CH₄ production (Zhou et al., 2010).

Expression of the functional *mcrA* gene suggested that methanogens in bulls fed SL were less metabolically active than in bulls fed F. Accordingly, CH₄ production by these bulls (g/d) was lower than that from bulls fed F. A decrease in CH₄ production associated with lower methanogenic activity has been described in sheep fed coconut oil (Machmüller et al., 2003). A decrease in CH₄ emissions may be due to a lower CH₄ production rate per single methanogenic cell and could depend on availability of H₂ as a substrate.

Dihydrogen is a major end product of protozoa metabolism, suggesting that the higher CH₄ production/kg DM intake may be due to a higher production of H₂/kg DM intake in bulls fed SL. This is consistent with the higher total tract digestibility in faunated compared to defaunated ruminants (Eugène et al., 2004). The extent of feed digestion in bulls fed SL, compared to those fed F, may have been enhanced by the higher protozoal population and thereby provide abundant H₂ for methanogenesis.

5. Conclusions

High starch diets and/or lipid supplementation are feeding strategies known to mitigate CH₄ emissions by ruminants without affecting their production. Differences in CH₄ production under two diet conditions in our study could be attributed to changes in rumen microbiota, particularly to methanogen activity, whereas other changes, such as the increase in protozoal numbers in the starch rich diet, may have diminished the CH₄ abatement potential of this diet. As to bacteria, further studies are needed to evaluate effects of diet on this microbial community. To better understand the effect of dietary, and other, CH₄ mitigations in ruminants, it seems essential to use a holistic approach in studying the rumen ecosystem. Interactions involving H₂ producers and methanogens and other H₂ users in the rumen should be better explored as they could open new targets for modification of the rumen microbiota for mitigation purposes.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

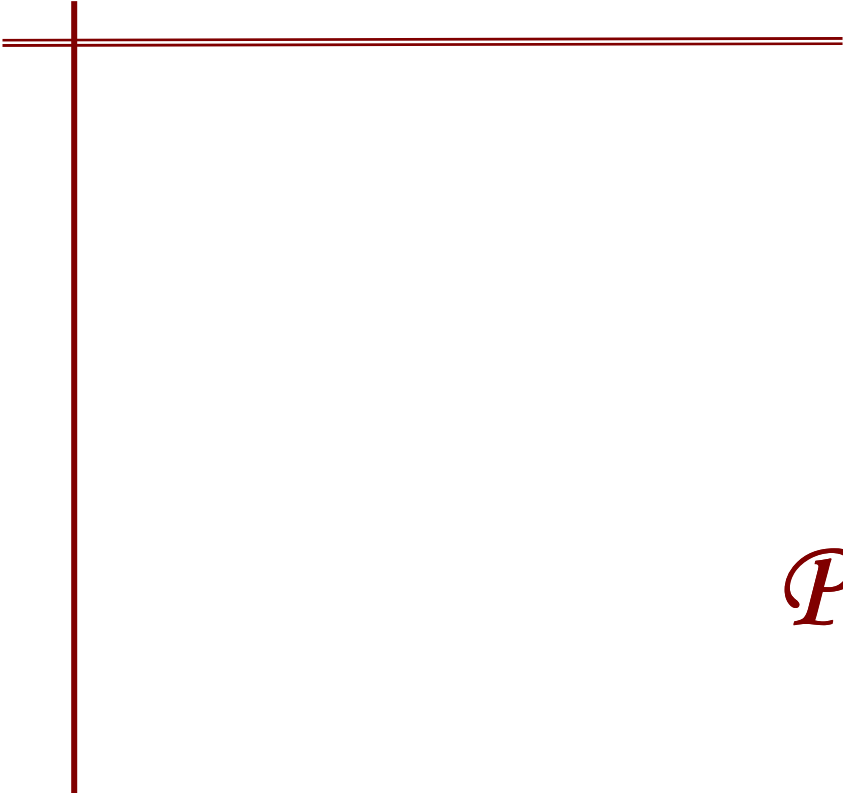
This experiment has been granted by the regional council of the French “Centre” region, by McKey Food Services (Fleury les Aubrais, France) and by Valorex (Combourtillé, France). The authors greatly thank the technicians of Experimental Unit Bourges and Experimental Unit Theix for taking care of the animals and the personal of the Experimental Abattoir of INRA Theix for help with sampling. M. Popova is the recipient of INRA – Région Auvergne scholarship.

References

- Baldwin, R.L., Allison, M.J., 1983. Rumen metabolism. *J. Anim. Sci.* 57, 461–477.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83, 653–661.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F., McAllister, T.A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48, 21–27.
- Denman, S.E., Tomkins, N.W., McSweeney, C.S., 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 313–322.
- Doreau, M., van der Werf, H.M.G., Micol, D., Dubroeuq, H., Agabriel, J., Rochette, Y., Martin, C., 2011. Enteric methane production and greenhouse gases balance of diets differing in concentrate in the fattening phase of a beef production system. *J. Anim. Sci.*, doi:10.2527/jas.2010.3140.

Please cite this article in press as: Popova, M., et al., Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* (2011), doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.04.060

- Edwards, J.E., Huws, S.A., Kim, E.J., Kingston-Smith, A.H., 2007. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 323–335.
- Eugene, M., Masse, D., Chiquette, J., Benchaar, C., 2008. Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 88, 331–334.
- Eugène, M., Archimède, H., Sauvant, D., 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 85, 81–97.
- Eugène, M., Martin, C., Mialon, M.M., Krauss, D., Renand, G., Doreau, M. Dietary linseed and starch supplementation decreases methane production of fattening bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.*, in this issue.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelles, S., Gillet, F., Aragno, M., Rossi, P., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 4, 634–643.
- Lana, R.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76, 2190–2196.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., Riley, P.W., 2002. The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521–3530.
- Machmüller, A., Soliva Carla, R., Michael, K., 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 43, 41–55.
- Mackie, R.I., Gilchrist, F.M.C., Robberts, A.M., Hannah, P.E., Schwartz, H.M., 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci.* 90, 241–254.
- Maia, M.R.G., Chaudhary, L.C., Figueres, L., Wallace, R.J., 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91, 303–314.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J.P., Doreau, M., Chilliard, Y., 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J. Anim. Sci.*, 2007-0774.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4, 351–365.
- Morgavi, D.P., Boudra, H., Jouany, J.P., Graviou, D., 2003. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agents. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 6906–6910.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Newbold, C.J., Lassalas, B., Jouany, J.P., 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 230–234.
- Popova, M., Martin, C., Rochette, Y., Graviou, D., Morgavi, D.P., 2010a. Methane emissions and rumen methanogens in sheep harbouring or not protozoa. In: *Proc. of the 7th Joint Symposium RRI-INRA "Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems"*, Aberdeen, UK.
- Popova, M., Martin, C., Morgavi, D.P., 2010b. Improved protocol for high-quality coextraction of DNA and RNA from rumen digesta. *Folia Microbiol.* 55, 368–372.
- Ranilla, M.J., Jouany, J.P., Morgavi, D.P., 2007. Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 45, 675–680.
- Rouviere, P.E., Wolfe, R.S., 1988. Novel biochemistry of methanogenesis. *J. Biol. Chem.* 263, 7913–7916.
- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., Morgavi, D.P., 2007. PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* 1, 939–944.
- Statistical Analysis System, 2003. SAS PC Windows Version 9.1.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M., Ragg, T., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol. Biol.* 7, 3.
- Woodward, S.L., Waghorn, G.C., Thomson, N.A., 2006. Supplementing dairy cows with oils to improve performances and reduce methane – does it work? *Proc N. Z. Soc. Anim. Prod.* 66, 176–181.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L.L., 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6524–6533.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L.L., 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3776–3786.



Discussion & Perspectives

XI. DISCUSSION GENERALE

Optimiser l'efficacité digestive de l'animal passe par une diminution de la production de méthane par les microorganismes du rumen. En effet, le méthane d'origine digestive constitue non seulement une perte en énergie pour l'animal mais contribue également à l'effet de serre. **Ce travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes microbiens impliqués dans la production de méthane chez les ruminants.**

L'originalité de notre travail était la conduite en parallèle d'essais *in vivo* et *ex vivo*. Ainsi, dans chacune de nos expérimentations nous avons couplé la mesure des émissions de méthane par les ruminants avec une description cognitive du microbiote ruminal et en particulier des *Archaea* méthanogènes. C'est l'intégration de l'ensemble des données ainsi recueillies qui nous a permis d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes microbiens de la méthanogenèse.

En terme de **production de méthane**, les stratégies de manipulation de la méthanogenèse que nous avons étudiées dans nos expérimentations animales sont : la **prise alimentaire** et la **défaunation** sur moutons adultes (Expérimentation 1), la **composition de la ration** sur animaux en croissance (agneaux et taurillons ; Expérimentations 2 et 3).

En terme d'**écosystème microbien**, nous avons concentré nos efforts sur la communauté des *Archaea* **méthanogènes**, uniques productrices de méthane. Bien que ce groupe fonctionnel ait reçu beaucoup d'attention ces dernières années, son écologie reste encore mal connue. Les points sur lesquels nous avons porté notre attention sont :

- la structure en termes de nombre et diversité de la population des *Archaea* méthanogènes
- l'activité métabolique des *Archaea* méthanogènes

Afin d'apporter une vue plus globale de la place des *Archaea* dans l'écosystème microbien du rumen, notamment leurs interactions avec les autres microorganismes présents, nous nous sommes également intéressés aux autres populations microbiennes, bactéries et protozoaires.

L'approche analytique utilisée dans le cadre de cette thèse pour l'étude du microbiote ruminal était celle de la biologie moléculaire ; un choix motivé par la difficulté de cultiver l'ensemble des microorganismes du rumen. Les amorces ciblant nos marqueurs moléculaires ont déjà été désignées et validées pour leur utilisation dans le milieu ruminal. Nous ne reviendrons pas ici sur les différents biais introduits par l'échantillonnage ou extractions non

représentatifs, ni par la spécificité des amorces. L'ensemble de ces points a été abordé dans la Section IX.4. Cette discussion sera centrée sur l'analyse critique de l'ensemble de nos résultats afin d'apporter des éléments de réponse sur les mécanismes microbiens impliqués dans la méthanogenèse ruminale.

XI.1. Rôle de la structure de la communauté méthanogène dans la méthanogenèse

XI.1.1. Changements dans la taille de la population méthanogène

Les *Archaea* méthanogènes ne constituent qu'une petite partie du microbiote ruminal. L'utilisation de sondes fluorescentes a montré que le signal du gène *rrs Archaeal* dans le rumen ne représente que 0.3 % à 3.6 % du signal microbien total (Lin *et al.*, 1997; Yanagita *et al.*, 2000). Les valeurs obtenues dans le cadre de notre travail expérimental sont proches ou en dessous de la limite inférieure (entre 0.1% et 0.7%). La divergence dans l'abondance relative des *Archaea* entre nos observations et celles de la littérature est probablement la conséquence des différences dans les cibles ainsi que dans les méthodes analytiques utilisées. Contrairement aux études précédentes et pour répondre aux objectifs de ce travail de thèse, nous avons systématiquement utilisé le gène *mcrA* pour la caractérisation des méthanogènes. Chez les *Archaea* 1 à 4 copies de l'opéron *rrn*¹ peuvent être présentes par génome (Acinas *et al.*, 2004), alors qu'une copie unique de *mcrA* serait présente dans les génomes actuellement séquencés et publiés sur le site du NCBI (recherche personnelle). Cependant, les amorces que nous avons choisies, ciblent également le gène *mrtA*² (Luton *et al.*, 2002) dont la séquence présente plus de 80% de similarité nucléotidique avec la séquence *mcrA* (Reeve *et al.*, 1997). Dans notre première étude (Expérimentation 1), le gène *mrtA* était occasionnellement présent chez les méthanogènes du rumen, soit 8% et 9% des clones provenant des banques construites avec les échantillons d'animaux faunés et défaunés, respectivement. En utilisant les mêmes amorces, Denman *et al.*, (2007) ont également trouvé que seulement 4% des clones séquencés, présentaient des similarités avec les séquences *mrtA* publiées dans les bases de données. Les auteurs en ont conclu que le gène *mrtA* est rarement présent chez les méthanogènes du rumen. Toutefois, il n'est pas suffisant de connaître le nombre de copies d'un gène dans le génome pour présenter des résultats de quantification corrects. La

¹ Opéron *rrn* : contient les gènes codant pour tous les 3 ARNr (16S, 23S et 5S)

² Gène *mrtA* : code pour une autre méthyle-réductase, présente uniquement chez certaines *Archaea*, en plus de *mcrA* (cf Section IX.3.)

polyploïdie serait caractéristique des génomes des *Euryarchaeota* (Hildenbrand *et al.*, 2011). Ainsi, un membre du genre *Methanosarcina* présenterait entre 3 et 18 copies du génome entier dans la phase exponentielle de croissance et entre 16 et 30 dans la phase stationnaire (Hildenbrand *et al.*, 2011). A notre connaissance de telles données ne sont pas encore disponibles pour des *Archaea* méthanogènes du milieu ruminal.

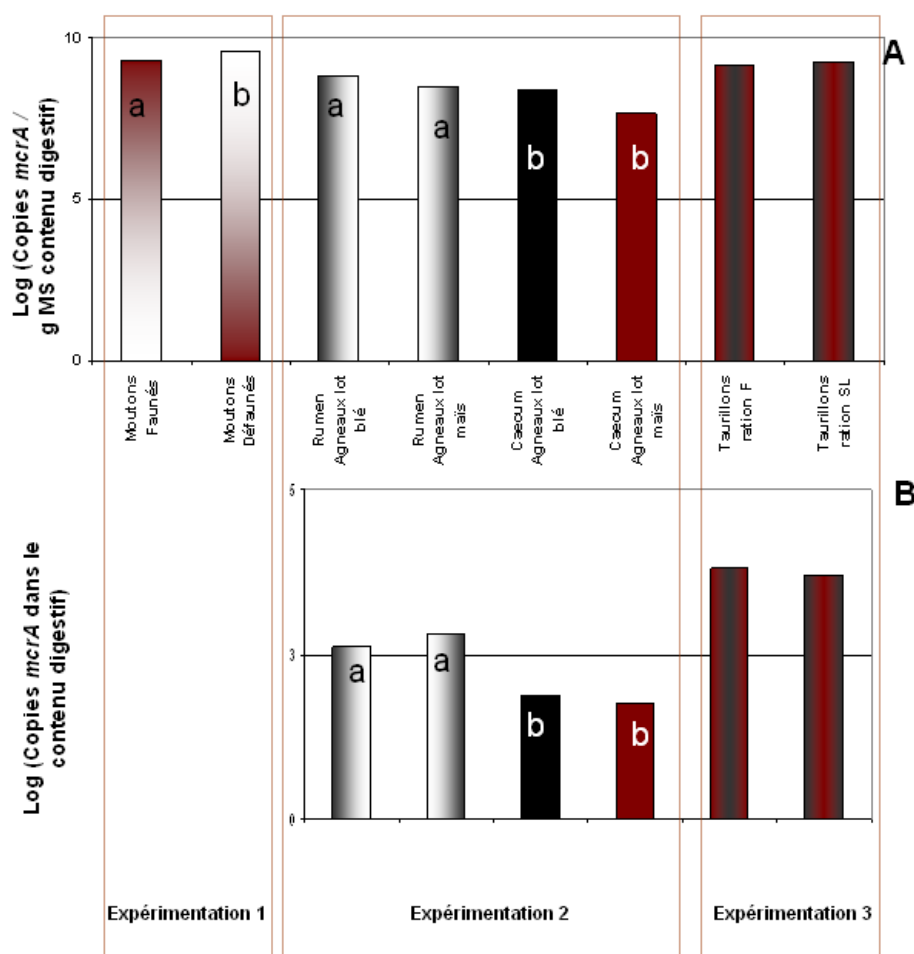


Figure 1 : Concentration (A) et nombre total (B) des copies du gène *mcrA* obtenus dans les trois expérimentations.

Expérimentation 1 : Moutons males adultes à l'entretien, race Texel, poids moyen 61.5 ± 1.3 kg, successivement faunés et défaunés; **Expérimentation 2 :** Agneaux males en croissance, race INRA 401, poids moyen 28.2 ± 1.69 kg, recevant des rations riches en concentré de nature différente (blé ou maïs); **Expérimentation 3 :** Taurillons males à l'engraissement, race Charolaise, poids moyen 711 ± 55.8 , recevant une ration à contenu élevé en aliment concentré riche en fibres (F) et une ration à contenu élevé en concentré riche en amidon et supplémentée avec de la graine de lin extrudée (SL). Les lettres différentes au sein d'une même expérimentation indiquent des différences significatives observées ($P < 0.01$). Dans l'expérimentation 1, nous n'avons pas estimé la biomasse méthanogène, car le contenu ruminal total des animaux n'a pas été mesuré.

Bien que la quantification en qPCR puisse fournir des données précises du nombre de gènes par unité de contenu digestif (concentration), il est plus difficile de convertir ces valeurs en termes de concentration cellulaire ou de biomasse microbienne. Une telle conversion exige de connaître du nombre de copies par génome et la taille du génome.

Systématiquement, nous avons choisis d'exprimer nos résultats de quantification en qPCR en tant que **concentration** sous la forme de « **log des copies par gramme de matière sèche de contenu ruminal** ». Ce mode d'expression nous a permis de minimiser les variations inter-animales dues par exemple à la dilution du contenu ruminal (différences dans la quantité d'eau bue entre animaux). Les termes **nombre total de copies *mcrA*** ou **biomasse méthanogène** (sous réserve des constats faits ci-dessus) sont utilisés pour désigner la « **concentration x contenu total digestif** » dans les essais où nous avons pu mesurer ce dernier paramètre (Expérimentations 2 et 3)

La concentration des copies du gène *mcrA* du contenu ruminal de tous nos animaux (moutons adultes, agneaux, taurillons) étaient similaires ($9.09 \pm 0.39 \log_{10}(\text{copies } mcrA/\text{g MS})$, Figure 26) et comparables aux données publiées chez des taurillons (1.34×10^9 cellules/ml ou $\log_{10} = 9.17$) (Denman *et al.*, 2007) ou des moutons ($9.90 \log_{10}(\text{copies } mcrA/\text{g MS de contenu ruminal})$) (Mosoni *et al.*, in press). Il n'est donc pas étonnant que dans le rumen des bovins, globalement 10 fois plus important que celui des ovins, le nombre total de séquences retrouvées soit largement supérieur (plus d'1 Log). Intuitivement, la plus forte production de méthane par les bovins peut donc être reliée à leur communauté méthanogène plus nombreuse en terme de biomasse. La même observation a été faite en comparant le nombre total de copies *mcrA* (biomasse méthanogène) entre les deux fermenteurs digestifs : rumen et cæcum (Expérimentation 2). En effet, le nombre des copies *mcrA* dans le cæcum était ~22 fois inférieur à celui dans le rumen des agneaux ; ceci s'explique par un poids total sec et une concentration en *mcrA* respectivement 8 et 3 fois moins importants dans le cæcum que dans le rumen. **Nos résultats suggèrent que la biomasse méthanogène est corrélée à la taille du compartiment digestif.**

En revanche, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre la **production de méthane** et **la concentration ou la biomasse des *Archaea*** au sein du rumen pour une même espèce animale et une même expérimentation. Le Tableau 10 regroupe quelques uns de nos principaux résultats de quantification des méthanogènes dans les trois expérimentations ; la production de méthane y variait soit avec la défaunation soit avec l'alimentation.

Facteur de variation utilisé	Variations observées dans la production de méthane	Communauté méthanogène		
		<i>mcrA</i> (copies / g MS)	Empreintes DGGE <i>mcrA</i>	Indices de diversité
<u>Cinétique nycthémérale</u> (expérimentation N°1)	Valeur min = 0,78 L / h (avant le repas) Valeur max = 3,43 L / h (1h après le repas)	=	Similaires	=
<u>Modification du microbiote</u> (expérimentation N°1) Défaunation	CH ₄ L / 14h : ⬇ 10,7 % (en absence de protozoaires)	⬆ 2,98 %	Similaires	=
<u>Nature de l'aliment concentré</u> (expérimentation N°2) Ration blé vs ration maïs	CH ₄ g / jour : ⬇ 56% CH ₄ g / kg MSI : ⬇ 26,7% (avec la ration maïs)	⬇ 54%	Séparation partielle des échantillons en fonction de la ration	=
<u>Site digestif</u> (expérimentation N°2) Rumen vs Cæcum	Potentiel méthanogène <i>in vitro</i> µmol CH ₄ produits ⬇ 212% µmol CH ₄ / µmol gaz totaux : ⬇ 130% (dans le cæcum)	⬇ 16 %	Deux clusters séparant les échantillons en fonction du site digestif	=
<u>Nature de l'aliment concentré</u> (expérimentation N°3) Concentré fibreux (F) vs concentré riche en amidon + graine de lin (SL)	CH ₄ g / jour : ⬇ 31,45% CH ₄ g / kg MSI : ⬆ 20% (P> 0,05) (avec la ration SL)	=	Deux clusters séparant les échantillons en fonction de la ration	Nombre de bandes plus élevées avec la ration SL Indice de diversité de Shannon plus élevé avec la ration SL

Tableau 1 : Récapitulatif des résultats des trois expérimentations reliant les variations de la production de méthane à la structure de la communauté méthanogène.

Le premier facteur de variation de la production de méthane auquel nous nous sommes intéressés était la prise alimentaire. Après le repas, une quantité plus importante d'aliments facilement dégradables augmente le taux des fermentations ruminales et par voie de conséquence augmente la méthanogenèse (Expérimentation 1). Une augmentation du nombre des méthanogènes, suite à un taux de croissance plus élevé quand les substrats sont abondants, pourrait être une explication plausible à l'augmentation de la méthanogenèse après repas. Cependant, aucun changement significatif postprandial n'a été observé dans la concentration des copies *mcrA* (Tableau 8 et Expérimentation 1). Ceci semble logique, sachant que le temps de doublement des méthanogènes est au minimum d'une heure pour les méthanogènes ne possédant pas de cytochromes³ et d'environ dix heures pour ceux qui en possèdent (essentiellement l'ordre des *Methanosarcinales*) (Thauer *et al.*, 2008).

Dans le cas de la défaunation, la concentration des copies *mcrA* a même augmenté après l'élimination des protozoaires alors que les animaux défaunés produisaient significativement moins de méthane. Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres études. Le nombre des copies *mcrA* avait augmenté d'un log après la défaunation de moutons (Mosoni *et al.*, in press), alors que la production de méthane (L/j) avait diminué de 20% (Morgavi *et al.*, 2008). D'autres auteurs ont constaté qu'en absence de protozoaires le nombre de méthanogènes double, sans pourtant avoir d'effet sur la méthanogenèse (Machmüller *et al.*, 2003).

Dans l'expérimentation 3, la ration (concentré riche en fibre vs. concentré riche en amidon et supplémentée avec de la graine de lin) n'a pas eu d'effet sur la concentration ou le nombre total des copies *mcrA* dans le rumen des taurillons, alors que la production de méthane (g/j) avait diminué (Tableau 8). Bien qu'en règle générale les rations riches en amidon soient associées à des diminutions significatives de la production de méthane (Article Synthèse bibliographique), des changements dans la concentration ou la biomasse méthanogène n'ont pas été décrits dans la littérature (Wanapat *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Très peu de comparaisons directes entre céréales ont été réalisées pour voir l'influence de la nature de la céréale sur la production de méthane. De plus, à notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir regardé les effets de différentes céréales sur la communauté méthanogène *ex vivo* (Expérimentation 2). Dans ce cas, la méthanogenèse a diminué avec la vitesse de dégradation de l'amidon, et s'est accompagnée également d'une diminution de la concentration des *Archaea* dans le rumen (Tableau 8). Des résultats contradictoires entre

³ Les cytochromes sont des transporteurs d'électrons liés à la membrane qui jouent un rôle dans l'oxydation des groupes méthyles en dioxyde de carbone

nombre de méthanogènes et production de méthane ont également été observés dans d'autres environnements comme les tourbes (Freitag & Prosser, 2009) ou les sédiments marins (Colwell *et al.*, 2008).

En résumé, nos travaux montrent qu'il n'existe pas de lien étroit entre la quantité de méthane produit et le nombre (ou la concentration) des *Archaea* méthanogènes dans le rumen. Ces résultats suggèrent que les méthanogènes s'adaptent aux différentes conditions ruminales qui leur sont proposées. Ils seraient capables de se maintenir dans un état de latence lorsque les conditions environnementales ne sont pas optimales (favorables).

XI.1.2. Changements dans la composition de la population méthanogène

La plupart des *Archaea* identifiées dans le rumen appartiennent à des clades méthanogènes connus avec une prédominance de *Methanobrevibacter* spp. Toutefois, dans certaines études, la proportion des différents taxa a été inversée ou très différente (Janssen et Kirs, 2008 et références incluses). Il n'est pas clair si ces différences majeures observées dans la distribution des *Archaea* entre les études sont le reflet de différences méthodologiques et/ou biologiques (animaux et/ou régimes).

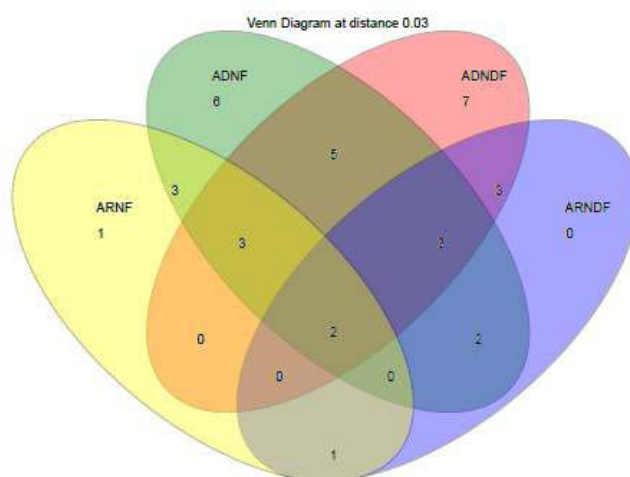


Figure 2 : Diagramme de Venn construit sous MOTHUR avec les séquences des 4 banques de clones ; la similarité des séquences au sein d'une même espèce est fixée à 97%.

Les 4 banques sont : ADNF, séquences ADN *mcrA* animaux faunés (n=24) ; ADNDF, séquences ADN *mcrA* animaux défaunés (n=23) ; ARNF, séquences ADNc *mcrA* animaux faunés (n=10) ; ARNDF, séquences ADNc *mcrA* animaux défaunés (n=11) ; les chiffres indiquent le nombre de OTUs⁴ partagés ou pas entre les banques de clones

⁴ OTU, Operationel Taxonomic Unit, regroupant ici toutes les séquences en acides aminés similaires à plus de 97%.

Dans notre première expérimentation, l'analyse des profils méthanogènes en PCR-DGGE des animaux faunés et défaunés n'a révélé aucun effet sur la diversité de la communauté en termes d'indices de biodiversité et de structure (cluster). Par contre, la composition des banques de clones construites avec des séquences *mcrA* provenant des animaux successivement faunés et défaunés ne se superposaient que partiellement (Figure 27). Dans les banques « ADN *mcrA* animaux faunés » et « ADN *mcrA* animaux défaunés », un tiers des séquences leurs étaient spécifiques (Figure 27). Ceci suggère la présence de méthanogènes spécifiques de l'état fauné ou défauné des animaux. Il est possible qu'il s'agisse d'espèces ou souches particulières que la résolution de la DGGE ne permet pas de mettre en évidence. Ceci peut également expliquer le fait que le nombre des séquences différentes retrouvées avec le clonage était deux fois plus important que le nombre des bandes observées sur les gels DGGE. L'analyse en PCR-DGGE ne nous a pas permis de mettre en évidence la diversité des séquences *mcrA* comme cela a été possible avec les banques de clones. Il n'est pas possible de discuter si nos conditions méthodologiques étaient ou non optimales (migration, résolution) étant donné l'absence de données dans la littérature sur la diversité des séquences *mcrA* du rumen en PCR-DGGE ou d'autres techniques d'empreinte moléculaire.

Pour l'ensemble de nos expérimentations, nous avons pu systématiquement relier les variations de la production de méthane à un changement dans la composition de la communauté méthanogène du rumen (Tableau 8). Dans le premier essai, l'abondance des clones apparentés à l'ordre *Methanobacteriales* a pratiquement doublé après la défaunation des animaux (35 % vs. 65% des clones chez les animaux faunes et défaunés, respectivement). Les *Methanomicrobiales* représentaient respectivement 25% et 10% des clones de la banque construite avec des échantillons de contenu ruminal des animaux faunés et défaunés. Des études précédentes ont montré que des phylotypes particuliers de méthanogènes s'associaient de façon préférentielle avec les protozoaires dans le rumen ovin (Machmüller *et al.*, 2003; Ohene-Adjei *et al.*, 2007; Regensbogenova *et al.*, 2004a; Sharp *et al.*, 1998). Cependant les résultats restent très imprécis et parfois contradictoires. Ainsi selon Machmüller *et al.*, (1999) les membres des ordres des *Methanobacteriales* et *Methanococcales* seraient préférentiellement attachés aux protozoaires. De leur côté, Ohene-Adjei *et al.*, 2007 ont suggéré que les méthanogènes symbiotiques des ciliés seraient apparentés à la famille *Methanobacteriaceae* (ordre *Methanobacteriales*) ou à des phyla pas encore isolés. Enfin selon Regensbogenova *et al.*, (2004), les méthanogènes préférentiellement associés aux

protozoaires appartiendraient au genre *Methanomicrobium*, alors que selon Sharp *et al.*, (1998) les représentants de ce genre seraient essentiellement libres dans le contenu ruminal. Les taxa mentionnés ci-dessus sont également ceux majoritairement présents dans le rumen bovin ou ovin « conventionnel ». Au vu de ces informations, il nous est impossible de conclure sur les changements dans la diversité provoqués par la défaunation et à l'origine de la réduction des émissions de méthane.

La composition, la richesse et la diversité de la communauté méthanogène varie avec la composition de la ration alimentaire (Article Synthèse bibliographique). Dans notre essai sur taurillons (expérimentation 3), nous avons relié la diminution de la production journalière de méthane (-27% de CH₄ g/jour) avec la ration riche en amidon et lipides avec une population méthanogène moins riche et moins diverse, caractérisée de plus par une moindre variabilité inter-animale.

Les résultats étaient moins évidents dans l'expérimentation 2 avec des agneaux à l'engraissement, où les dendrogrammes n'ont que partiellement séparé les échantillons du rumen provenant d'animaux recevant des rations différentes alors que la production de méthane (CH₄ g/jour) diminuait de 57 % avec la ration « maïs » par rapport à la ration « blé ». Jeyanathan *et al.*, (2011) ont comparé les effets de la ration sur les communautés méthanogènes des rumens bovins et ovins. Des changements dans la diversité des *Archaea* ont été observés chez les deux espèces animales en fonction de leur alimentation (pâturage ou ration ensilage). Cependant, les profils méthanogènes ovins présentaient moins de variabilité que les bovins, probablement à cause d'une population méthanogène moins riche dans le rumen ovin. Les auteurs ont également souligné que les mêmes phyla méthanogènes sont majoritairement retrouvés chez des bovins, ovins ou cervidés ; les différences entre les trois espèces animales étaient dues à des groupes méthanogènes minoritaires ou des sous-groupes dans les clades prédominants (Jeyanathan *et al.*, 2011). Zhou *et al.*, (2010) ont d'ailleurs souligné que chez des bovins à fort ou faible RFI⁵, recevant successivement des rations pauvres ou riches en énergie, les différences dans la communauté méthanogène se trouvaient essentiellement au niveau de l'espèce ou de la souche. Ces constats suggèrent que les *Archaea* dans le rumen sont probablement **plus diversifiées que ce que l'on croit actuellement**, et donc des techniques plus résolutes sont nécessaires pour une étude approfondie.

Des communautés d'*Archaea* méthanogènes spécifiques pour chacun des deux sites digestifs étudiés chez l'agneau, ont été mises en évidence dans l'expérimentation 2. Ces

⁵ RFI, residual feed intake, voir Section IV.1

résultats peuvent expliquer les différences de potentiel méthanogène observées *ex situ* entre les contenus ruminal et caecal. Les contraintes environnementales dans un compartiment digestif sont conditionnées par les substrats qui y arrivent (quantité, nature, forme de présentation...) et la composition du microbiote. Les substrats pris en charge par la flore microbienne du rumen sont plus divers en comparaison aux substrats arrivant au niveau du cæcum. Aussi, le choix des voies métaboliques par les microorganismes fermentaires du rumen est probablement plus grand que pour le microbiote caecal. Les conditions physico-chimiques (pH, potentiel d'oxydoréduction, paramètres fermentaires) sont également très différentes entre le rumen et le cæcum. Ces paramètres sélectionnent les espèces de microorganismes en fonction de leurs contraintes écologiques spécifiques. Ainsi, les microorganismes acéto-réducteurs sont présents dans le rumen en nombre comparable à celui des méthanogènes, mais les conditions ne sont pas thermodynamiquement favorables à leur métabolisme (Weimer, 1998). Par contre l'acétogenèse réductrice, voie métabolique d'hydrogénotrophie concurrentielle de la méthanogenèse, a été mise en évidence dans le cæcum des ruminants (Demeyer, 1991a; Váradyová *et al.*, 2000), et est également suggérée par les résultats de nos essais *in vitro* (Expérimentation 2).

En résumé, l'étude de la diversité de la communauté méthanogène du rumen nécessite de descendre en dessous du niveau « genre » de méthanogène. Les différents moyens testés dans ce travail pour réduire les émissions de méthane résultaient en la sélection d'espèces (ou souches) plus aptes à se maintenir dans les nouvelles conditions environnementales du rumen. Les différences d'affinité pour l'hydrogène ou d'efficacité méthanogène des différentes espèces (ou souches) seraient à l'origine des variations dans la production de méthane.

XI.2. *Activité métabolique des méthanogènes*

L'hypothèse de départ dans ce travail de thèse était que les variations observées dans la production de méthane par les ruminants, étaient dues à des variations dans l'activité méthanogène des *Archaea*. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons suivi l'expression de gène fonctionnel *mcrA* via son ARNm. Notre démarche était motivée principalement par deux points :

- la production de méthane est régulée par la disponibilité de l'hydrogène métabolique (Hungate, 1967; Janssen, 2010)

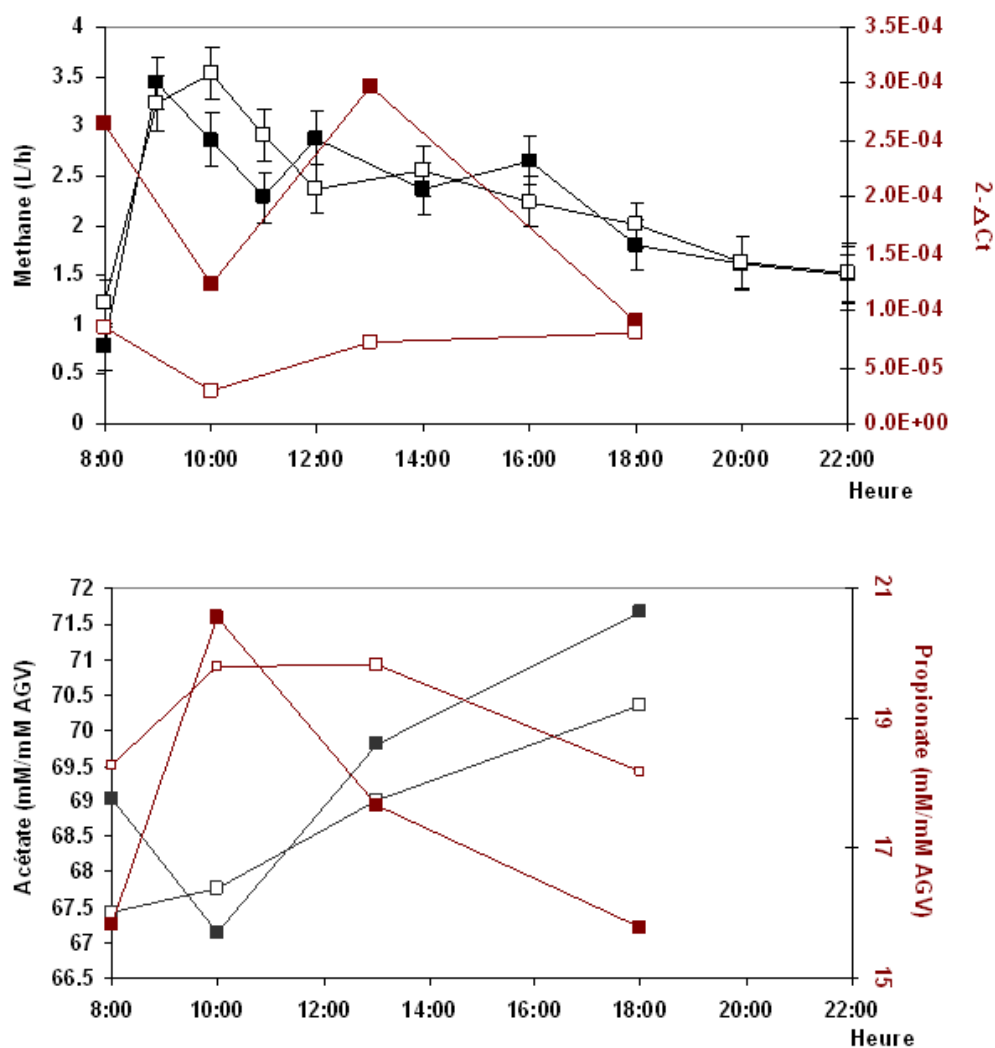


Figure 3 : Cinétiques fermentaire et microbienne dans le rumen de moutons alimentés avec un repas par jour.

Les repas sont distribués une fois par jour à 8h. Graphique du haut, cinétique de la production de méthane sur 14h (en noir) et l'activité métabolique des méthanogènes (en rouge). Graphique du bas, cinétique la production d'acétate (en noir) et propionate (en rouge). Caractères pleins, moutons faunés ; caractères vides, moutons défaunés.

Facteur de variation	Expression de <i>mcrA</i>	CH ₄ g jour	Puits à hydrogène Propionate ¹	Biomasse ²	Sources d'hydrogène Acétate ¹	Butyrate ¹
Faunés ➔ Défaunés (Expérimentation 1)	⬇ 2.47 fois	⬇ 10,7 %	⬆ 8.20 %	<i>Bacteria</i> : ⬆ <i>Archaea</i> : ⬆	NS	⬇ 16.96 %
Blé ➔ Maïs (Expérimentation 2)	NS	⬇ 56%	NS	<i>Protozoa</i> : ⬇ <i>Bacteria</i> : NS <i>Archaea</i> : NS	NS	NS
Rumen ➔ Cæcum (Expérimentation 2)	⬇ 3 fois	⬇ 212% ³	⬇ 25.19 % *	<i>Bacteria</i> : ⬇ <i>Archaea</i> : ⬇	⬆ 11.07%	⬆ 41.54 %
Fibres ➔ Amidon + Lin (Expérimentation 3)	⬇ 9.2 fois	⬇ 31.45%	NS	<i>Protozoa</i> : ⬆ <i>Bacteria</i> : ⬆ <i>Archaea</i> : NS	⬇ 5 %	NS

Tableau 2 : Activité métabolique des méthanogènes, et production et utilisation d'hydrogène dans les trois expérimentations.

¹ proportion relative dans les AGV totaux (mM / mM) ; ² pour *Bacteria* et *Archaea* : nombre de copies des gènes *rrs* ou *mcrA* respectivement dans le contenu digestif total sec, **sauf** pour la défaunation où il s'agit d'une concentration (copies g⁻¹ MS) ; pour *Protozoa* : nombre de cellules / ml de contenu ; ³ μmol CH₄ produits *in vitro*
NS, différences non significatives ; * 0.05 < P < 0.1

- la transcription du gène fonctionnel *mcrA* est également régulée par la disponibilité de l'hydrogène dans le milieu (Figure 17, Section IX.3.1) (Reeve *et al.*, 1997)

Pour suivre l'expression du gène, une approche « transcriptomique » a été mise au point dans le cadre de cette thèse. Nous nous sommes inspirés des études similaires, réalisées dans les tissus eucaryotes et décrites par Schmittgen et Livak (Livak & Schmittgen, 2001 ; Schmittgen & Livak, 2008). Les principales difficultés rencontrées étaient le choix des gènes calibreurs (le gène *rrs* bactérien dans ce travail de thèse) dont l'expression doit rester stable au cours du temps (au sein d'une même expérimentation) et des états de référence (exemple : sain *vs* malade) pour comparer l'expression du gène. Ces contraintes, nous ont empêchés d'utiliser dans nos différents essais la même méthode d'estimation des variations dans l'expression du gène *mcrA*.

La méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a été appliquée pour les comparaisons entre animaux faunés *vs*. défaunés (Expérimentation 1) et entre rumen *vs*. cæcum (Expérimentation 2) sachant qu'il s'agissait de comparaisons intra-animales. Les équations utilisées étaient :

$$\text{Expérimentation 1 : } 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{MCR A} - Ct_{RRS})_{DEFAUNES} - (Ct_{MCR A} - Ct_{RRS})_{FAUNES}]}$$

$$\text{Expérimentation 2 : } 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{MCR A} - Ct_{RRS})_{CÆCUM} - (Ct_{MCR A} - Ct_{RRS})_{RUMEN}]}$$

S'agissant d'animaux conduits en lots et donc différents dans l'étude sur l'effet de la nature de la céréale sur l'expression du gène *mcrA* dans le rumen, la méthode du $2^{-\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{MCR A} - Ct_{RRS})]}$ a été utilisée. Enfin la méthode du $2^{-Ct_{MCR A}}$ a été appliquée dans l'expérimentation 3, à cause d'une expression variable du gène *rrs*, nous empêchant de le prendre comme référence. Cette différence dans les méthodes analytiques d'expression du gène *mcrA* pourrait expliquer certaines des variations observées, notamment dans les valeurs absolues (Tableau 9).

Dans l'expérimentation 1, nous avons réalisé des mesures en cinétique de la production de méthane, mais également des paramètres fermentaires et microbiens (Figure 28). Le pic de la méthanogenèse était accompagné d'un pic de la proportion de propionate dans les AGV totaux, mais également d'une proportion plus faible d'acétate. Ces résultats rejoignent la théorie proposée par Janssen (2010) à savoir que l'arrivée de matière organique facilement dégradable dans le rumen s'accompagne d'un pic dans la production d'hydrogène ; les conséquences sont la stimulation des voies hydrogénotrophes (méthanogenèse et propionogenèse). Parallèlement, la production d'hydrogène diminue, probablement suite à

une voie de rétro-inhibition⁶ (Article de Synthèse bibliographique). La baisse que nous observons dans l'activité métabolique des méthanogènes au même moment peut s'expliquer par le détournement de leur substrat vers la production de propionate. En effet, bien que la méthanogenèse marque un pic, la part relative du méthane dans les produits finaux des fermentations après le repas reste faible (Janssen, 2010). D'un autre côté, il semble important de souligner qu'une partie de la biomasse microbienne quittera le rumen après la prise alimentaire, conséquence d'un transit accéléré (Leedle *et al.*, 1986). Ainsi la baisse observée dans l'activité peut être également expliquée par une concentration plus faible en cellules méthanogènes : une partie a quitté le rumen et la partie restante se trouve diluée par les aliments nouvellement arrivés.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes systématiquement intéressés à ces paramètres microbiens et fermentaires afin de collecter un maximum d'informations pouvant expliquer les variations observées dans la production de méthane. Le Tableau 9, regroupe quelques uns des principaux résultats de nos essais. **La diminution de l'activité métabolique des méthanogènes se traduisait systématiquement par une baisse dans les émissions de méthane**, l'exception était l'étude conduite sur agneaux alimentés avec des céréales de nature différente (blé vs. maïs). La diminution observée dans la production de méthane avec la ration « maïs » (Expérimentation 2) était en accord avec celle d'une étude sur bovins à l'engraissement recevant une ration à base de maïs ou d'orge (Beauchemin & McGinn, 2005). Cependant, nous n'avons pas pu relier la réduction de la méthanogenèse avec des changements dans l'expression du gène *mcrA*. Il est possible que ce soit un artefact *i)* du fait que le prélèvement de contenu ruminal a été réalisé à l'abattoir sur des agneaux à jeûne depuis 24h (nous ne savons pas quels sont les effets du jeûne sur l'écosystème microbien) ; *ii)* du faible nombre d'animaux dans chaque groupe (n=6), présentant des fortes variations individuelles ; et enfin *iii)* comme il s'agissait de lots d'animaux différents il nous était impossible d'utiliser la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ qui permet de minimiser les variations intra-animales.

Dans notre première étude, les émissions de méthane, ainsi que l'expression du gène *mcrA* ont diminué après l'élimination des protozoaires, suggérant une population méthanogène moins métaboliquement active. En effet, l'hydrogène est un des produits finaux principaux du métabolisme des ciliés ; on peut donc supposer que moins d'hydrogène est produit après la défaunation. De plus, après l'élimination des protozoaires nous avons vu se

⁶ Retro-inhibition ou inhibition « feedback » : le produit final de la voie métabolique inhibe une enzyme régulatrice de cette voie.

développer deux autres puits à hydrogène, notamment la production de propionate et la biomasse bactérienne et *Archaeale* (Tableau 9). Ainsi, la baisse observée dans les émissions de méthane et l'activité méthanogène chez les animaux défaunés peut être expliquée par un substrat (l'hydrogène) moins disponible i) parce que produit en plus petites quantités et ii) parce que dévié vers d'autres voies hydrogénotrophes.

Dans l'expérimentation 3, la production journalière de méthane (CH_4 g/j), ainsi que l'expression du gène *mcrA* ont diminué chez les taurillons recevant la ration riche en amidon et supplémentée avec de la graine de lin. Dans cet essai, alors que la proportion molaire du propionate était comparable entre régimes, nous avons observé une augmentation significative de la biomasse (puits à hydrogène) avec la ration riche en amidon et supplémentée avec de la graine de lin (Tableau 9). Si l'on suit le même raisonnement que précédemment, une population de protozoaires plus nombreuse (+60% avec la ration amidon + lipides) produirait plus d'hydrogène, ce qui se traduirait par un rendement en méthane plus important. En effet dans cet essai avec la ration riche en amidon et supplémentée avec de la graine de lin, bien que les émissions journalières (CH_4 g / j) aient diminué, le rendement en méthane (CH_4 g kg^{-1} MSI) a augmenté (bien que non significatif) de 20% (Tableau 8). Les taurillons recevant la ration riche en amidon et supplémentée avec de la graine de lin, avaient une ingestion (MSI) plus faible ; ainsi le rendement en méthane plus élevé s'expliquerait par un rendement en hydrogène (H g/kg MSI) plus important chez ce groupe d'animaux, suite à l'activité d'une faune plus nombreuse.

D'un autre côté, l'activité plus faible des méthanogènes du cæcum comparée aux méthanogènes du rumen (expérimentation 2) n'est pas due au détournement de l'hydrogène vers la production de propionate ou de biomasse (Tableau 9). Les proportions molaires plus élevées de l'acétate dans le second fermenteur du tube digestif des agneaux suggèrent une activité accrue des acéto-réducteurs.

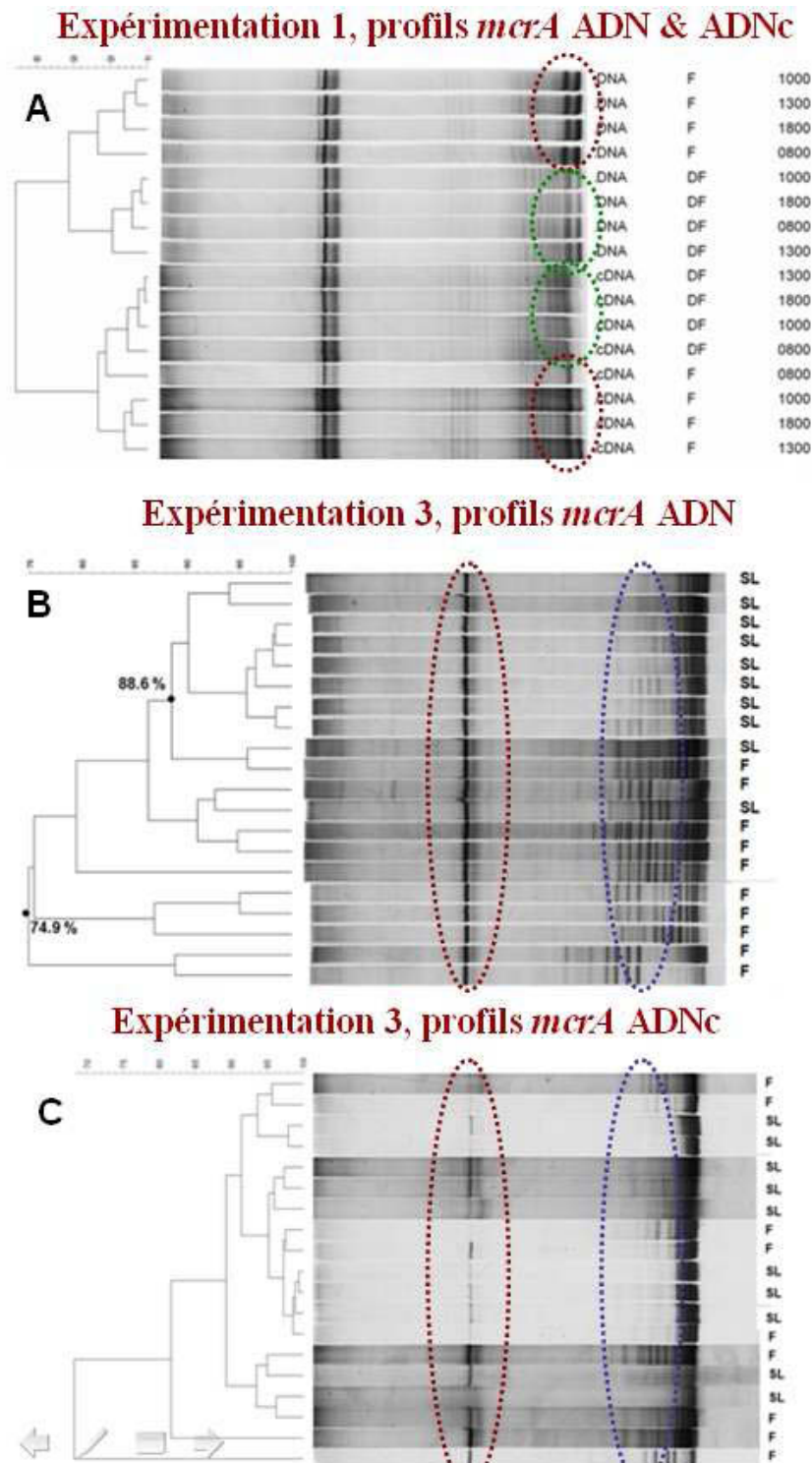


Figure 4 : Comparaison des profils *mcrA* obtenus avec des séquences ADN ou ADNc d'un même échantillon.

A Expérimentation 1 : F, animaux faunés ; DF, animaux défaunés ; 0800, 1000, 1300, 1800 indiquent l'heure du prélèvement de contenu ruminal. Les échantillons des 4 moutons successivement faunés et défaunés ont été poolés par heure de prélèvement

B et C Expérimentation 3 : SL : animaux ayant reçu une ration à base de concentré riche en amidon + graine de lin ; F : animaux ayant reçu une ration à base de concentré riche en fibres.

Les zones encadrées indiquent les principales différences observées.

Pour confirmer nos résultats de quantification de l'expression du gène *mcrA*, nous avons tenté de distinguer les méthanogènes présents dans le rumen de ceux qui sont métaboliquement actifs. Pour cela, nous avons réalisé des études d'empreinte moléculaire des séquences ADN et ADNc *mcrA* (Figure 29). Une des principales différences observées était l'intensité plus faible (encerclés rouges Figure 29 A, B, C) voir la disparition (encerclés verts Figure 29 A) des bandes ADNc *mcrA* par rapport à leurs équivalents ADN. Ceci suggère la présence de méthanogènes moins actifs voir inactifs lorsque la méthanogénèse est plus faible. Pareillement, les profils ADN *mcrA* de la troisième expérimentation (encerclés bleus Figure 29 B) étaient plus riches que leurs équivalents ADNc (encerclés bleus Figure 29 C). Les bandes très intenses à droite de l'encerclé bleu du gel du bas, suggèrent que l'essentiel de l'activité méthanogène est due à une petite partie des méthanogènes présents.

Dans **trois des quatre approches expérimentales** développées dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons constaté que la **diminution de la production de méthane entérique** était accompagnée d'une **baisse dans l'activité métabolique des *Archaea* méthanogènes**. Cependant, les **autres mécanismes microbiens et fermentaires** intervenant dans la production de méthane présentaient **plus de variations** d'une étude à l'autre. Ces constats viennent confirmer l'hypothèse que nous avons émise lors de la discussion des résultats sur la quantification et la diversité méthanogène à savoir que les ***Archaea* sont capables de survivre dans des conditions sous-optimales en adaptant leur métabolisme en fonction de la disponibilité du substrat.**

En résumé, la réduction des émissions de méthane par les ruminants observée dans nos conditions expérimentales est due à une baisse de l'activité métabolique des méthanogènes. D'une part, cette baisse d'activité pourrait s'expliquer par la sélection des méthanogènes capables de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales, mais qui auraient une moindre affinité pour l'hydrogène ou un taux méthanogène plus faible. D'un autre part, l'activité méthanogène dans le rumen est probablement régulée par la disponibilité du substrat limitant. Un rendement en hydrogène plus faible ou son utilisation par d'autres puits réduirait l'activité métabolique des méthanogènes.

XII. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'animal hôte et son écosystème microbien ont évolué ensemble pendant des millions d'années et la production de méthane est un mécanisme nécessaire au fonctionnement optimal du rumen. Nos travaux montrent qu'**il n'y a pas de relation claire entre le nombre (et/ou la concentration) des *Archaea* méthanogènes et la méthanogenèse dans le rumen**, et confirment des études récemment publiées. Dans ce contexte, la réduction des émissions de méthane ne peut être attribuée qu'aux **changements dans la flore microbienne du rumen et la disponibilité en hydrogène**. Ce travail de thèse a mis en évidence que les **modifications de la composition et/ou de l'activité métabolique de la communauté des *Archaea* méthanogènes seraient à l'origine des réductions des émissions de méthane par les ruminants**.

Toutefois, les facteurs microbiens et fermentaires intervenant dans les variations observées dans l'activité métabolique des méthanogènes diffèrent entre nos conditions expérimentales. Ceci suggère qu'il n'y pas **un**, mais **des** mécanismes microbiens permettant d'expliquer les variations dans la méthanogenèse et par voie de conséquence **différentes** stratégies pour réduire efficacement et à long terme les émissions de méthane par les ruminants. Enfin ce travail de thèse souligne également l'intérêt de développer des **approches globales** afin de mieux relier la production de **méthane** par l'**animal**, les **processus fermentaires** et le **microbiote**.

D'un point de vue méthodologique, l'approche de biologie moléculaire nous a permis d'avoir un regard global et rapide sur les principales communautés microbiennes ruminales. Toutefois, bien que nous ayons obtenus des résultats cohérents et satisfaisants lors de l'étude de l'expression du gène *mcrA*, nous n'avons pas pu établir une corrélation numérique avec la production de méthane. Un moyen pour remédier à cet inconvénient serait le développement de standards externes permettant de suivre l'efficacité de chaque étape (extraction, reverse-transcription, amplification etc....) dans chaque échantillon.

D'un autre côté le développement d'une approche protéomique permettra d'éviter le travail minutieux sur les ARN et pourra fournir des informations supplémentaires quant à la régulation de l'activité méthanogène des *Archaea*. En fait, l'abondance des protéines à

l'intérieur de la cellule n'est pas seulement régulée à un niveau transcriptionnel (ARNm), mais aussi aux niveaux traductionnels et post-traductionnels, de telle sorte qu'aucune relation simple ne peut être établie entre taux d'ARNm et de protéines. De plus, certaines protéines - à durée de vie longue - peuvent s'accumuler dans la cellule en demeurant fonctionnelles, alors que d'autres - à durée de vie brève - sont rapidement éliminées. Actuellement, la méthyle réductase, codée par le *mcrA* a été isolée d'un grand nombre de méthanogènes et sa structure tertiaire est bien connue. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'études sur sa régulation post-transcriptionnelle ni sur son taux de synthèse. De telles informations peuvent être obtenues par une méthode d'identification et de quantification protéique, basée sur l'électrophorèse 2D ou la spectrométrie de masse par exemple. Par la suite, une approche expérimentale, telle que celle utilisée dans cette thèse, pourrait être développée afin de suivre les variations dans l'expression de la méthyle réductase sous l'effet de différents facteurs influençant la production de méthane par les ruminants.

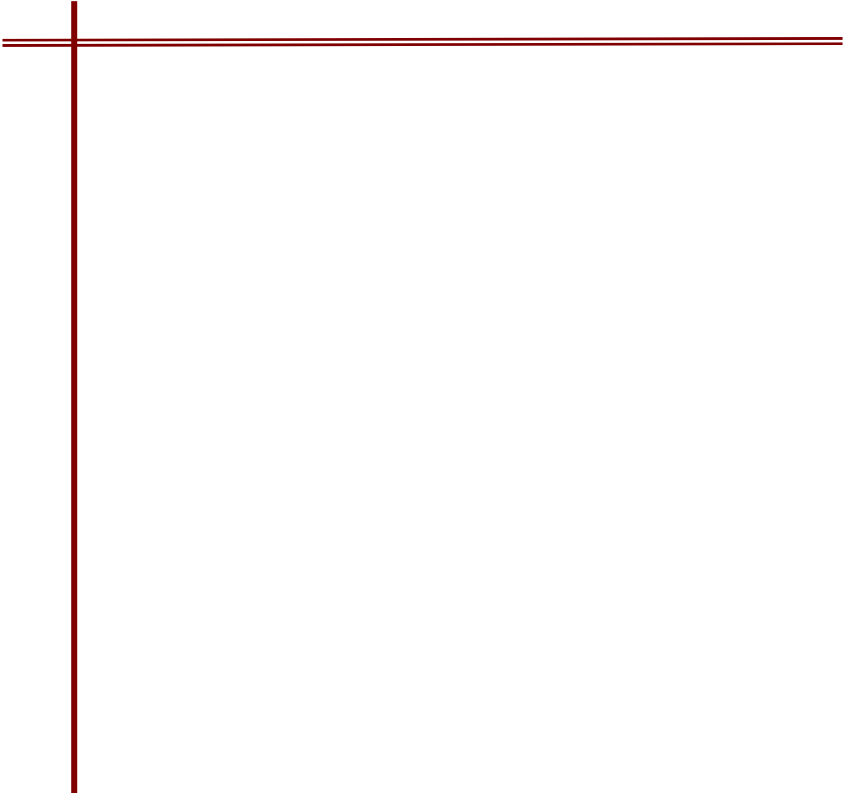
Les technologies des puces à ADN sont en train de devenir des outils importants dans l'analyse des communautés microbiennes complexes qui habitent des environnements variés. La majorité des applications des puces à ADN en écologie microbienne ont mis l'accent sur la détermination de la structure des communautés fondées sur des marqueurs phylogénétiques comme les gènes *rrs*. Cette approche permettra de fournir des images puissantes et détaillées de la structure des communautés microbiennes en générale, et méthanogène en particulier, dans l'écosystème complexe du rumen ; peu d'indications sur les fonctions microbiennes sont par contre obtenues. Ces dernières années, des efforts importants ont été fait dans le ciblage de gènes fonctionnels qui pourraient donner un aperçu au-delà de la pure caractérisation phylogénétique. La propriété semi-quantitative des puces à ARN permettra ainsi de mieux distinguer les membres les plus métaboliquement actifs de la communauté méthanogène du rumen. En pratique, ceci pourra se traduire par l'identification de nouvelles cibles pour l'élaboration d'inhibiteurs ou de vaccins anti-méthanogènes plus spécifiques.

La métagénomique peut apporter une meilleure compréhension de la structure et surtout de la fonction de l'écosystème microbien ruminal dans son ensemble. Cette approche permettra dans un premier temps de construire, le « schéma » génétique du microbiote ruminal. Une combinaison d'outils biologiques et informatiques devrait ensuite permettre d'identifier les étapes et les acteurs principaux situés au cœur du transfert d'hydrogène au

cours de la digestion. En pratique, il est envisageable d'identifier aux niveaux des animaux des « phénotypes microbiens faibles producteurs de méthane », ainsi que de vérifier leur hérédité. Cette approche devrait contribuer à l'élaboration de nouveaux outils, tels des gènes, des protéines ou des microbes marqueurs, pour suivre et soutenir la sélection d'animaux présentant un phénotype d'intérêt. Ces informations seront pertinentes à la fois pour améliorer les stratégies actuelles de réduction de méthane mais également pour envisager une optimisation du fonctionnement de l'écosystème microbien ruminal, de l'efficacité digestive et de la productivité des ruminants.

D'un point de vue finalisé, toute stratégie efficace, que ce soit chimique ou biotechnologique, doit fournir d'autres accepteurs d'électrons dans le rumen ou réduire la production d'hydrogène. Il est également envisageable d'inhiber spécifiquement les *Archaea* méthanogènes, mais dans ce cas de figure il est indispensable que l'hydrogène métabolique soit dévié vers des voies métaboliques énergétiquement profitables à l'animal hôte. Il est évident que la réduction des émissions de méthane passe par une modification physique et fonctionnelle de l'écosystème microbien. Cette manipulation des composantes microbiennes du système doit être prise en compte d'une manière globale

Il est possible de diminuer la méthanogenèse dans le rumen ; quelques stratégies sont déjà disponibles et beaucoup d'autres sont actuellement testées. Au cours des prochaines années, les progrès dans les nouvelles technologies «-omiques» permettront d'élargir notre compréhension des mécanismes impliqués dans la méthanogenèse et les autres voies métaboliques consommatrices, mais également productrices d'hydrogène. Cependant, toute nouvelle stratégie proposée pour réduire les émissions de méthane devra répondre à la triple exigence d'efficacité à long terme, de sécurité pour l'animal et le consommateur, et de coût.



ANNEXES

ANNEXE 1 :

VARIATIONS DANS LA PRODUCTION DE METHANE ENTERIQUE

La production de CH_4 n'a pas été mesurée chez tous les ruminants et dans toutes les situations, mais l'on peut l'estimer, notamment à partir du type de l'animal, de la quantité et de la composition de la ration (Vermorel, 1995). A titre indicatif, la production de CH_4 est l'ordre de 7 kg/an pour un mouton, 37 kg/an pour un bovin en croissance, 86 kg/an pour une vache allaitante et 117 kg/an pour une vache laitière (Vermorel *et al.*, 2008). Ces valeurs moyennes sont cependant sujettes à des variations liées à l'animal (espèce, âge, état physiologique), à l'alimentation (nature et conditionnement du fourrage, nature et pourcentage du concentré dans la ration, niveau d'alimentation), le temps de séjour des aliments dans le rumen, l'état de l'écosystème microbien et le taux de fermentation (Beauchemin *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2010b). Les différences observées dans la quantité de CH_4 produite sont difficilement explicables en ne tenant compte que d'un seul de ces facteurs de variation (Tableau 6).

Variations inter- et intra-animales

La quantité de CH_4 produite par un animal peut varier dans le temps, même s'il reçoit la même ration (en termes de composition, quantité et qualité). La variation journalière intra-animale dans la production nette de CH_4 (CH_4 g/j) pour des ovins et bovins a été estimée à approximativement 7% sans changer l'alimentation (Blaxter & Clapperton, 1965). Dans l'étude de Grainger *et al.*, (2007a) le coefficient de variation de la production journalière de CH_4 a été réduit de 19% à 6% quand les différences d'ingestion ont été prises en compte.

En plus des variations intra-animales, au cours des dernières années, plusieurs groupes de recherche ont mis en évidence des différences importantes dans la production de CH_4 entre des animaux au même stade physiologique et recevant la même alimentation (Blaxter & Clapperton, 1965 ; Johnson *et al.*, 1994 ; Lassey *et al.*, 1997). Les différences de niveau d'ingestion expliquent seulement une partie de la variabilité ; ainsi chez des moutons au pâturage consommant la même quantité de matière sèche Lassey *et al.* (1997) ont noté que les émissions variaient de 14.6 à 23.8 de CH_4 g/j entre les animaux. D'autres études, sur bovins au même niveau d'ingestion ont montré que les animaux produisant moins de CH_4 sont ceux pour lesquels le temps de séjour des particules dans le rumen est le plus faible (Pinares-Patiño

et al., 2003 ; Pinares-Patiño *et al.*, 2007). De même, Goopy et Hegarty (2004) ont identifié des émetteurs de CH₄ « forts » et « faibles » dans un troupeau de taurillons ayant une alimentation et un niveau d'ingestion identiques entre eux. Plus récemment, une corrélation génétique positive entre la production de CH₄ par des bovins viande et l'efficacité globale de l'utilisation de l'énergie par les animaux caractérisée par l'ingestion résiduelle (RFI pour residual feed intake⁷) a été rapportée (Hegarty *et al.*, 2007). Les animaux à faible RFI produisent ~20 % moins de CH₄ que leurs congénères moins efficaces (Hegarty *et al.*, 2007). Cependant, il y a très peu de données publiées sur la production de CH₄ par des animaux à RFI divergents ; pour le moment il n'y a pas de relation clairement établie entre l'efficacité (RFI) et le rendement en CH₄ (g/kg MSI⁸) de ces animaux. Si les animaux efficaces ont une meilleure digestion ruminale, le rendement en CH₄ devrait logiquement augmenter. **L'origine de cette variabilité individuelle dans l'utilisation de la ration est mal connue, mais elle est probablement liée à des différences de profil microbien ruminal entre animaux portant à la fois sur la composition de la biocénose et son activité métabolique.** Si cette variabilité individuelle est une caractéristique génétique propre à l'animal et qu'elle persiste dans le temps, il est alors envisageable de proposer une sélection d'animaux basée sur le critère génétique d'une moindre production nette de CH₄ (g/j ou L/j) (Jouany & Thivend, 2008). Toutefois, la priorité aujourd'hui est de sélectionner des animaux hautement productifs, ce qui aboutira à un abaissement des émissions par unité de produit (Waghorn & Hegarty, 2010), bien que les émissions totales en valeurs absolues augmenteront.

Variations liées à l'alimentation

a. Niveau d'ingestion

Blaxter et Clapperton (1965) ont montré que la production journalière nette de CH₄ augmentait avec le niveau d'ingestion (Figure 30).

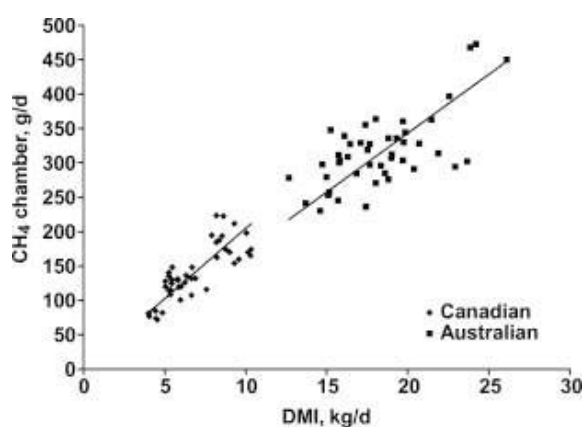


Figure 5 : Relation entre la production de CH₄, mesurée dans des chambres respiratoires, et le niveau d'ingestion

Les données proviennent de deux études en Canada et Australie (Grainger *et al.*, 2007a)

⁷ Les animaux les plus efficaces ont un faible RFI, alors que leur congères moins efficaces ont un fort RFI

⁸ MSI : matière sèche ingérée

Stratégie	Mécanisme	Limites
Composition de la ration	➢ diminution du temps de rétention ➢ augmentation de la proportion molaire de propionate ➢ diminution du pH ruminal ➢ changement dans la composition de la biocénose ruminale	✗ peut déplacer la méthanogenèse vers le reste du tube digestif (cæcum-colon) ✗ risques d'acidose ruminale
Lipides	➢ inhibition directe des méthanogènes / protozoaires ➢ augmentation de la proportion molaire de propionate ➢ biohydrogénation	✗ effets négatifs sur l'ingestion, les performances animales ✗ effets variables en fonction du régime et de l'espèce animale ✗ besoin d'études à long terme
✓ Défaunation ✓ Additifs chimiques ✓ Additifs organiques	➢ diminution de la disponibilité du substrat hydrogène pour la méthanogenèse ➢ effets directs sur les méthanogènes	✗ possible adaptation de l'écosystème microbien ✗ importance du régime alimentaire ✗ difficulté en pratique à défauner et de maintenir les animaux à l'état défauné.
✓ Vaccins contre les méthanogènes	➢ réponse immunitaire de l'animal contre les méthanogènes	✗ Difficulté à définir les cibles du vaccin
✓ Monensine	➢ inhibition des protozoaires et des bactéries à Gram positif ➢ limitation de la disponibilité du substrat hydrogène pour les méthanogènes	✗ Possible adaptation de l'écosystème microbien ✗ Efficacité variable en fonction du régime et de l'animal ✗ Utilisation interdite dans l'UE
Substances végétales	✓ activité antimicrobienne ✓ diminution de la disponibilité de l'hydrogène	✗ Dosage optimal encore à déterminer ✗ Pas assez d'études <i>in vivo</i> ✗ Pas assez d'études sur le long terme ✗ Effets sur la digestion peu étudiés
Acides organiques	✓ puits à hydrogène ✓ augmentation du ratio propionate / acétate	✗ Effet variable en fonction du régime ✗ Pas assez d'études <i>in vivo</i> ✗ Pas assez d'études sur le long terme ✗ Effets sur la digestion peu étudiés

Tableau 3 : Stratégies actuellement étudiées pour réduire les émissions de CH₄ par les ruminants, leur mécanismes et limite

Tandis que la quantité absolue de CH_4 s'accroît avec le niveau d'ingestion, maximiser la prise alimentaire au-dessus de l'énergie nécessaire pour l'entretien accroît les émissions quotidiennes de CH_4 , mais améliore l'efficacité de la conversion car on assiste à une diminution des émissions de CH_4 en pourcentage de l'énergie brute ingérée (EBI) (Figure 31). Cette réduction dans la production de CH_4 varie de 0.77% à 1.6% pour chaque unité de prise alimentaire au-dessus des besoins d'entretien (Beauchemin *et al.*, 2006; Johnson & Johnson, 1995)

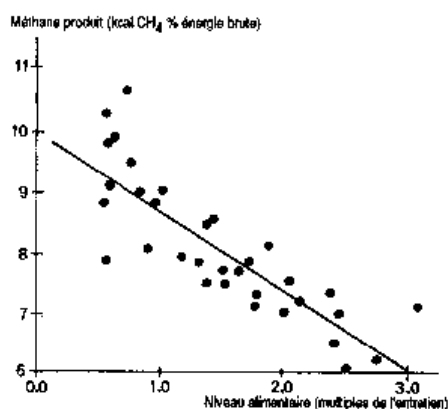


Figure 6 : Influence des variations du niveau alimentaire sur la perte d'énergie sous forme de CH_4

(Sauvant, 1992)

b. Les concentrés

Les équations stœchiométriques, présentées dans la Section III.5 ont clairement montré que l'addition d'aliments concentrés dans la ration oriente les conditions ruminales vers une fermentation amylolytique au détriment de la fermentation cellulolytique. Ce phénomène entraîne une diminution de la digestibilité des parois et des pertes d'énergie sous forme de CH_4 (Tableau 10). Ainsi, les émissions de CH_4 par des taurillons, rapportées à l'EBI, étaient réduites de 60% entre une ration à 21% d'aliment concentré et une ration à 70% (Martin *et al.*, 2010b). Les pertes énergétiques sous forme de CH_4 (exprimées en % de l'énergie brute ou digestible) diminuent de façon curvilinéaire avec la quantité de concentré dans la ration (Sauvant & Giger-Reverdin, 2009). Selon leur régression, la méthanogenèse passe par un maximum de 7,4% de l'EBI perdue sous forme de CH_4 lorsque la part du concentré dans la ration est de 35%. Au-delà, il y a une inhibition progressive des émissions (Sauvant & Giger-Reverdin, 2009).

c. Les fourrages

Une herbe pâturée au stade début épiaison entraîne une émission de CH_4 plus faible de 10% que la même herbe pâturée à un stade avancé, et donc plus riche en parois et moins digestible (Pinares-Patiño *et al.*, 2003). Les variations de digestibilité n'expliquent pas toutes les différences entre fourrages. L'introduction des légumineuses a permis une diminution de 10% de la production de CH_4 par kg de poids vif sur des bovins viande pâturant une prairie composée de 70% de luzerne et 30% de graminées

ou de 100% de graminées (McCaughey *et al.*, 1999). Cet effet pourrait s'expliquer par un niveau d'ingestion plus élevé et un temps de séjour dans le rumen plus faible avec la luzerne (Tableau 6) (Beauchemin *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2010b).

d. Les acides gras

Les travaux de Blaxter et Czerkawski (1966) et de Czerkawski *et al.*, (1966) ont montré que l'ajout d'acides gras à chaîne longue saturés ou insaturés diminue la production de CH₄ dans le rumen, augmente la perte d'énergie dans les fèces, mais augmente l'énergie nette disponible pour l'animal. En effet, les lipides peuvent remplacer partiellement les céréales pour accroître le niveau énergétique de la ration et présentent l'avantage de ne pas modifier le pH ruminal s'ils sont distribués à un faible niveau ou sous forme de sels d'acides (revue de Jouany & Thivend (2008)). Les effets de l'ajout de lipides dans la ration des ruminants sur la méthanogenèse ont été évalués dans les méta-analyses de Giger-Reverdin *et al.*, (2003) et Eugène *et al.*, (2008). Les auteurs ont estimé que quel que soit la nature des lipides, chaque pourcentage ajouté dans la ration de vaches diminuerait la production journalière de CH₄ de 2,2 % en moyenne. En revanche, selon Martin *et al.*, (2010b) la réduction de CH₄ g/kg MSI serait de 3,8% par pourcentage de lipides ajoutés ; les auteurs ont surtout souligné l'importance de la nature de l'acide gras et le niveau de supplémentation. L'ajout d'acides gras à chaîne moyenne, contenus dans l'huile de noix de coco réduirait la méthanogenèse de 7,3% par pourcentage de lipides ajoutés contre les 4,8% observés avec l'ajout de l'huile de lin contenant des LCFA (Martin *et al.*, 2010b). De plus, les essais *in vivo* ont montré que les effets des lipides sur la méthanogenèse sont proportionnels au niveau de supplémentation. Martin *et al.*, (2009) ont observé une diminution linéaire de la production de CH₄ avec un apport croissant de lipides de la graine de lin extrudée (0, 2, 4 et 6%) que ce soit avec le régime à base de foin (-15, -19, -40%, respectivement) ou d'ensilage maïs (-6, -13, -42%, respectivement) (Figure 32). Les auteurs n'ont pas pu expliquer ces variations de la méthanogenèse par des variations de digestibilité des rations dans le rumen, ni par une modification des performances zootechniques (ingestion, production laitière).

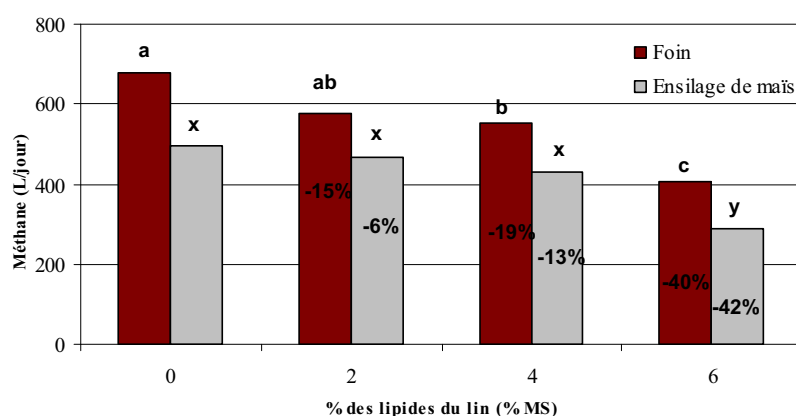


Figure 7 : Effet d'une supplémentation en lin sur la méthanogenèse chez la vache laitière alimentée avec un régime à base de foin (barres rouges) ou d'ensilage maïs (barres grises). a, b, c (régime à base de foin), x, y (régime à base d'ensilage maïs): différences significatives entre traitements ($P < 0,05$) (Martin *et al.*, 2009)

Parallèlement, l'effet dépressif des lipides du lin sur la production quotidienne de CH₄ des vaches laitières dépendrait de la forme de présentation du lin; la méthanogenèse a été d'autant plus réduite que la disponibilité des lipides dans le rumen était importante (huile > graine extrudée > graine crue) (Martin *et al.*, 2008b).

La composition et la quantité des aliments ingérés affectent spécifiquement la nature et l'abondance des substrats disponibles pour les microorganismes fermentaires, les temps de rétention des particules alimentaires, le pH du milieu ruminal (Tableau 6). Ces changements physico-chimiques des conditions ruminales se traduisent par des variations dans la méthanogenèse qui passent inévitablement par un changement dans l'activité ou la structure (nombre et diversité) de l'écosystème microbien.

La défaunation

Les protozoaires produisent des quantités importantes d'hydrogène et de formate et il n'est donc pas étonnant que les *Archaea* méthanogènes aient été retrouvées attachées à la surface (ectosymbiose) ou à l'intérieur des protozoaires (endosymbiose) (Stumm *et al.*, 1982; Vogels *et al.*, 1980). Le CH₄ produit par les méthanogènes associés aux protozoaires a été estimé à entre 9% et 37% de la production totale (Hegarty, 1999 ; Newbold *et al.*, 1995). Une analyse quantitative de la littérature a montré qu'il existe une corrélation positive entre la quantité de CH₄ produit et le nombre des protozoaires dans le rumen (Morgavi *et al.*, 2010). Les protozoaires jouent un rôle important dans la dégradation des aliments, mais ils ne sont pas indispensables à la survie de l'animal hôte (Tableau 11) (Williams & Coleman, 1997).

Avantages	Inconvénients
Stabilité des fermentations ruminales et pH	Prédateurs bactériens
Augmentation de la concentration en AGV	Diminution de la synthèse des protéines microbiennes
Meilleure digestibilité de l'amidon	Baisse du flux d'azote vers l'intestin grêle
Baisse de la concentration de lactate	Augmentation de l'excrétion urinaire en NH ₃
Sensibilité diminuée à l'acidose	Stimulation de la méthanogenèse

Tableau 4 : Avantages et inconvénients de la présence des protozoaires sur les fonctions du rumen et les performances animales

(Williams et Coleman (1997) et Eugène *et al.*, (2004))

Chez des agneaux dépourvus de protozoaires, la production de CH₄ était plus basse de 26% que celle des animaux « conventionnels » (McAllister & Newbold, 2008). Les résultats de Morgavi *et al.*, (2008) sont du même ordre de grandeur avec une réduction de 20 % dans la production journalière de CH₄ après l'élimination des protozoaires. De plus, dans cette dernière étude, la persistance de l'effet dans

le temps (2 ans) a été soulignée. L'analyse quantitative des études *in vivo* portant sur les effets de la défaunation sur la méthanogenèse a estimé à 10 % les réductions moyennes observées (Morgavi *et al.*, 2010). Pourtant, l'élimination des protozoaires n'a pas été systématiquement accompagnée par une baisse de la méthanogenèse (Bird *et al.*, 2008). Dans cette dernière étude, les animaux recevaient une ration fourragère, alors que dans les études de Morgavi *et al.*, (2008) et McAllister et Newbold (2008), la ration était composée de fourrages et d'aliments concentrés. La défaunation peut réduire les émissions de CH₄ et les effets les plus importants sont observés avec des régimes riches en amidon (Hegarty, 1999).

Dans leur méta-analyse de la bibliographie, Eugène *et al.*, (2004) concluent que la défaunation augmente les proportions molaires de propionate et diminue celles du butyrate et de l'acétate, ce qui stoechiométriquement (cf. Section III.5) se traduit par une baisse dans la disponibilité du substrat hydrogène et par conséquent par une baisse dans la production de CH₄. La réduction des émissions de CH₄ chez les animaux défaunés peut être également la conséquence de la diminution de la digestion ruminale de la matière sèche (Eugène *et al.*, 2004) ou de l'augmentation de la pression partielle d'oxygène dans le rumen (Hegarty, 1999). **Il semble évident que l'élimination des protozoaires entraînera une modification de la composition et/ou de l'activité de la flore microbienne du rumen, conséquence de i) la symbiose qui existe entre protozoaires et méthanogène ; ii) leur activité prédatrice à l'égard des bactéries ; iii) le rôle qu'ils jouent dans la dégradation des aliments (Tableau 6)**

Malgré les résultats prometteurs, la défaunation reste un procédé expérimental et ne peut pas être appliquée en pratique dans les élevages pour réduire les émissions de CH₄ par les ruminants ; de plus il est indispensable d'isoler les animaux défaunés de leurs congénères faunés pour éviter la réintroduction de protozoaires dans le rumen.

Autres facteurs de variation

La présence d'accepteurs alternatifs d'électrons réduirait la quantité d'hydrogène disponible pour les méthanogènes, nécessaire à la production de CH₄. Les composés étudiés actuellement sont les nitrates, les sulfates et les acides carboxyliques, ainsi que des espèces microbiennes comme les acétogènes.

Il est possible d'administrer des **nitrates** ou **sulfates** au bétail, accompagnés de microorganismes nitrato-réducteurs ou sulfato-réducteurs qui vont utiliser l'hydrogène pour réduire leurs substrats respectifs (McAllister *et al.*, 1996). Les études *in vitro* ont résulté en une suppression importante de la méthanogenèse. Cependant, il est possible que ces méthodes se révèlent toxiques pour l'animal,

notamment via la conversion de l'hémoglobine en méthémoglobine⁹ par les nitrites ce qui limite le transport de l'oxygène dans le sang (Sar *et al.*, 2004). Les auteurs ont montré que l'apport de β 1-4 galacto-oligosaccharides ou de nisin diminue la concentration des nitrites dans le rumen. *Toutefois, les risques toxiques et la baisse d'ingestion observée avec l'administration de ces composés limitent leur utilisation en pratique* (McAllister *et al.*, 1996; Weimer, 1998).

Il existe au moins 15 **acides organiques** ou dicarboxyliques potentiellement utilisables en tant qu'accepteurs alternatifs d'électrons (Newbold *et al.*, 2005). Ces acides peuvent être considérés comme des « additifs » naturels, car présents dans le rumen en tant qu'intermédiaires métaboliques majeurs du cycle de l'acide citrique. Ils sont utilisés comme des accepteurs d'électrons dans la voie métabolique du succinate-propionate et jouent ainsi un rôle majeur dans la production d'ATP dans quelques cellules microbiennes du rumen (Jouany & Morgavi, 2007).

Parmi ces acides organiques, les plus prometteurs selon les études *in vitro* sont le fumarate et l'acrylate, mais l'utilisation *in vivo* donne des réductions négligeables quand les animaux les reçoivent en petites quantités (1 à 3 % de la MSI) (McAllister & Newbold, 2008). Aussi, Newbold *et al.*, (2005) ont calculé que pour arriver à réduire de 10% les émissions de CH₄ d'une vache, elle devrait ingérer pas moins de 2,9 kg de sodium-fumarate. Selon la revue de McAllister et Newbold (2008) la réduction peut atteindre 40% à 75% quand le fumarate ajouté dans la ration représente 10% de la MSI. Cette hypothèse a été testée *in vivo* chez des moutons, recevant une ration de pellets de luzerne déshydratée supplémentée avec 10% (sur la base de la MS) de fumarate (Molano *et al.*, 2008). La production de CH₄ (g/j) a réellement significativement baissé, mais cet effet a surtout été attribué à un niveau d'ingestion réduit, comme aucune différence dans la production de CH₄ g/kg MSI n'a été constatée (Molano *et al.*, 2008). *Un tel supplément n'est pas rentable dans des systèmes actuels de production de ruminants, mais considérant que le CH₄ est un GES majeur impliqué dans le changement climatique, les stratégies de réduction de cette sorte méritent plus de recherches.*

Une autre stratégie pour réduire les émissions de CH₄ par les ruminants envisage de remplacer partiellement les méthanogènes par des **bactéries acétogènes** qui utilisent les mêmes substrats (CO₂ et H₂), mais dans la production d'acétate (Martin *et al.*, 2010b; McAllister *et al.*, 1996). Au moins une dizaine de souches de bactéries acétogènes ruminales ont été isolées (Joblin, 1999), elles sont donc naturellement présentes dans le rumen. Dans des conditions normales, les acétogènes ne sont pas capables de concurrencer les méthanogènes pour l'utilisation de l'hydrogène (Fonty *et al.*, 2007). Une

⁹ La méthémoglobine contient un ion ferrique (Fe³⁺) à la différence de l'hémoglobine qui renferme un ion ferreux (Fe²⁺) ; l'ion ferrique forme une liaison irréversible avec l'O₂, qui ne peut de fait être distribué aux tissus

des possibilités actuellement étudiées est l'inhibition de la méthanogenèse pour permettre la prolifération des acétogènes (Nollet *et al.*, 1997). *L'efficacité in vivo de cette méthode reste à démontrer.*

Certains composés peuvent spécifiquement inhiber la méthanogenèse, parce qu'ils sont des **analogues de structure** du CH₄. Ces analogues sont toxiques pour les méthanogènes, et leur administration résulte en une augmentation de la concentration en hydrogène dans le rumen, (revue de Janssen (2010)). L'hydrogène non utilisé dans la méthanogenèse doit être dévié vers d'autres voies métaboliques (acétogenèse ou production de propionate) ou éliminé par éructation ou par respiration. L'inclusion de *bromochlorométhane (BCM)* dans la ration de taurillons a diminué significativement la production de CH₄ de 29%, mais également le ratio molaire acétate : propionate, suggérant une réorientation des fermentations ruminales vers la production de propionate (Denman *et al.*, 2007). Un autre analogue du CH₄ susceptible d'être utilisé pour réduire les émissions est le *chloroforme*. Le chloroforme peut être administré en petites quantités (1.4 mL / jour) et réduire la production de CH₄ de manière significative (> 100 g CH₄/jour) dès le deuxième jour de traitement (Chaves *et al.*, 2007). Les auteurs ont observé les concentrations ruminales en propionate doubler, celles de l'acétate diminuer et la digestibilité de la matière sèche passer de 71% à 53%. *Mais il est possible que l'écosystème ruminal se soit adapté au traitement, vu que la production de CH₄ est progressivement retournée à l'état initial à la fin de l'étude.* L'acide *alpha-bromoéthanesulfanique (BES)* inhibe la méthanogenèse car c'est un analogue de structure du cofacteur, l'acide mercaptoéthanesulfonique, utilisé par les méthanogènes dans la formation de CH₄ (Nollet *et al.*, 1997). L'administration de BES réduit immédiatement les pertes d'énergie sous forme de CH₄ (McAllister & Newbold, 2008). *Toutefois, une adaptation microbienne au BES a été rapportée 4 jours après l'administration, rendant cette stratégie inutilisable pour réduire les émissions à long terme.* Une autre enzyme ciblée pour réduire la méthanogenèse est l'hydroxyméthylglutaryl~ScoA. Comme cette enzyme est spécifique des méthanogènes, ses inhibiteurs constituent une piste intéressante à exploiter. *Les études in vitro ont donné des résultats prometteurs (Miller & Wolin, 2001), mais à notre connaissance aucune étude in vivo, n'a été réalisée.*

Bien que certains de ces composés semblent provoquer une forte diminution de la production de CH₄, leurs effets sont seulement transitoires ; de plus, les consommateurs exigent de plus en plus des produits animaux non traités par des additifs chimiques. Ceci signifie que les analogues du CH₄ ne seraient probablement pas la stratégie la mieux adaptée pour réduire les émissions de CH₄ par les ruminants (Tableau 6).

Les **antibiotiques** ionophores font partie des nombreux additifs alimentaires utilisés en production bovine. Le monensin est l'un des ionophores les plus utilisés. Des études ont montré que ce dernier inhibe significativement la production de CH₄ dans le rumen (Guan *et al.*, 2006; Mbanzamihiigo

et al., 1996; Odongo *et al.*, 2007). *Cependant, suite à l'adaptation du microbiote ruminal, une reprise totale de la production de CH₄ a été observée après quatre semaines de traitement aux ionophores chez des bovins recevant une ration riche en concentré ou en fourrage (Guan et al., 2006).*

Un autre moyen pour réduire la production de CH₄ par les ruminants est l'utilisation de **bactériophages** affectant spécifiquement les méthanogènes du rumen (Klieve & Hegarty, 1999). L'avantage de cette méthode est que les « virus des méthanogènes » sont naturellement présents dans le rumen et peuvent y survivre. *Cependant, aucun phage spécifique des méthanogènes n'a encore été purifié et ceci pourrait s'avérer un défi vue la diversité des méthanogènes (McAllister & Newbold, 2008).*

Au cours des dernières années une nouvelle piste de recherche a suscité l'intérêt des chercheurs : la **vaccination** des animaux contre les méthanogènes. Le but serait de stimuler l'animal pour produire des anticorps contre les méthanogènes connus du rumen. Un tel vaccin a été développé par une équipe australienne qui a obtenu un rendement en CH₄ plus bas de 7,7% sans pourtant diminuer la production nette journalière (Wright *et al.*, 2004b).

ANNEXE 2 : INFORMATIONS MINIMUM REQUISES POUR LA PUBLICATION DES RESULTATS QPCR

ITEM TO CHECK	IMPORTANCE	ITEM TO CHECK	IMPORTANCE
EXPERIMENTAL DESIGN		qPCR OLIGONUCLEOTIDES	
Definition of experimental and control groups	E	Primer sequences	E
Number within each group	E	RTPrimerDB Identification Number	D
Assay carried out by core lab or investigator's lab?	D	Probe sequences	D**
Acknowledgement of authors' contributions	D	Location and identity of any modifications	E
SAMPLE		Manufacturer of oligonucleotides	D
Description	E	Purification method	D
Volume/mass of sample processed	D	qPCR PROTOCOL	
Microdissection or macrodissection	E	Complete reaction conditions	E
Processing procedure	E	Reaction volume and amount of cDNA/DNA	E
If frozen - how and how quickly?	E	Primer (probe), Mg++ and dNTP concentrations	E
If fixed - with what, how quickly?	E	Polymerase identity and concentration	E
Sample storage conditions and duration (especially for FFPE sample)	E	Buffer/kit identity and manufacturer	E
NUCLEIC ACID EXTRACTION		Exact chemical constitution of the buffer	D
Procedure and/or instrumentation	E	Additives (SYBR Green I, DMSO, etc.)	E
Name of kit and details of any modifications	E	Manufacturer of plates/tubes and catalog number	D
Source of additional reagents used	D	Complete thermocycling parameters	E
Details of DNase or RNase treatment	E	Reaction setup (manual/robotic)	D
Contamination assessment (DNA or RNA)	E	Manufacturer of qPCR instrument	E
Nucleic acid quantification	E	qPCR VALIDATION	
Instrument and method	E	Evidence of optimisation (from gradients)	D
Purity (A260/A280)	D	Specificity (gel, sequence, melt, or digest)	E
Yield	D	For SYBR Green I, Cq of the NTC	E
RNA integrity method/instrument	E	Standard curves with slope and y-intercept	E
RIN/RQI or Cq of 3' and 5' transcripts	E	PCR efficiency calculated from slope	E
Electrophoresis traces	D	Confidence interval for PCR efficiency or standard error	D
Inhibition testing (Cq dilutions, spike or other)	E	r2 of standard curve	E
REVERSE TRANSCRIPTION		Linear dynamic range	E
Complete reaction conditions	E	Cq variation at lower limit	E
Amount of RNA and reaction volume	E	Confidence intervals throughout range	D
Priming oligonucleotide (if using GSP) and concentration	E	Evidence for limit of detection	E
Reverse transcriptase and concentration	E	If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E
Temperature and time	E	DATA ANALYSIS	
Manufacturer of reagents and catalogue numbers	D	qPCR analysis program (source, version)	E
Cq's with and without RT	D*	Cq method determination	E
Storage conditions of cDNA	D	Outlier identification and disposition	E
qPCR TARGET INFORMATION		Results of NTCs	E
If multiplex, efficiency and LOD of each assay.	E	Justification of number and choice of reference genes	E
Sequence accession number	E	Description of normalisation method	E
Location of amplicon	D	Number and concordance of biological replicates	D
Amplicon length	E	Number and stage (RT or qPCR) of technical replicates	E
In silico specificity screen (BLAST, etc)	E	Repeatability (intra-assay variation)	E
Pseudogenes, retrotransposons or other homologs?	D	Reproducibility (inter-assay variation, %CV)	D
Sequence alignment	D	Power analysis	D
Secondary structure analysis of amplicon	D	Statistical methods for result significance	E
Location of each primer by exon or intron (if applicable)	E	Software (source, version)	E
What splice variants are targeted?	E	Cq or raw data submission using RDMML	D

E: informations essentielles ; D : informations souhaitables

ANNEXE 3 : CALCUL DE L'EFFICACITE DE LA QPCR

Soit Q_0 la quantité de matériel au cycle 0 (initialement), Q_1 la quantité de matériel au cycle 1, ... Q_n la quantité de matériel au cycle n
Généralement on dit que

$$Q_{n+1} = Q_n * 2$$

en supposant que 100% des brins matrices sont dupliqués. Or ce n'est pas toujours le cas, d'où la notion « **d'efficacité** » d'amplification, notée E . Selon les cas, E est compris entre 0 et 1 (0% à 100% d'efficacité) ou entre 1 et 2 (nombre par lequel est multiplié la quantité en passant d'un cycle à l'autre, donc 1 équivaut à 0% et 2 à 100% dans la notation précédente).

Si on introduit la notation E en tant qu'efficacité, avec $1 \leq E \leq 2$

On a :

$$\begin{aligned} Q_1 &= Q_0 * E \\ Q_2 &= Q_1 * E \\ &\Rightarrow Q_2 = Q_0 * E^2 \end{aligned}$$

Donc au cycle n, on a

$$Q_n = Q_0 * E^n$$

Soit Q_0 et Q_0' deux concentration initiales différentes, d'après la théorie de la PCR quantitative, la C_t correspond au cycle où la fluorescence est détectable par rapport au bruit de fond, et pour une même expérience de PCR, la fluorescence est la même pour tous les échantillons à leurs C_t respectifs.

Soit C_t et C_t' les C_t correspondants aux quantités initiales Q_0 et Q_0' , comme les fluorescences sont égales on peut écrire : $F = F'$

$$Q_{C_t} = Q_{C_t}'$$

$$\Rightarrow Q_0 * E^{C_t} = Q_0' * E^{C_t'}$$

$$\Rightarrow \log(Q_0) + C_t * \log(E) = \log(Q_0') + C_t' * \log(E)$$

$$\Rightarrow \log(E) * (C_t - C_t') = \log(Q_0') - \log(Q_0)$$

$$\log(E) = [\log(Q_0') - \log(Q_0)] / (C_t - C_t') = [\log(Q_0') - \log(Q_0)] / -(C_t' - C_t)$$

$$E = 10^{[-\log(Q_0') - \log(Q_0)] / (C_t' - C_t)}$$

Or dans le coefficient directeur (la pente) d'une droite $y=f(x)$ est $(y'-y)/(x'-x)$, donc si on représente pour une gamme de dilution en série le C_t en fonction du logarithme de la concentration $C_t=f(\log(Q_0))$, la pente est égale à $[(C_t' - C_t) / \log(Q_0') - \log(Q_0)]$

$$E = 10^{-1/\text{pente}}$$

ANNEXE 4 : PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ACIDES NUCLÉIQUES (ADN ET ARN) À PARTIR D'ÉCHANTILLONS DE CONTENU RUMINAL

N° d'enregistrement Base AQ URH 625

1 – Objet

Co-extraction d'ADN génomique et d'ARN total à partir d'échantillons de contenu ruminal homogénéisé.

2 - Domaine d'application

Ce mode opératoire est validé pour le contenu ruminal mais doit pouvoir s'appliquer à d'autres matrices : phase liquide ou solide, fèces, contenus intestinaux, sols...

3 – Références

Adapté de : Griffiths, R.I., *et al.*, Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. Appl. Environ. Microbiol., 2000. 66(12): p. 5488-5491.

5 – Réactifs

a) Chimiques :

Remarque : Tous les solutions et tampons sont faits avec de l'eau traitée au DEPC et ensuite autoclavés

- PBS 1X
- Tampon CTAB (10% CTAB + NaCl 0.7M + 240 mM phosphate de potassium)
- Phénol : chloroforme : isoamyl alcool (25 :24 :1)
- Chloroforme : isoamyl alcool (24 :1)
- Polyéthylène glycol 8000 30% dans NaCl 1.6M, Ethanol 70% froid (fait avec le l'eau DEPC)
- H2O mQ DEPC
- Tris-EDTA (pH 7.4)
- Solution 0.5% SDS fait avec H2O DEPC

b) Enzymes/kits : RNase free DNase (kit Total RNA purification from Plant de Macherey Nagel)

6 – Appareillage

Remarque : Tout matériel plastique doit être certifié dépourvu de RNases ; Pipettes et paillasse doivent être préalablement nettoyées soit avec le produit RNAway, soit avec une solution SDS 0.5%.

- Precellys 24
- Centrifugeuse
- Eppendorfs 0.5 ml ; 1.5 ml et 2 ml.
- Tubes à vice de 2 ml contenant 0.8 g de billes en silice 0.5 mm de diamètre

7 – Echantillonnage

Ce mode opératoire est développé pour des échantillons conservés dans du RNALater à -80°C.

8 – Mode opératoire

Les RNases sont omniprésentes et très stables. A défaut d'une pièce réservée au travail sur les ARN, il est souhaitable que l'extraction soit réalisée sous une hotte, préalablement décontaminée.

Ce protocole est développé pour des échantillons de départ de 0.5 ml ou 0.5 g

I. Elimination de la solution de RNALater

1. Décongeler les échantillons dans la glace
2. Vortexer doucement
3. Centrifuger à 14000 x g pendant 20min à 4°C
4. Eliminer doucement la partie claire du surnageant, noter son volume (V0).
5. Ajouter V0 ml de PBS 1X et centrifuger à 14000 x g pendant 20min à 4°C
6. Eliminer la partie claire du surnageant.
7. Refaire étapes 4. à 6. jusqu'à obtention d'un surnageant claire.

II. Extraction :

1. Transférer le tout (à l'aide d'un spatule) dans des tubes à vice 2 ml contenant des billes en silice et ajouter 0.5 ml de tampon d'extraction CTAB; bien mélanger !
(Garder à température ambiante, le tampon CTAB cristallise à basses températures)
2. Ajouter 0.5 ml de phénol-chloroforme-isoamyl alcool (25 :24 :1) et laisser reposer ~ 5 min.
3. Homogénéiser dans le Precellys 24 => 2 cycles de 30 s à 5800 rpm, avec 30 s entre les cycles à Tamb.
4. Centrifuger à 14000 x g pendant 15 min à Tamb.
5. Prélever la phase liquide dans des Eppendorfs de 2 ml, noter son volume (V1)
6. Ajouter 1 volume équivalent (V1) de chloroforme-isoamyl alcool (24 :1) pour enlever le phénol
7. Centrifuger à 14000 x g pendant 10 min à 4°C
8. Prélever délicatement la phase aqueuse ; noter son volume (V₂).
(Ne pas trop s'approcher de l'interface pour éviter toute contamination au phénol).
9. Répéter étapes 6. et 7.

III. Précipitation des acides nucléiques

10. Ajouter 2 volumes (2 x V₂) d'éthanol 100% froid et 1/10 V₂ d'acétate de sodium 3 M
11. Laisser reposer la nuit à -20°C
12. Centrifuger à 18 000 x g pendant 45 min à 1h à +4°C
13. Enlever le surnageant
14. Laver le précipité d'AN dans de l'éthanol 70% froid (fait avec de l'eau DEPC) et sécher à l'air.
Répéter le lavage 2 à 3 fois.
15. Suspendre le culot dans 60 µl de tampon Rnase free Tris-EDTA (pH 7.4)
 - *En ajoutant le tampon, faire quelques vas et viens avec la pipette pour décoller et casser le culot
 - *Laisser reposer 30 min à Tamb pour bien hydrater
 - *Suspendre en tapant le tube avec le doigt ; alterner les tubes en les laissant reposer dans la glace
 - *Ne surtout pas vortexer !**
16. Aliquoter les échantillons (20 µl) et conserver tout de suite 2 aliquotes à -80°C.

IV. Rendement de l'extraction

Le rendement de l'extraction est obtenu par mesure de l'absorbance au TECAN. Le blanc est fait avec 2 µl de tampon Tris-EDTA ; les mesures sont faites sur 2 µl d'échantillon.

Reste 18 µl de l'extrait

A_{260} => ADN et ARN

$$A = C \times l \times \epsilon$$

A : Absorbance à une longueur d'onde donnée

C : Concentration des acides nucléiques

l : pas du spectrophotomètre (en général =1)

ϵ : coefficient d'extinction

$\epsilon = 0.025$ (mg/ml)-1 cm-1 pour l'ARN sb

$\epsilon = 0.027$ (mg/ml)-1 cm-1 pour l'ADN db

A_{280} => Protéines

% acide nucléique	% protéines	A_{260} / A_{280}
100	0	2
95	5	1.99
90	10	1.98
70	30	1.94

A_{270} => Phénol

Pour des solutions d'acides nucléiques non contaminées au phénol :

$$A_{260} / A_{270} = 1.2$$

A_{230} => Phénolate, thiocyanate

Pour des solutions d'acides nucléiques pures :

$$A_{260} / A_{230} = 2$$

1. Traitement à la DNase (rDNase RNase free, kit MN)

- Diluer 3 à 5 µg (**5 à 10 µl**) d'acides nucléiques dans 350 µl tampon RA1 et déposer le tout sur la membrane (couleur bleu clair) ; centrifuger 30 sec à 11 000 x g
Reste 13 à 8 µl de l'extrait à conserver à -20°C (PCR ADN)
- Ajouter 350 µl MDB et centrifuger 1 min à 11 000 x g. Eliminer le filtrat
- Préparer DNase reaction mixture : (10 µl DNase + 90 µl Reaction Buffer) x N (où N = nombre d'échantillons à traiter). Ajouter 95 µl de DNase reaction mixture au centre de la membrane. Laisser agir entre 15 min et 30 min à T_{amb} .
- Ajouter 200 µl de RA2, tampon inactivant l'enzyme et centrifuger 30 sec à 11 000 x g. Eliminer le filtrat
- Ajouter 600 µl de RA3 et centrifuger 30 sec à 11 000 x g. Eliminer le filtrat
- Ajouter 250 µl de RA3 et centrifuger 2 min à 11 000 x g pour bien sécher la membrane. Eliminer le filtrat
- Placer la membrane dans un tube Eppendorf (1.5 ml) RNase Free. Ajouter **30 µl** de H₂O DEPC ; centrifuger 1 min à 11 000 x g

2. Contrôle qualitatif des ARN totaux

Electrophorèse sur gel d'agarose 2% non dénaturant imprégné de bromure d'éthidium (BET).

La cuve de migration, le radeau et le peigne sont traités à H₂O₂, 3% pendant 10 min (soit 84 ml de 9% dans 250 ml d'eau stérilisée à l'autoclave) pour éviter une contamination importante avec ARNases. Rincer à l'eau stérile, laver à l'éthanol 70% et laisser sécher sous la hotte.

Le gel est préparé avec du tampon TAE 1X fait avec H₂O DEPC. La migration se fait dans le même tampon.

Pour le gel :		
Produit	Concentration finale	Quantité
Agarose	2%	2 g dans un erlen de 200 ml
TAE 1X	1X	100 ml
BET	0.003%	1.5 µl

* Ajouter 3 µl de tampon de charge à 10 µl d'échantillon, bien mélanger et déposer rapidement.

Reste 20 µl d'échantillons DNA free

* La migration se fait de l'anode (-) vers la cathode (+)

* Migration à 100V pendant ~ 20 min.

* Vérifier la présence de bandes sous UV (CHEMIIMAGER™) en prenant les précautions d'usage (gants, lunettes) et prendre une photo.

☞ Jeter les déchets BET dans une poubelle prévue à cet effet.

Analyse en AGILENT BIOANALYSER 2100 : pour tout échantillon dépourvu d'ADN ; 2 µl / échantillon

Reste 18 µl d'échantillons DNA free pour RT et témoin traitement DNase

La congélation/décongélation affecte gravement la qualité des ARN. Les étapes d'analyse quantitative (mesure de la DO) et qualitative (gel d'agarose, Agilent), ainsi que le traitement à la DNase, doivent être réalisées à la suite. Il est également souhaitable que la transcription inverse en ADNc se fasse immédiatement après. Ensuite les échantillons peuvent être conservés à -20°C.

ANNEXE 5 : TECHNIQUE URH DE LA MESURE DE LA PRODUCTION DE METHANE PAR LES RUMINANTS

Mesure *in vivo* du méthane produit par les ruminants

L'effet de serre:

Un phénomène thermique naturel



Indispensable à la vie sur notre planète, il est lié à la présence dans l'atmosphère de certains gaz capables de piéger le rayonnement infrarouge émis par la terre et de le réémettre en direction du sol, réchauffant ainsi les basses couches de l'atmosphère.

....amplifié par les activités humaines qui contribuent à augmenter la concentration de ces gaz dans l'atmosphère.

Le méthane (CH_4), a un pouvoir de réchauffement 20 fois plus élevé par unité de poids que celui du CO_2 . D'autre part, sa durée de vie dans l'atmosphère n'est que de 12 ans contre 100 ans pour le CO_2 : **diminuer les émissions de CH_4 aura donc une répercussion plus rapide que de diminuer celles du CO_2 .**

En France, l'agriculture engendre environ **18% de gaz à effet de serre**, dont les 3 principaux sont le protoxyde d'azote (56%), le méthane (33%) et le dioxyde de carbone (11%). La quasi totalité des émissions de méthane d'origine agricole provient de l'activité d'élevage: fermentations digestives des herbivores (87%) et déjections animales (11%).

L'étude de la méthanogenèse présente un double intérêt: Environnemental pour l'homme....



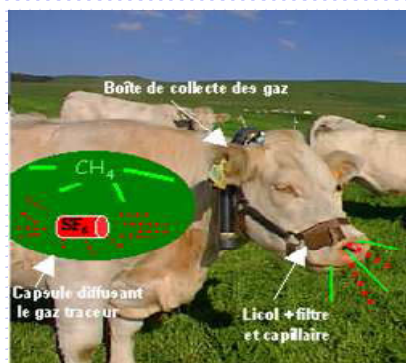
Chez le ruminant, le CH_4 est un produit formé naturellement pendant la fermentation anaérobie des aliments par les microorganismes du rumen.

Sa contribution à l'effet de serre global est de 2 à 3 % ...

... nutritionnel pour le ruminant

La méthanogenèse constitue pour le ruminant **une perte en énergie** sous forme gazeuse estimée à environ **6 à 10%** de l'énergie brute ingérée.

Pour mesurer *in vivo* la production de CH_4 chez le ruminant la technique retenue repose sur le principe de dilution d'un gaz traceur inerte introduit dans le rumen, capable de se mélanger aux autres gaz issus des fermentations (CH_4 , CO_2 ...) et de suivre les mêmes voies de libération.



Le gaz traceur, l'**hexafluorure de soufre (SF_6)**, est introduit dans le rumen à l'aide d'une capsule perméable, dont la vitesse de diffusion a été préalablement déterminée *in vitro*.

La collecte des gaz est réalisée grâce à un système d'aspiration fixé sur un licol adapté à la tête l'animal, et relié à une boîte dans laquelle l'échantillon gazeux vient s'accumuler. Contrairement aux idées préconçues, seulement 5% du méthane se retrouvent dans les flatulences, contre 95% rejetés aux cours d'éruclatations et expirations.

Les concentrations des gaz [SF_6] et [CH_4] collectés dans les boîtes, sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse. **Ainsi, connaissant la vitesse de diffusion du SF_6 de la capsule, on en déduit la vitesse de production du méthane:**

$$\text{CH}_4 (\text{l/j}) = \text{Vit. SF}_6 \times \frac{[\text{CH}_4]}{[\text{SF}_6]}$$



BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

- Abecia, L., Molina-Alcaide, E., Martin-Garcia, A. I., Martinez, G. & Yanez-Ruiz, D. R. (2010).** Animal variation in methane production, expression of *mcrA* gene and microbial numbers in the rumen of goats fed alfalfa hay with or without oats. In *Greenhouse gases and animal agriculture conference*, pp. 164. Edited by E. J. McGeough & S. M. McGinn. Banff, Canada: Agriculture and Agri-Food Canada.
- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V. & Polz, M. F. (2004).** Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology* **186**, 2629-2635.
- AFNOR (1985).** Aliments des animaux. Méthodes d'analyses françaises et communautaires. Dosage de l'amidon. In *Méthode polarimétrique*, pp. 123-125 Edited by A. F. Normalisation. Paris, France.
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L. C. & Kamra, D. N. (2009).** Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology* **148**, 321-327.
- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995).** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**, 143-169.
- Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K. & Bayaru, E. (2003).** Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science* **82**, 245-248.
- Archer, D. B. & Powell, G. E. (1985).** Dependence of the specific growth rate of methanogenic mutualistic cocultures on the methanogen. *Archives of Microbiology* **141**, 133-137.
- Asanuma, N., Iwamoto, M. & Hino, T. (1999).** Effect of the Addition of Fumarate on Methane Production by Ruminal Microorganisms In Vitro. *Journal of Dairy Science* **82**, 780-787.
- Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. (1979).** Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiology Molecular Biology Reviews* **43**, 260-296.
- Baldwin, R. L. & Allison, M. J. (1983).** Rumen Metabolism. *Journal of Animal Science* **57**, 461-477.
- Baptiste, E., Brochier, C. & Boucher, Y. (2005).** Higher-level classification of the *Archaea*: evolution of methanogenesis and methanogens. *Archaea* **1**, 353-363.
- Beauchemin, Karen, A., McGinn & Sean, M. (2006).** *Enteric methane emissions from growing beef cattle as affected by diet and level of intake*. Ottawa, ON, CANADA: Agricultural Institute of Canada.

- Beauchemin, K. A. & McGinn, S. M. (2005).** Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of Animal Science* **83**, 653-661.
- Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F. & McAllister, T. A. (2008).** Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**, 21-27.
- Beauchemin, K. A., McAllister, T. A. & McGinn, S. M. (2009).** Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews* **4**.
- Beever, D. E. (1993).** Rumen Function. In *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, pp. 187-215. Edited by J. M. Forbes & J. France. Wallingford, U. K.: CAB International.
- Benchaa, C., McAllister, T. A. & Chouinard, P. Y. (2008).** Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or Yucca schidigera saponin extracts. *Journal of Dairy Science* **91**, 4765-4777.
- Bera-Maillet, C., Mosoni, P., Kwasiborski, A., Suau, F., Ribot, Y. & Forano, E. (2009).** Development of a RT-qPCR method for the quantification of Fibrobacter succinogenes S85 glycoside hydrolase transcripts in the rumen content of gnotobiotic and conventional sheep. *Journal of Microbiological Methods* **77**, 8-16.
- Bird, S. H., Hegarty, R. S. & Woodgate, R. (2008).** Persistence of defaunation effects on digestion and methane production in ewes. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**, 152-155.
- Blaxter, K. L. & Clapperton, J. L. (1965).** Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition* **19**, 511-522.
- Blaxter, K. L. & Czerkawski, J. (1966).** Modifications of the methane production of the sheep by supplementation of its diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **17**, 417-421.
- Boadi, D. A., Wittenberg, K. M., Kennedy & A. D. (2002).** *Validation of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique for measurement of methane and carbon dioxide production by cattle*. Ottawa, ON, CANADA: Agricultural Institute of Canada.
- Bonhomme, A. (1990).** Rumen ciliates: their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. *Animal Feed Science and Technology* **30**, 203-266.
- Brulc, J. M., Antonopoulos, D. A., Berg Miller, M. E. & other authors (2009).** Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 1948-1953.

- Bustin, S. A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 169-193.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A. & other authors (2009).** The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* **55**, 611-622.
- Case, R. J., Boucher, Y., Dahllof, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F. & Kjelleberg, S. (2007).** Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 278-288.
- Chagan, I., Tokura, M., Jouany, J.-P. & Ushida, K. (1999).** Detection of methanogenic *Archaea* associated with rumen ciliate protozoa. *The Journal of General and Applied Microbiology* **45**, 305-308.
- Chaucheyras, F., Fonty, G., Bertin, G. & Gouet, P. (1995).** In vitro H₂ utilization by a ruminal acetogenic bacterium cultivated alone or in association with an *Archaea* methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology* **61**, 3466-3467.
- Cheng, Y. F., Mao, S. Y., Liu, J. X. & Zhu, W. Y. (2009).** Molecular diversity analysis of rumen methanogenic *Archaea* from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. *Letters in Applied Microbiology* **48**, 585-592.
- Christophersen, C. T., Wright, A.-D. & Vercoe, P. E. (2004).** Examining diversity of free-living methanogens and those associated with protozoa in the rumen. *Journal of Animal and Feed Sciences* **13**, 51-54.
- Clarke, R. T. J. (1977).** The Gut and its Micro-organisms. In *Microbial Ecology of the Gut*. Edited by R. T. J. Clarke & T. Bauchop. London New York San Francisco: Academic Press.
- Colwell, F. S., Boyd, S., Delwiche, M. E., Reed, D. W., Phelps, T. J. & Newby, D. T. (2008).** Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at Hydrate Ridge, Cascadia margin. *Applied Environmental Microbiology* **74**, 3444-3452.
- Costa, R., Gomes, N. C. M., Milling, A. & Smalla, K. (2004).** An optimized protocol for simultaneous extraction of DNA and RNA from soils. *Brazilian Journal of Microbiology* **35**, 230-234.
- Czerkawski, J. W., Blaxter, K. L. & Wainman, F. W. (1966).** The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *British Journal of Nutrition* **20**, 349-362.
- Czerkawski, J. W. & Breckenridge, C. G. H. G. (1972).** The Relationship between Methane Production and Concentrations of Hydrogen in the Aqueous and Gaseous Phases during Rumen Fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Microbiology* **35**, 537-551.

- Czerkawski, J. W. (1986).** An introduction to rumen studies, pp. 236: Pergamon Press (Oxford Oxfordshire and New York).
- Demeyer, D. (1991a).** Differences in stoichiometry between rumen and hindgut fermentation. *Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition* **22**, 50-61.
- Demeyer, D. (1991b).** Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, pp. 217-237. Edited by J. P. Jouany. Paris: INRA Editions.
- Demeyer, D. I., Fiedler, D. & De Graeve, K. G. (1996).** Attempted induction of reductive acetogenesis into the rumen fermentation in vitro. *Reproduction Nutrition Development* **36**, 233-240.
- Deng, W., Xi, D., Mao, H. & Wanapat, M. (2008).** The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports* **35**, 265-274.
- Denman, S. E. & McSweeney, C. S. (2006).** Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology* **58**, 572-582.
- Denman, S. E., Tomkins, N. W. & McSweeney, C. S. (2007).** Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology* **62**, 313-322.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A. & Kreuzer, M. (2001).** Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Letters in Applied Microbiology* **32**, 47-51.
- Doreau, M. & Ferlay, A. (1995).** Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livestock Production Science* **43**, 97-110.
- Drogoul, C., Gadoud, R., M.M., J., Jussiau, R., M.J., L., Mangeol, B., Montméas, L. & Tarrit, A. (2007).** Nutrition et alimentation des animaux d'élevage. Edited by INRA éditions. Dijon.
- Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J. & John Wallace, R. (2004).** 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* **86**, 263-281.
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J. & Kingston-Smith, A. H. (2007).** Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology* **62**, 323-335.
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Kingston-Smith, A. H. & Scollan, N. D. (2008).** Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. *Animal* **2**, 653-660.

- Eugène, M., Archimède, H. & Sauvant, D. (2004).** Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science* **85**, 81-97.
- Eugène, M., Masse, D., Chiquette, J. & Benchaar, C. (2008).** *Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows*. Ottawa, ON, CANADA: Agricultural Institute of Canada.
- Eugène, M., Martin, C., Mialon, M. M., Krauss, D., Renand, G. & Doreau, M. (in press).** Dietary linseed and starch supplementation decreases methane production of fattening bulls. *Animal Feed Science and Technology*.
- Evans, P. N., Hinds, L. A., Sly, L. I., McSweeney, C. S., Morrison, M. & Wright, A.-D. G. (2009).** Community Composition and Density of Methanogens in the Foregut of the Tammar Wallaby (*Macropus eugenii*). *Applied Environmental Microbiology* **75**, 2598-2602.
- FAO-Newsroom (2009).**
- FAO (2007).** Climate Change 2007: Synthesis Report.
- FAO (2009).** The state of food and agriculture 2009 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
- Feinstein, L. M., Sul, W. J. & Blackwood, C. B. (2009).** Assessment of Bias Associated with Incomplete Extraction of Microbial DNA from Soil. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 5428-5433.
- Felsenstein, J. (2005).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. : Distributed by the author.
- Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, J. K., Williams, G. A., Embley, T. M. & Hirt, R. P. (1994).** Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* **117**, 157-161.
- Fonty, G., Gouet, P., Jouany, J.-P. & Senaud, J. (1987).** Establishment of the Microflora and Anaerobic Fungi in the Rumen of Lambs. *Journal of General Microbiology* **133**, 1835-1843.
- Fonty, G., Joblin, K., Chavarot, M., Roux, R., Naylor, G. & Michallon, F. (2007).** Establishment and Development of Ruminant Hydrogenotrophs in Methanogen-Free Lambs. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 6391-6403.
- Freitag, T. E. & Prosser, J. I. (2009).** Correlation of methane production and functional gene transcriptional activity in a peat soil. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 6679-6687.
- Frey, J. C., Pell, A. N., Berthiaume, R., Lapierre, H., Lee, S., Ha, J. K., Mendell, J. E. & Angert, E. R. (2010).** Comparative studies of microbial populations in the rumen,

- duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. *Journal of Applied Microbiology* **108**, 1982-1993.
- Friedrich, M. W. & Jared, R. L. (2005).** Methyl-Coenzyme M Reductase Genes: Unique Functional Markers for Methanogenic and Anaerobic Methane-Oxidizing *Archaea*. In *Methods in Enzymology*, pp. 428-442: Academic Press.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S. & other authors (2002).** Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* **4**, 634-643.
- Gagen, E. J., Denman, S. E., Padmanabha, J., Zadbuke, S., Al Jassim, R., Morrison, M. & McSweeney, C. S. (2010).** Functional Gene Analysis Suggests Different Acetogen Populations in the Bovine Rumen and Tammar Wallaby Forestomach. *Applied Environmental Microbiology* **76**, 7785-7795.
- Galand, P. E., Fritze, H. & Yrjala, K. (2003).** Microsite-dependent changes in methanogenic populations in a boreal oligotrophic fen. *Environmental Microbiology* **5**, 1133-1143.
- Gao, B. & Gupta, R. S. (2007).** Phylogenomic analysis of proteins that are distinctive of *Archaea* and its main subgroups and the origin of methanogenesis. *BMC Genomics* **8**, 86.
- Garcia, J.-L., Patel, B. K. C. & Ollivier, B. (2000).** Taxonomic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of Methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* **6**, 205-226.
- Giger-Reverdin, S., Morand-Fehr, P. & Tran, G. (2003).** Literature survey of the influence of dietary fat composition on methane production in dairy cattle. *Livestock Production Science* **82**, 73-79.
- Gill, M., Smith, P. & Wilkinson, J. M. (2010).** Mitigating climate change: the role of domestic livestock. *Animal* **4**, 323-333.
- Goel, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2008a).** Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology* **147**, 72-89.
- Goel, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2008b).** Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology* **105**, 770-777.
- Goel, G., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2009).** Inhibition of methanogens by bromochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. *British Journal of Nutrition* **101**, 1484-1492.

- Goering, H. K. & Van Soest, P. J. (1970).** Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications) Washington: Agricultural Research Service, United States
- Goopy, J. P. & Hegarty, R. S. (2004).** Repeatability of methane production in cattle fed concentrate and forage diets. *Journal of Animal And Feed Sciences* **13**, 75-78.
- Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S. M., Auldist, M. J., Beauchemin, K. A., Hannah, M. C., Waghorn, G. C., Clark, H. & Eckard, R. J. (2007a).** Methane Emissions from Dairy Cows Measured Using the Sulfur Hexafluoride (SF₆) Tracer and Chamber Techniques. *Journal of Dairy Science* **90**, 2755-2766.
- Grainger, C., Clarke, T., McGinn, S. M., Auldist, M. J., Beauchemin, K. A., Hannah, M. C., Waghorn, G. C., Clark, H. & Eckard, R. J. (2007b).** Methane Emissions from Dairy Cows Measured Using the Sulfur Hexafluoride (SF₆) Tracer and Chamber Techniques. *Journal of Dairy Science* **90**, 2755-2766.
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G. & Bailey, M. J. (2000).** Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based Microbial Community Composition. *Applied Environmental Microbiology* **66**, 5488-5491.
- Guan, H., Wittenberg, K. M., Ominski, K. H. & Krause, D. O. (2006).** Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science* **84**, 1896-1906.
- Guan, L. L., Nkrumah, J. D., Basarab, J. A. & Moore, S. S. (2008).** Linkage of microbial ecology to phenotype: correlation of rumen microbial ecology to cattle's feed efficiency. *FEMS Microbiology Letters* **288**, 85-91.
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Zhu, W. Y. & McSweeney, C. (2007).** Shifts of rumen microbial population detected by real-time PCR when methanogenesis is inhibited. *Journal of Animal and Feed Sciences* **16**, 107-112.
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Lu, Y., Zhu, W. Y., Denman, S. E. & McSweeney, C. S. (2008).** Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* **47**, 421-426.
- Hales, B. A., Edwards, C., Ritchie, D. A., Hall, G., Pickup, R. W. & Saunders, J. R. (1996).** Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied Environmental Microbiology* **62**, 668-675.
- Hegarty, R. S. (1999).** Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**, 1321-1328.

- Hegarty, R. S., Goopy, J. P., Herd, R. M. & McCorkell, B. (2007).** Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science* **85**, 1479-1486.
- Hennigan, A. N. & Reeve, J. N. (1994).** mRNAs in the methanogenic archaeon *Methanococcus vannielii*: numbers, half-lives and processing. *Molecular Microbiology* **11**, 655-670.
- Hess, H. D., Kreuzer, M., Díaz, T. E., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Soliva, C. R. & Machmüller, A. (2003).** Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology* **109**, 79-94.
- Hildenbrand, C., Stock, T., Lange, C., Rother, M. & Soppa, J. (2011).** Genome Copy Numbers and Gene Conversion in Methanogenic *Archaea*. *Journal of Bacteriology* **193**, 734-743.
- Hook, S. E., Northwood, K. S., Wright, A. D. & McBride, B. W. (2009).** Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 374-380.
- Hoover, W. H. (1978).** Digestion and Absorption in the Hindgut of Ruminants. *Journal of Animal Science* **46**, 1789-1799.
- Hristov, A. N., McAllister, T. A., Van Herk, F. H., Cheng, K. J., Newbold, C. J. & Cheeke, P. R. (1999).** Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *Journal of Animal Science* **77**, 2554-2563.
- Hsu, J. T., Fahey, G. C., Jr., Merchen, N. R. & Mackie, R. I. (1991).** Effects of defaunation and various nitrogen supplementation regimens on microbial numbers and activity in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science* **69**, 1279-1289.
- Hungate, R. E. (1966).** The rumen and its microbes. New York, USA: Academic Press.
- Hungate, R. E. (1967).** Hydrogen as an intermediate in the rumen fermentation. *Archives of Microbiology* **59**, 158-164.
- Huntington, G. B. (1997).** Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *Journal of Animal Science* **75**, 852-867.
- Huntington, G. B., Harmon, D. L. & Richards, C. J. (2006).** Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *Journal of Animal Science* **84**, E14-.
- Huws, S. A., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Scott, M. B., Wallace, R. J. & Scollan, N. D. (2010).** Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. *FEMS Microbiology Ecology* **73**, 396-407.

- Hvelplund, T. (1991).** Volatile fatty acids and protein production in the rumen. In *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*, pp. 165-178. Edited by J. P. Jouany. Paris: INRA.
- Hwang, K., Shin, S. G., Kim, J. & Hwang, S. (2008).** Methanogenic profiles by denaturing gradient gel electrophoresis using order-specific primers in anaerobic sludge digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**, 269-276.
- IPCC (2007).** Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, pp. 104. Geneva, Switzerland,: IPCC.
- Janssen, P. H. & Kirs, M. (2008).** Structure of the *Archaeal* Community of the Rumen. *Applied Environmental Microbiology* **74**, 3619-3625.
- Janssen, P. H. (2010).** Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology* **160**, 1-22.
- Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M. H. & Journet, M. (1995).** Nutrition des ruminants domestiques: INRA Editions.
- Jarvis, G. N., Strömpl, C., Burgess, D. M., Skillman, L. C., Moore, E. R. B. & Joblin, K. N. (2000).** Isolation and Identification of Ruminal Methanogens from Grazing Cattle. *Current Microbiology* **40**, 327-332.
- Jeyanathan, J., Kirs, M., Ronimus, R. S., Hoskin, S. O. & Janssen, P. H. (2011).** Methanogen community structure in the rumens of farmed sheep, cattle and red deer fed different diets. *FEMS Microbiology Ecology*, no-no.
- Joblin, K. N. (1999).** Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**, 1307-1314.
- Johnson, K., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B. & Zimmerman, P. (1994).** Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science & Technology* **28**, 359-362.
- Johnson, K. A. & Johnson, D. E. (1995).** Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* **73**, 2483-2492.
- Jouany, J.-P. (1994).** Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Productions Animales* **7**, 207-225.
- Jouany, J.-P. & Thivend, P. (2008).** La production de méthane d'origine digestive chez les ruminants et son impact sur le réchauffement climatique. *Management & Avenir* **20**, 259-274.
- Jouany, J. P., J, S., J, L. & A, V. (1979).** Défaunation du rumen de mouton. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* **19**, 619-624.

- Jouany, J. P. & Senaud, J. (1979).** Description d'une technique permettant d'effectuer des prélèvements répétés de gaz dans le rumen. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique*, **19**, 1007-1010.
- Jouany, J. P., Demeyer, D. I. & Grain, J. (1988).** Effect of defaunating the rumen. *Animal Feed Science and Technology* **21**, 229-265.
- Jouany, J. P., Broudiscou, L., Prins, R. A. & Komisarczuk-Bony, S. (1995).** Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In *Nutrition des ruminants domestiques*. Edited by R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce & M. Journet. Paris: INRA.
- Jouany, J. P. & Morgavi, D. P. (2007).** Use of "natural" products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* **1**, 1443-1466.
- Juottonen, H., Galand, P. E. & Yrjälä, K. (2006).** Detection of methanogenic *Archaea* in peat: comparison of PCR primers targeting the *mcrA* gene. *Research in Microbiology* **157**, 914-921.
- Kang, S., Denman, S. E., Morrison, M., Yu, Z. & McSweeney, C. S. (2009).** An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction. *Current Microbiology* **58**, 464-471.
- Karnati, S. K. R., Yu, Z., Sylvester, J. T., Dehority, B. A., Morrison, M. & Firkins, J. L. (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.
- Karnati, S. K. R., Yu, Z. & Firkins, J. L. (2009).** Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. II. Interaction of treatment and presence of protozoa on prokaryotic communities. *Journal of Dairy Science* **92**, 3861-3873.
- Keyser, M., Witthuhn, R. C., Lamprecht, C., Coetzee, M. P. A. & Britz, T. J. (2006).** PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 77-84.
- Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C. & Krause, D. O. (2009).** Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 7115-7124.
- Kim, M., Morrison, M. & Yu, Z. (in press).** Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiology Ecology*
- Klieve, A. V. & Hegarty, R. S. (1999).** Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* **50**, 1315-1320.

- Kobayashi, Y. (2006).** Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. *Animal Science Journal* **77**, 375-385.
- Kocherginskaya, S. A., Aminov, R. I. & White, B. A. (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 Microbiology Letters* **229**, 23-30.
- Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S. & Kobayashi, Y. (2010).** Molecular Monitoring and Isolation of Previously Uncultured Bacterial Strains from the Sheep Rumen. *Applied Environmental Microbiology* **76**, 1887-1894.
- Krause, Denis, O., Smith, Wendy, J., McSweeney & Christopher, S. (2001).** *Extraction of microbial DNA from rumen contents containing plant tannins*. Natick, MA, ETATS-UNIS: Eaton.
- Lana, R. P., Russell, J. B. & Van Amburgh, M. E. (1998).** The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science* **76**, 2190-2196.
- Lassey, K. R., Ulyatt, M. J., Martin, R. J., Walker, C. F. & David Shelton, I. (1997).** Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmospheric Environment* **31**, 2905-2914.
- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Altermann, E. & other authors (in press).** The Genome Sequence of the Rumen Methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* Reveals New Possibilities for Controlling Ruminant Methane Emissions. *PLoS ONE* **5**
- Leedle, J. A. & Greening, R. C. (1988).** Postprandial changes in methanogenic and acidogenic bacteria in the rumens of steers fed high- or low-forage diets once daily. *Applied Environmental Microbiology* **54**, 502-506.
- Leedle, J. A. Z., Barsuhn, K. & Hespell, R. B. (1986).** Postprandial Trends in Estimated Ruminal Digesta Polysaccharides and Their Relation to Changes in Bacterial Groups and Ruminal Fluid Characteristics. *Journal of Animal Science* **62**, 789-803.
- Leng, R. A., Dellow, D. & Waghorn, G. (1986).** Dynamics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle fed on diets of freshly cut grass. *British Journal of Nutrition* **56**, 455-462.
- Lin, C., Raskin, L. & Stahl, D. A. (1997).** Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analyses using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 281-294.

- Liu, Y. & Whitman, W. B. (2008).** Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic *Archaea*. *Ann N Y Acad Sci* **1125**, 171-189.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lopez, S., McIntosh, F. M., Wallace, R. J. & Newbold, C. J. (1999).** Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology* **78**, 1-9.
- Lueders, T. & Friedrich, M. (2000).** *Archaeal* Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil. *Applied Environmental Microbiology* **66**, 2732-2742.
- Lueders, T., Chin, K.-J., Conrad, R. & Friedrich, M. (2001).** Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel *Archaeal* lineage. *Environmental Microbiology* **3**, 194-204.
- Lueders, T. & Friedrich, M. W. (2003).** Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and *mcrA* Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 320-326.
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J. & Riley, P. W. (2002).** The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**, 3521-3530.
- Machmüller, A., Soliva Carla, R. & Michael, K. (2003).** Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition Development* **43**, 41-55.
- Mackie, R. I., Gilchrist, F. M. C., Robberts, A. M., Hannah, P. E. & Schwartz, H. M. (1978).** Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *Journal of Agricultural Science* **90**, 241-254.
- Mackie, R. I. & Bryant, M. P. (1994).** Acetogenesis and the rumen: syntrophic relationships. In *Acetogenesis*. Edited by H. L. Drake. New York: Chapman and Hall.
- Mao, H.-L., Wang, J.-K., Zhou, Y.-Y. & Liu, J.-X. (2010).** Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* **129**, 56-62.
- Martin, C., Philippeau, C. & Michalet-Doreau, B. (1999).** Effect of wheat and corn variety on fiber digestion in beef steers fed high-grain diets. *Journal of Animal Science* **77**, 2269-2278.

- Martin, C., Morgavi, D., Doreau, M. & Jouany, J. P. (2006).** Comment réduire la production de méthane chez les ruminants. *Fourrages* **187**, 283-300.
- Martin, C., Dubroeuq, H., Micol, D., Agabriel, J. & Doreau, M. (2007).** Methane output from beef cattle fed different high-concentrate diets. In *Proc of British Society of Animal Science*, pp. 46. Southport, UK.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J. P., Doreau, M. & Chilliard, Y. (2008a).** Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science*, 2007-0774.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J. P., Doreau, M. & Chilliard, Y. (2008b).** Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *Journal of Animal Science* **86**, 2642-2650.
- Martin, C., Ferlay, A., Chilliard, Y. & M., D. (2009).** Decrease in methane emissions in dairy cows with increase in dietary linseed content. In *British Society of Animal Science*, pp. 21. Southport, UK.
- Martin, C., Koolaard, Y., Rochette, Y., Clark, H., Jouany, J. P. & Pinares -Patino, C. S. (2010a).** Effect of release rate of the SF₆ tracer on methane and carbon dioxide emission estimates based on ruminal and breath gas samples. In *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*, pp. 85. Edited by E. J. McGeough & S. M. McGinn. Banff, Canada: Agriculture and Agri-Food Canada.
- Martin, C., Morgavi, D. P. & Doreau, M. (2010b).** Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* **4**, 351-365.
- Mbanzamihigo, L., van Nevel, C. J. & Demeyer, D. I. (1996).** Lasting effects of monensin on rumen and caecal fermentation in sheep fed a high grain diet. *Animal Feed Science and Technology* **62**, 215-228.
- McAllister, T. A., Cheng, K.-J., Okine, E. K. & Mathison, G. W. (1996).** Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* **76**, 231-243.
- McAllister, T. A. & Newbold, C. J. (2008).** Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **28**, 7-13.
- McCaughey, W. P., Wittenberg, K. & Corrigan, D. (1999).** Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Canadian Journal of Animal Science* **79**, 221-226.
- McIntosh, F. M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R. J., Beever, D. A. & Newbold, C. J. (2003).** Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Applied Environmental Microbiology* **69**, 5011-5014.

- McSweeney, C., Kang, S., Gagen, E., Davis, C., Morrison, M. & Denman, S. (2009).** Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 341-351.
- Metzker, M. L. (2009).** Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **11**, 31-46.
- Michelland, R. J., Monteils, V., Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Gidenne, T., Hamelin, J. & Fortun-Lamothe, L. (2009).** Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. *Journal of Applied Microbiology* **107**, 1642-1650.
- Michelland, R. J., Monteils, V., Combes, S., Cauquil, L., Gidenne, T. & Fortun-Lamothe, L. (2010).** Comparison of the *Archaeal* community in the fermentative compartment and faeces of the cow and the rabbit. *Anaerobe* **16**, 396-401.
- Miller, T. L. & Wolin, M. J. (1985).** *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives of Microbiology* **141**, 116-122.
- Miller, T. L., Wolin, M. J., Zhao, H. X. & Bryant, M. P. (1986).** Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. *Applied Environmental Microbiology* **51**, 201-202.
- Miller, T. L. & Wolin, M. J. (2001).** Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-SCoA reductase inhibitors. *Journal of Dairy Science* **84**, 1445-1448.
- Miller, T. L. & Lin, C. (2002).** Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woesei* sp. nov. and *Methanobrevibacter wolinii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 819-822.
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z. A., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S. & Itabashi, H. (2004).** Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *Journal of Animal Science* **82**, 1839-1846.
- Molano, G., Knight, T. W. & Clark, H. (2008).** Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**, 165-168.
- Monforte-Briceno, G. E., Sandoval-Castro, C. A., Ramirez-Aviles, L. & Capetillo Leal, C. M. (2005).** *Defaunating capacity of tropical fodder trees : Effects of polyethylene glycol and its relationship to in vitro gas production*. Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.
- Morgavi, D. P., Boudra, H., Jouany, J. P. & 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.

- Morgavi, D. P., Jouany, J. P., Martin, C. & Ranilla, M. J. (2006).** *Archaeal community structure diversity in the rumen of faunated and defaunated sheep. International Congress Series* **1293**, 127-130.
- Morgavi, D. P., Jouany, J. P. & Martin, C. (2008).** Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture* **48**, 69-72.
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C. & Newbold, C. J. (2010).** Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal* **4**, 1024-1036.
- Morvan, B., Dore, J., Rieu-Lesme, F., Foucat, L., Fonty, G. & Gouet, P. (1994).** Establishment of hydrogen-utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb. *FEMS Microbiology Letters* **117**, 249-256.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C. & Forano, E. (2007).** Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 2676-2685.
- Mosoni, P., Martin, C., Forano, E. & Morgavi, D. P. (in press).** Long-term defaunation increases the abundance of cellulolytic ruminococci and methanogens but does not affect the bacterial and methanogen diversity in the rumen of sheep. *Journal of Animal Science*.
- Moss, A. R., Jouany, J.-P. & Newbold, J. (2000).** Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech* **49**, 231-253.
- Murray, R. M., Bryant, A. M. & Leng, R. A. (1976).** Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *British Journal of Nutrition* **36**, 1-14.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993).** Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* **59**, 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.
- Muyzer, G. (1999).** DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* **2**, 317-322.
- Nakamura, N., Leigh, S., R., Mackie, R., I. & Gaskins, H. R. (2009).** Microbial community analysis of rectal methanogens and sulfate reducing bacteria in two non-human primate species. *Journal of Medical Primatology* **38**, 360-370.

- Newbold, C. J., Lassalas, B. & Jouany, J. P. (1995).** The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* **21**, 230-234.
- Newbold, C. J., el Hassan, S. M., Wang, J., Ortega, M. E. & Wallace, R. J. (1997).** Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *British Journal of Nutrition* **78**, 237-249.
- Newbold, C. J., Lopez, S., Nelson, N., Ouda, J. O., Wallace, R. J. & Moss, A. R. (2005).** Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. *British Journal of Nutrition* **94**, 27-35.
- Nicholson, M., Evans, P. & Joblin, K. (2007).** Analysis of methanogen diversity in the rumen using temporal temperature gradient gel electrophoresis: identification of uncultured methanogens. *Microbial Ecology* **54**, 141-150.
- Nollet, L., Demeyer, D. & Verstraete, W. (1997).** Effect of 2-bromoethanesulfonic acid and *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 addition on stimulation of reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem by selective inhibition of methanogenesis. *Applied Environmental Microbiology* **63**, 194-200.
- Nollet, L., Mbanzamihigo, L., Demeyer, D. & Verstraete, W. (1998).** Effect of the addition of *Peptostreptococcus productus* ATCC 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. *Animal Feed Science and Technology* **71**, 49-66.
- Odongo, N. E., Bagg, R., Vessie, G. & other authors (2007).** Long-Term Effects of Feeding Monensin on Methane Production in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 1781-1788.
- Ohene-Adjei, S., Teather, R. M., Ivan, M. & Forster, R. J. (2007).** Postinoculation Protozoan Establishment and Association Patterns of Methanogenic *Archaea* in the Ovine Rumen. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 4609-4618.
- Ohene-Adjei, S., Chaves, A. V., McAllister, T. A., Benchaar, C., Teather, R. M. & Forster, R. J. (2008).** Evidence of increased diversity of methanogenic *Archaea* with plant extract supplementation. *Microbial Ecology* **56**, 234-242.
- 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**, 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**, 158-162.
- Patra, A. & Saxena, J. (2009a).** Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek* **96**, 363-375.

- Patra, A. K. & Saxena, J. (2009b).** The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews* **22**, 204-219.
- Patra, A. K. (2010).** Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **90**, 2700-2708.
- Pei, C.-X., Mao, S.-Y., Cheng, Y.-F. & Zhu, W.-Y. (2010).** Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *Animal* **4**, 20-29.
- Pelmont, J. (2005).** Hydrogène - Acétate - Méthane. In *Biodégradation et métabolismes*. Edited by E. Sciences. Grenoble.
- Phongsisay, V., Perera, V. N. & Fry, B. N. (2007).** Evaluation of eight RNA isolation methods for transcriptional analysis in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 427-429.
- Pihl, T. D., Sharma, S. & Reeve, J. N. (1994).** Growth phase-dependent transcription of the genes that encode the two methyl coenzyme M reductase isoenzymes and N5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase in *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H. *Journal of Bacteriology* **176**, 6384-6391.
- Pinares-Patino, C. S., Machmüller, A., Molano, G., Smith, Vlaming, J. B. & Clark, H. (2008).** The SF₆ tracer technique for measurements of methane emission from cattle - effect of tracer permeation rate. Ottawa, ON, CANADA: Agricultural Institute of Canada.
- Pinares-Patiño, C. S., Baumont, R. & Martin, C. (2003).** Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity *Canadian Journal of Animal Science* **83**, 769-777.
- Pinares-Patiño, C. S., D'Hour, P., Jouany, J. P. & Martin, C. (2007).** Effects of stocking rate on methane and carbon dioxide emissions from grazing cattle. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **121**, 30-46.
- Pitta, D., Pinchak, W., Dowd, S. & other authors (2010).** Rumen Bacterial Diversity Dynamics Associated with Changing from Bermudagrass Hay to Grazed Winter Wheat Diets. *Microbial Ecology* **59**, 511-522.
- Poitras, E. & Houde, A. (2002).** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* **2**, 2-11.
- Popova, M., Martin, C. & Morgavi, D. P. (2010a).** Improved protocol for high-quality co-extraction of DNA and RNA from rumen digesta. *Folia Microbiologica (Praha)* **55**, 368-372.

- Popova, M., Martin, C., Rochette, Y., Graviou, D. & Morgavi, D. P. (2010b).** Methane emissions and rumen methanogens in sheep harbouring or not protozoa. In *In: Proc of the 7th Joint Symposium RRI-INRA "Gut Microbiology: new insights into gut microbial ecosystems"*. Aberdeen, UK.
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M. M., Doreau, M. & Morgavi, D. P.** Diet composition influences methanogenic *Archaea* diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Animal Feed Science and Technology* in press.
- Ramakrishnan, B., Lueders, T., Dunfield, P. F., Conrad, R. & Friedrich, M. W. (2001).** Archaeal community structures in rice soils from different geographical regions before and after initiation of methane production. *FEMS Microbiology Ecology* **37**, 175-186.
- Ranilla, M. J., Jouany, J. P. & Morgavi, D. P. (2007).** Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro. *Letters in Applied Microbiology* **45**, 675-680.
- Reeve, J. N., Nolling, J., Morgan, R. M. & Smith, D. R. (1997).** Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *Journal of Bacteriology* **179**, 5975-5986.
- Regensbogenova, M., McEwan, N. R., Javorsky, P., Kisidayova, S., Michalowski, T., Newbold, C. J., Hackstein, J. H. & Pristas, P. (2004a).** A re-appraisal of the diversity of the methanogens associated with the rumen ciliates. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 307-313.
- Regensbogenova, M., Pristas, P., Javorsky, P., Moon-van der Staay, S. Y., Van Der Staay, G. W. M., Hackstein, J. H. P., Newbold, C. J. & McEwan, N. R. (2004b).** Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology* **39**, 144-147.
- Rochelle, P. A., Cragg, B. A., Fry, J. C., John Parkes, R. & Weightman, A. J. (1994).** Effect of sample handling on estimation of bacterial diversity in marine sediments by 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiology Ecology* **15**, 215-225.
- Rochette, Y., Fabre, M., Jouany, J. P. & Martin, C. (2005).** Procédure de vérification du système de collecte du méthane émis par les ruminants. *Cahier Techniques Inra* **54**, 3-10.
- Rodrigo, M. C., Martin, D. S., Redetzke, R. A. & Eyster, K. M. (2002).** A method for the extraction of high-quality RNA and protein from single small samples of arteries and veins preserved in RNAlater. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **47**, 87 - 92.
- Romero-Perez, G. A., Ominski, K. H., McAllister, T. A. & Krause, D. O. (2011).** Effect of environmental factors and influence of rumen and hindgut biogeography on bacterial communities in steers. *Applied Environmental Microbiology* **77**, 258-268.
- Rouviere, P. E. & Wolfe, R. S. (1988).** Novel biochemistry of methanogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 7913-7916.

- Sadet, S., Martin, C., Meunier, B. & Morgavi, D. P. (2007).** PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. *Animal* **1**, 939-944.
- Sar, C., Santoso, B., Mwenya, B., Gamo, Y., Kobayashi, T., Morikawa, R., Kimura, K., Mizukoshi, H. & Takahashi, J. (2004).** Manipulation of rumen methanogenesis by the combination of nitrate with [beta]1-4 galacto-oligosaccharides or nisin in sheep. *Animal Feed Science and Technology* **115**, 129-142.
- Sauvant, D. (1992).** La production de méthane dans la biosphère : le rôle des animaux d'élevage *Courrier de la Cellule Environnement INRA*, 67-70.
- Sauvant, D. & Giger-Reverdin, S. (2009).** Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane chez les ruminants. *INRA Productions Animales* **22**, 375-384.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T. & other authors (2009).** Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 7537-7541.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008).** Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature Protocols* **3**, 1101-1108.
- Schneegurt, M., Dore, S. & Kulpa., C. J. (2003).** Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. *Current Issues in Molecular Biology* **5**, 1-8.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S. & other authors (2006).** The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* **7**, 3.
- Sekiguchi, Hiroyuki, Tomioka, Noriko, Nakahara, Tadaatsu, Uchiyama & Hiroo (2001).** A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters* **23**.
- Sessitsch, A., Gyamfi, S., Stralis-Pavese, N., Weilharter, A. & Pfeifer, U. (2002).** RNA isolation from soil for bacterial community and functional analysis: evaluation of different extraction and soil conservation protocols. *Journal of Microbiological Methods* **51**, 171-179.
- Sharp, R., Ziemer, C. J., Stern, M. D. & Stahl, D. A. (1998).** Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* **26**, 71-78.
- Shin, E. C., Cho, K. M., Lim, W. J. & other authors (2004).** Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 378-383.

- Skillman, L. C., Evans, P. N., Naylor, G. E., Morvan, B., Jarvis, G. N. & Joblin, K. N. (2004).** 16S ribosomal DNA-directed PCR primers for ruminal methanogens and identification of methanogens colonising young lambs. *Anaerobe* **10**, 277-285.
- Skillman, L. C., Evans, P. N., Strompl, C. & Joblin, K. N. (2006a).** 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* **42**, 222-228.
- Skillman, L. C., Toovey, A. F., Williams, A. J. & Wright, A.-D. G. (2006b).** Development and Validation of a Real-Time PCR Method To Quantify Rumen Protozoa and Examination of Variability between Entodinium Populations in Sheep Offered a Hay-Based Diet. *Applied Environmental Microbiology* **72**, 200-206.
- Smith, A. H., Zoetendal, E. & Mackie, R. I. (2005).** Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial Ecology* **50**, 197-205.
- Soliva, C. R., Hindrichsen, I. K., Meile, L., Kreuzer, M. & Machmuller, A. (2003).** Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis in vitro. *Letters in Applied Microbiology* **37**, 35-39.
- Springer, E., Sachs, M. S., Woese, C. R. & Boone, D. R. (1995).** Partial gene sequences for the A subunit of methyl-coenzyme M reductase (mcrI) as a phylogenetic tool for the family Methanosarcinaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 554-559.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M. & de Haan, C. (2006).** Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options: Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Stumm, C. K., Gijzen, H. J. & Vogels, G. D. (1982).** Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. *British Journal of Nutrition* **47**, 95.
- Swainson, N., Hoskin, S. O., Brookes, I. M. & Clark, H. (2010).** The sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique for methane emission estimation: Effect of rumen residence time of SF₆ permeation tubes in red deer. In *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*, pp. 104. Edited by E. J. McGeough & S. M. McGinn. Banff, Canada: Agriculture and Agri-Food Canada.
- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R. I. & Benno, Y. (2000).** Rumen Bacterial Community Transition During Adaptation to High-grain Diet. *Anaerobe* **6**, 273-284.
- Tajima, K., Aminov, R. I., 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 Environmental Microbiology* **67**, 2766-2774.
- Takenaka, A. & Itabashi, H. (1995).** Changes in the population of some functional groups of rumen bacteria including methanogenic bacteria by changing the rumen ciliates in calves. *The Journal of General and Applied Microbiology* **41**, 377-387.

- Talbot, G., Topp, E., Palin, M. F. & Massé, D. I. (2008).** Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic bioreactors. *Water Research* **42**, 513-537.
- Tatsuoka, N., Mohammed, N., Mitsumori, M., Hara, K., Kurihara, M. & Itabashi, H. (2004).** Phylogenetic analysis of methyl coenzyme-M reductase detected from the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology* **39**, 257-260.
- Tavendale, M. H., Meagher, L. P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. T. & Sivakumarab, S. (2005).** *Methane production from in vitro rumen incubations with Lotus pedunculatus and Medicago sativa, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis.* Amsterdam, PAYS-BAS: Elsevier.
- Thauer, R. K. (1998).** Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* **144** (Pt 9), 2377-2406.
- Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W. & Hedderich, R. (2008).** Methanogenic *Archaea*: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 579-591.
- Thivend, Fonty, G., Jouany, J. P., Durand, M. & Gouet, P. (1985).** Le fermenteur rumen. *Reproduction Nutrition Development* **25**, 729-753.
- Tisserand, J.-L. & Demarquilly, C. (1995).** Digestion et absorption dans le gros intestin. In *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion.* Edited by R. Jarrige & Y. Ruckebusch: Political Science.
- Tokura, M., Ushida, K., Miyazaki, K. & Kojima, Y. (1997).** Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbiology Ecology* **22**, 137-143.
- Tsai, Y.-L., Park, M. J. & Olson, B. H. (1991).** Rapid Method for Direct Extraction of mRNA from Seeded Soils. *Applied Environmental Microbiology* **57**, 765-768.
- Ungerfeld, E., Rust, S., Boone, D. & Liu, Y. (2004).** Effects of several inhibitors on pure cultures of ruminal methanogens. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 520-526.
- Ungerfeld, E. M., Kohn, R. A., Wallace, R. J. & Newbold, C. J. (2007).** A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *Journal of Animal Science* **85**, 2556-2563.
- Van Kessel, J. A. S. & Russell, J. B. (1996).** The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology* **20**, 205-210.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991).** Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**, 3583-3597.

- Váradyová, Z., Zelenák, I. & Siroka, P. (2000).** In vitro study of the rumen and hindgut fermentation of fibrous materials (meadow hay, beech sawdust, wheat straw) in sheep. *Animal Feed Science and Technology* **83**, 127-138.
- Vermorel, M. (1995).** Emissions annuelles de méthane d'origine digestive par les bovins en France. Variations selon le type d'animal et le niveau de production. *INRA Productions Animales* **8**, 265-272.
- Vermorel, M., Jouany, J.-P., Eugène, M., Sauvant, D., Noblet, J. & Dourmad, J.-Y. (2008).** Evaluation quantitative des émissions de méthane entérique par les animaux d'élevage en 2007 en France. *INRA Productions Animales* **21**, 403-418.
- Veysset, P., Lherm, M. & Bébin, D. (2010).** Energy consumption, greenhouse gas emissions and economic performance assessments in French Charolais suckler cattle farms: Model-based analysis and forecasts. *Agricultural Systems* **103**, 41-50.
- Vogels, G. D., Hoppe, W. F. & Stumm, C. K. (1980).** Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Applied Environmental Microbiology* **40**, 608-612.
- Waghorn, G. C. & Hegarty, R. S. (2010).** Lowering ruminant methane emissions through improving feed conversion efficiency. In *Greenhouse gases and animal agriculture*, pp. 108. Edited by E. J. McGeough & S. M. McGinn. Banff, Canada: Agriculture and Agri-Food Canada.
- Wagner, R. (1994).** The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Archives Microbiology* **161**, 100-109.
- Wallace, R. J. (2008).** Gut microbiology - broad genetic diversity, yet specific metabolic niches. *Animal* **2**, 661-668.
- Wanapat, M., Pilajun, R. & Kongmun, P. (2009).** Ruminal ecology of swamp buffalo as influenced by dietary sources. *Animal Feed Science and Technology* **151**, 205-214.
- Watanabe, T., Kimura, M. & Asakawa, S. (2009).** Distinct members of a stable methanogenic *Archaeal* community transcribe *mcrA* genes under flooded and drained conditions in Japanese paddy field soil. *Soil Biology and Biochemistry* **41**, 276-285.
- Weimer, P. J. (1998).** Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science* **76**, 3114-3122.
- Welkie, D. G., Stevenson, D. M. & Weimer, P. J. (2010).** ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe* **In Press, Corrected Proof**.
- Whitelaw, F. G., Eadie, J. M., Bruce, L. A. & Shand, W. J. (1984).** Methane formation in faunated and ciliate-free cattle and its relationship with rumen volatile fatty acid proportions. *British Journal of Nutrition* **52**, 261-275.

- Whitford, M. F., Teather, R. M. & Forster, R. J. (2001). Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. *BMC Microbiology* **1**, 5.
- Williams, A. G. & Coleman, G. S. (1997). The rumen protozoa. In *The rumen microbial ecosystem*, pp. 73-139. Edited by P. N. Hobson & C. S. Stewart. London: Blackie Academic & Professional.
- Williams, Y. J., Popovski, S., Rea, S. M., Skillman, L. C., Toovey, A. F., Northwood, K. S. & Wright, A.-D. G. (2009). A Vaccine Against Rumen Methanogens Can Alter The Composition Of Archaeal Populations. *Applied Environmental Microbiology*, AEM.02453-02408.
- Wina, E., Muetzel, S., Hoffmann, E., Makkar, H. P. S. & Becker, K. (2005). Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial activity and microbial community structure in vitro. *Animal Feed Science and Technology* **121**, 159-174.
- Wintzingerode, F. v., Ulf, B. G. & Erko, S. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* **21**, 213-229.
- Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 4576-4579.
- Wright, A.-D., Ma, X. & Obispo, N. (2008). Methanobrevibacter Phylotypes are the Dominant Methanogens in Sheep from Venezuela. *Microbial Ecology* **56**, 390-394.
- Wright, A.-D. G., Dehority, B. A. & Lynn, D. H. (1997). Phylogeny of the Rumen Ciliates Entodinium, Epidinium and Polyplastron (Litostomatea: Entodiniomorphida) Inferred from Small Subunit Ribosomal RNA Sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **44**, 61-67.
- Wright, A.-D. G. & Pimm, C. (2003). Improved strategy for presumptive identification of methanogens using 16S riboprinting. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 337-349.
- Wright, A.-D. G., Williams, A. J., Winder, B., Christophersen, C. T., Rodgers, S. L. & Smith, K. D. (2004a). Molecular Diversity of Rumen Methanogens from Sheep in Western Australia. *Applied Environmental Microbiology* **70**, 1263-1270.
- Wright, A.-D. G., Toovey, A. F. & Pimm, C. L. (2006). Molecular identification of methanogenic *Archaea* from sheep in Queensland, Australia reveal more uncultured novel *Archaea*. *Anaerobe* **12**, 134-139.
- Wright, A.-D. G., Auckland, C. H. & Lynn, D. H. (2007). Molecular Diversity of Methanogens in Feedlot Cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied Environmental Microbiology* **73**, 4206-4210.

- Wright, A. D. G., Kennedy, P., O'Neill, C. J., Toovey, A. F., Popovski, S., Rea, S. M., Pimm, C. L. & Klein, L. (2004b).** Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* **22**, 3976-3985.
- Xu, J. (2006).** INVITED REVIEW: Microbial ecology in the age of genomics and metagenomics: concepts, tools, and recent advances. *Molecular Ecology* **15**, 1713-1731.
- Yanagita, K., Kamagata, Y., Kawaharasaki, M., Suzuki, T., Nakamura, Y. & Minato, H. (2000).** Phylogenetic Analysis of Methanogens in Sheep Rumen Ecosystem and Detection of Methanomicrobium mobile by Fluorescence In Situ Hybridization. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 1737-1742.
- Yanez-Ruiz, D. R., Williams, S. & Newbold, C. J. (2007).** The effect of absence of protozoa on rumen biohydrogenation and the fatty acid composition of lamb muscle. *British Journal of Nutrition* **97**, 938-948.
- Yu, Z. & Morrison, M. (2004).** Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples, pp. 808-812: BioTechniques.
- Yu, Z., Garcia-Gonzalez, R., Schanbacher, F. L. & Morrison, M. (2008).** Evaluations of different hypervariable regions of *Archaeal* 16S rRNA genes in profiling of methanogens by *Archaea*-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology* **74**, 889-893.
- Yuchen Liu, W. B. W. (2008).** Metabolic, Phylogenetic, and Ecological Diversity of the Methanogenic *Archaea*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1125**, 171-189.
- Zhang, C. M., Guo, Y. Q., Yuan, Z. P., Wu, Y. M., Wang, J. K., Liu, J. X. & Zhu, W. Y. (2008).** Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora in vitro. *Animal Feed Science and Technology* **146**, 259-269
- Zhou, J. (2003).** Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 288-294.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E. & Guan, L. L. (2009).** Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 6524-6533.
- Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E. & Guan, L. L. (2010).** Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis. *Applied Environmental Microbiology* **76**, 3776-3786.
- Zoetendal, E. G., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. L., Abee, T. & de Vos, W. M. (2001).** DNA Isolation Protocols Affect the Detection Limit of PCR Approaches of Bacteria in Samples from the Human Gastrointestinal Tract. *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 405-410.

