



**HAL**  
open science

# Efficacité et mode d'action des bactéries propioniques et / ou lactiques pour prévenir l'acidose latente chez le ruminant

Abderzak Lettat

## ► To cite this version:

Abderzak Lettat. Efficacité et mode d'action des bactéries propioniques et / ou lactiques pour prévenir l'acidose latente chez le ruminant. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22120 . tel-00746197v2

**HAL Id: tel-00746197**

**<https://theses.hal.science/tel-00746197v2>**

Submitted on 28 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 DES SCIENCES DE LA VIE,  
SANTÉ, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

*N° d'ordre*

***Thèse***

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

***DOCTEUR D'UNIVERSITÉ***

***SPECIALITE : ECOLOGIE MICROBIENNE***

soutenue le 27 AVRIL 2011

PAR

***ABDERZAK LETTAT***

---

**EFFICACITE ET MODE D'ACTION DES BACTERIES  
PROPIONIQUES ET/OU LACTIQUES POUR PREVENIR  
L'ACIDOSE LATENTE CHEZ LE RUMINANT**

---

**Directeurs de thèse : Cécile MARTIN & Pierre NOZIERE**

**Président :** M. Gérard FONTY, Directeur de Recherches, CNRS

**Membres :** M. Howard SIMMINS, Directeur de Recherches, Danisco

Mme Marion BERNARDEAU, Chercheur Senior, Danisco

Mme Cécile MARTIN, Chargée de Recherches, INRA de Theix

M. Pierre NOZIERE, Directeur de Recherches, INRA de Theix

**Rapporteurs :** Mme Johanne CHIQUETTE, Chercheur Senior, AAC Canada

M. Philippe SCHMIDELY, Professeur, INRA-AgroParisTech

Préparée dans l'Equipe Digestion Microbienne et Absorption (DIMA)  
Unité de Recherches sur les Herbivores  
INRA centre Clermont-Ferrand / Theix

*A mes parents,*

*A mes sœurs et frères,*

*A ma femme Ahlem et ma fille Lyna,*

*A toute ma famille,*

*Pour votre amour, votre patience et vos encouragements ...*

## RESUME

L'acidose ruminale latente (ou acidose sub-clinique) est une préoccupation majeure pour la nutrition des ruminants à haut potentiel de production. Cet état se caractérise par une instabilité du microbiote et des fermentations ruminales qui s'orientent variablement vers le propionate et/ou le butyrate. L'une des stratégies de prévention de l'acidose latente consiste à distribuer dans l'alimentation des ruminants des probiotiques capables de rééquilibrer le microbiote et les fermentations ruminales (dans un sens favorable pour l'animal). L'analyse de la bibliographie montre toutefois que l'effet des probiotiques, et plus particulièrement des bactéries probiotiques (**BP**), est variable et parfois contradictoire ce qui serait probablement lié à l'instabilité du microbiote. Afin d'étudier la possibilité de prévenir l'acidose latente par les bactéries propioniques et/ou lactiques, nous avons émis l'hypothèse que leur efficacité dépend des orientations fermentaires dans le rumen. Des acidoses latentes butyrique et propionique caractérisées par des profils fermentaires et microbiens distincts ont été développées chez le mouton non productif et la vache laitière pour étudier l'effet et le mode d'action de la bactérie propionique P63 seule ou associée aux lactobacilles *Lb. plantarum* ou *Lb. rhamnosus* (P63, Lp + P63 et Lr + P63) sur le fonctionnement de l'écosystème ruminal et les performances animales.

Chez le mouton en situation d'acidose propionique, les BP utilisées ont amélioré le pH ruminal *via* une réduction de la proportion en lactobacilles. Chez la vache laitière, la stabilisation du pH a été associée à une moindre disponibilité en hydrogène susceptible d'être transformé en protons, suite à une augmentation de la propionogénèse et/ou de la densité bactérienne, deux voies consommatrices d'hydrogène. Au cours de l'acidose latente butyrique, l'amélioration du pH n'a été observée que chez les moutons supplémentés avec Lp + P63. Cet effet semblait être dû à une diminution des acides gras volatils et de la proportion en *S. bovis* mais aussi à un pH initial faible (pH < 5,5) probablement optimal pour l'action des BP ; ce qui n'était pas le cas chez les vaches pour lesquelles le pH initial était compris entre 5,9 et 6,1. En revanche, l'efficacité digestive a été augmentée par l'association de P63 aux lactobacilles chez la vache laitière. L'association Lp + P63 a augmenté les activités fibrolytiques (cellulase, xylanase) et la digestibilité de la matière organique, tandis que Lr + P63 a amélioré la digestion des fibres et a diminué la production de méthane de 25%. Nous n'avons pas observé d'effet sur les performances zootechniques, ce qui serait probablement dû au dispositif expérimental en carré Latin qui n'est peut-être pas optimal pour mettre en évidence l'effet des BP.

Nos résultats sont les premiers à démontrer l'efficacité des bactéries probiotiques pour sécuriser et/ou améliorer la digestion des rations et réduire la production de méthane chez le ruminant en acidose, et l'association de P63 avec les souches de *Lactobacillus* sont les plus efficaces. Enfin, nous avons validé notre hypothèse selon laquelle l'effet et le mode d'action des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose dépend des orientations fermentaires dans le rumen.

## ABSTRACT

Subacute ruminal acidosis (**SARA**) is a major concern for the nutrition of high-producing ruminants. This digestive disorder is characterized by the instability of the microbial ecosystem and fermentations which are oriented towards propionate and/or butyrate at the expense of acetate (propionic or butyric SARA). Among the strategies used to prevent SARA, supplementation with direct-fed microbials (**DFMs**) is thought to be able to balance the ruminal microbiota and fermentation. The analysis of the literature shows that the effect of DFMs, especially bacterial ones, is variable and sometimes contradictory which is probably related to the instability of the microbiota. To investigate the possibility of preventing SARA by propionibacteria and/or lactobacilli based DFMs, we hypothesized that their effectiveness depends on the ruminal fermentation patterns. Butyric and propionic SARA, characterized by distinct microbial and fermentation profiles, have been developed in non-productive sheep and lactating dairy cows to investigate the effects and mode of action of the *Propionibacterium* P63 alone or in conjunction with the lactobacilli strains *Lb. plantarum* or *Lb. rhamnosus* (P63, P63 and Lp + Lr + P63) on the ruminal ecosystem and animal performances.

During the propionic SARA induced in sheep, the DFMs used increased the ruminal pH with a concomitant reduction in the lactobacilli population. In dairy cows, the pH stabilization was associated with a lower availability of hydrogen capable of being transformed into protons, following a stimulation of propionogenesis and/or bacterial growth that consume hydrogen. During butyric SARA, improvement in pH was observed only in sheep supplemented with Lp + P63. This effect appeared to be due to a decrease in VFA production and *S. bovis* proportion. Moreover, the lower initial pH (pH <5.5) was probably optimal for DFMs action, which was not the case for the dairy cows for which the initial pH was between 5.9 and 6.1. For the dairy cows, diet digestion was improved when P63 and lactobacilli association were fed. Indeed, Lp + P63 increased the fibrolytic activities (cellulase, xylanase) and digestibility of organic matter, while Lr + P63 improved fiber digestion and decreased methane production by 25%. We did not observe any effect on animal performances, which was probably due to the Latin square design that is not the best to evaluate the DFMs effects on animal performances.

Our results are the first to demonstrate the effectiveness of bacterial DFMs to secure and/or improve diet digestion and reduce methane production in ruminants. Moreover, it seems that the association of P63 with the lactobacilli strains is more effective. Finally, we validated our hypothesis that the effect and mode of action of bacterial DFMs to prevent SARA is conditioned by ruminal fermentation patterns.

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

*N° d'ordre*

*Thèse*

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

***DOCTEUR D'UNIVERSITE***

***SPECIALITE : ECOLOGIE MICROBIENNE***

soutenue le 27 AVRIL 2011

PAR

***ABDERZAK LETTAT***

---

**EFFICACITE ET MODE D'ACTION DES BACTERIES  
PROPIONIQUES ET/OU LACTIQUES POUR PREVENIR  
L'ACIDOSE LATENTE CHEZ LE RUMINANT**

---

**Directeurs de thèse : Cécile MARTIN & Pierre NOZIERE**

**Président :** M. Gérard FONTY, Directeur de Recherches, CNRS

**Membres :** M. Howard SIMMINS, Directeur de Recherches, Danisco  
Mme Marion BERNARDEAU, Chercheur Senior, Danisco  
Mme Cécile MARTIN, Chargée de Recherches, INRA de Theix  
M. Pierre NOZIERE, Directeur de Recherches, INRA de Theix

**Rapporteurs :** Mme Johanne CHIQUETTE, Chercheur Senior, AAC Canada  
M. Philippe SCHMIDELY, Professeur, INRA-AgroParisTech

Préparée dans l'Equipe Digestion Microbienne et Absorption (DIMA)  
Unité de Recherches sur les Herbivores  
INRA centre Clermont-Ferrand / Theix

## LISTE DES PUBLICATIONS

### Articles primaires publiés ou soumis à des revues avec comité de lecture

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Berger C., Martin C. (2010) **Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep**. J. Anim. Sci. 88:3041-3046.

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Berger C., Martin C. **Direct-fed microbials minimize subacute ruminal acidosis but not lactic acidosis in sheep**. J. Anim. Sci. (soumis)

Lettat A., Martin C., Silberberg M., Morgavi D.P., Berger C., Nozière P. **Feeding propionibacteria and lactobacilli based direct-fed microbials to dairy cows to prevent subclinical ruminal acidosis: effects on rumen characteristics, diet digestibility, performances and methane output**. J. Dairy Sci. (En préparation).

Lettat A., Martin C., Nozière P. **Interêt des bactéries probiotiques dans l'alimentation des ruminants en situation d'acidose**. INRA Prod. Anim. (En préparation)

### Communications scientifiques lors de congrès nationaux et internationaux

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P. and Martin C. (2009). **Substrate oriented rumen fermentations in sheep during provoked acidosis**. XIth International Symposium on Ruminant Physiology. Pages 262-263, Clermont Ferrand, France. (Poster)

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P. and Martin C. (2009). **Acidose latente provoquée : un modèle expérimental pour la maîtrise des orientations fermentaires ruminales chez le mouton à l'entretien**. 3<sup>e</sup> Journées d'Animation du département PHASE. Page 81, Tours, France. (Poster)

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P. and Martin C. (2009). **Développement d'un modèle d'étude des mécanismes microbiens impliqués dans l'acidose latente**. Renc. Rech. Rum. 16:67. Paris, France. (Poster)

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Berger C., Martin C. (2010). **L'efficacité des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose dépend des fermentations microbiennes ruminales**. 7<sup>e</sup> Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois, 1 Avril 2010, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, France. (Présentation orale)

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P. and Martin C. (2010). **Etude des changements dans le microbiote ruminal associés aux acidoses lactique, propionique et butyrique chez le mouton.** Journées de l'Ecole Doctorale, 2 Mai 2010, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand, France. (Poster)

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Martin C. (2010) **Monitoring the rumen bacterial population changes during feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis in sheep.** 7<sup>th</sup> Roweth-INRA Symposium, June 23-25, Aberdeen, UK. (Poster)

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Martin C. (2010). **Monitoring rumen microbial population changes during feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis in sheep.** 13<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, August 22-27, Seattle, USA. (Poster)

Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Berger C., and Martin C. 2010. **L'efficacité des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose dépend des fermentations microbiennes ruminales.** Renc. Rech. Rum. 17:297. Paris, France. (Poster)



<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>2</b>
<b>1. Définition et critères d'évaluation de l'acidose ruminale latente</b> .....	<b>4</b>
1.1. <i>Définition</i> .....	4
1.2. <i>Critères d'évaluation : le pH ruminal</i> .....	5
<b>2. Prévalence et conséquences</b> .....	<b>6</b>
2.1. <i>Prévalence</i> .....	6
2.2. <i>Conséquences</i> .....	6
<b>3. Stratégies de prévention</b> .....	<b>8</b>
3.1. <i>Recommandations pour l'élaboration des rations</i> .....	8
3.2. <i>Prévention par l'utilisation d'additifs chimiques</i> .....	8
3.2. <i>Prévention par l'utilisation d'additifs biologiques</i> .....	10
<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>14</b>
<b>CHAPITRE 1 : EFFETS DES RATIONS ACIDOGENES SUR LA COMPOSITION ET L'ACTIVITE DU MICROBIOTE RUMINAL</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Comportement des communautés bactériennes</b> .....	<b>17</b>
1.1. <i>Au niveau du phylum</i> .....	18
1.2. <i>Au niveau fonctionnel</i> .....	19
1.2.1. <i>Les bactéries amylolytiques productrices et utilisatrices de lactate</i> .....	19
1.2.2. <i>Les bactéries cellulolytiques</i> .....	25
1.2.3. <i>Autres bactéries</i> .....	30
<b>2. Dynamique de la communauté des protozoaires ciliés</b> .....	<b>31</b>
<b>3. Production de molécules immunogènes</b> .....	<b>32</b>
<b>4. Conclusion : une vision trop simpliste du microbiote ruminal !</b> .....	<b>33</b>
<b>CHAPITRE 2 : UTILISATION DES PROBIOTIQUES EN ALIMENTATION ANIMALE</b> .....	<b>36</b>
<b>1. Les probiotiques</b> .....	<b>36</b>
1.1. <i>Historique et définitions</i> .....	36
1.2. <i>Réglementation</i> .....	38
1.2.1. <i>Notions QPS et GRAS</i> .....	38
1.2.2. <i>Critères de sélection</i> .....	41
1.2.3. <i>Classification des probiotiques en alimentation animale</i> .....	44
1.3. <i>Exemples d'applications chez le ruminant</i> .....	46
1.3.1. <i>Les levures probiotiques : prévention de l'acidose ruminale latente et amélioration des performances animales</i> .....	46
1.3.2. <i>Les bactéries probiotiques : amélioration de la santé animale</i> .....	48
1.4. <i>Les bactéries lactiques (LAB)</i> .....	50
1.4.1. <i>Les souches Lb. plantarum Lp-115 et Lb. rhamnosus Lr-32</i> .....	52
1.5. <i>Les bactéries propioniques (PAB)</i> .....	54
1.5.1. <i>La souche Propionibacterium P63</i> .....	56
<b>CHAPITRE 3 : INTERET DES BACTERIES PROBIOTIQUES DANS L'ALIMENTATION DES RUMINANTS EN SITUATION D'ACIDOSE</b> .....	<b>60</b>
<b>1. Amélioration des performances zootechniques</b> .....	<b>62</b>
1.1. <i>Vaches laitières</i> .....	62
1.2. <i>Bovins en croissance et à l'engrais</i> .....	63
<b>2. Prévention de l'acidose ruminale</b> .....	<b>65</b>
2.1. <i>Effets sur le pH ruminal</i> .....	65
2.2. <i>Effets sur les profils fermentaires</i> .....	66
2.3. <i>Effets sur le microbiote ruminal</i> .....	66

3. Conclusions .....	67
<b>HYPOTHESE ET STRATEGIE .....</b>	<b>74</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>78</b>
<b>Expérimentation 1: Développement d'un modèle expérimental, chez le mouton non productif, pour l'étude de l'acidose ruminale latente.....</b>	<b>80</b>
1. Article n°1 .....	82
<b>Expérimentation 2: Utilisation du modèle d'acidose pour étudier l'effet et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques pour réguler le microbiote et les fermentations ruminales chez le mouton non productif.....</b>	<b>90</b>
1. Article n°2 .....	94
<b>Expérimentation 3: Valider sur vache laitière en production l'efficacité et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques en conditions d'alimentation conventionnelle. ....</b>	<b>114</b>
1. Article n°3 .....	118
<b>DISCUSSION GENERALE.....</b>	<b>142</b>
<b>1. Développement et validation du modèle d'acidose latente chez le mouton non productif.....</b>	<b>144</b>
1.1. <i>Un modèle reproductible</i> .....	144
1.2. <i>Résistance et résilience de l'écosystème ruminal</i> .....	146
1.3. <i>Modes d'induction de l'acidose et orientations fermentaires</i> .....	147
<b>2. Relation entre profils fermentaires et dynamique du microbiote ruminal chez le ruminant en situation d'acidose.....</b>	<b>148</b>
2.1. <i>Acidose lactique</i> .....	148
2.2. <i>Acidose latente propionique</i> .....	150
2.3. <i>Acidose latente butyrique</i> .....	150
<b>3. Modulation du microbiote et des fermentations ruminales par les bactéries probiotiques.....</b>	<b>154</b>
3.1. <i>L'acidose lactique : situation de déséquilibre extrême</i> .....	154
3.2. <i>L'acidose latente propionique</i> .....	158
3.2.1. <i>Stabilisation du pH ruminal chez le mouton et la vache laitière</i> .....	158
3.3. <i>L'acidose latente butyrique</i> .....	160
3.3.1. <i>Stabilisation du pH ruminal chez le mouton et la vache laitière</i> .....	160
3.3.2. <i>Amélioration de la digestion chez la vache laitière</i> .....	162
<b>4. Amélioration de la production laitière .....</b>	<b>162</b>
<b>5. Diminution de la méthanogenèse.....</b>	<b>164</b>
<b>6. Adéquation entre type d'acidose et solution probiotique.....</b>	<b>166</b>
<b>7. Conclusion .....</b>	<b>167</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>170</b>
<b>1. Perspectives .....</b>	<b>172</b>
1.1. <i>Etudes complémentaires à court terme</i> .....	172
1.1.1. <i>Activité et structure de la communauté méthanogène</i> .....	172
1.1.2. <i>Colonisation du rumen par les bactéries probiotiques utilisées</i> .....	172
1.1.3. <i>Relation E. coli – acidose latente - inflammation</i> .....	173
1.2. <i>Etudes complémentaires à moyen terme : application des approches en 'omique' pour l'étude de l'écosystème ruminal</i> .....	173
1.2.1. <i>La métagénomique</i> .....	173
1.2.2. <i>La métabolomique</i> .....	174
1.3. <i>Etudes complémentaires à moyen ou long terme : expérimentations animales futures</i> .....	175

<b>ANNEXES.....</b>	<b>176</b>
1. Communication n°1 .....	178
2. Communication n°2.....	182
3. Communication n°3 .....	186
4. Communication n°4 .....	188
5. Communication n°5.....	190
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>194</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

- ADF : Acid Detergent Fiber  
ADL : Acid Detergent Lignin  
ADN (DNA) : Acide Désoxyribonucléique  
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
AGV (VFA) : Acides Gras Volatils/volatile Fatty acids  
ARNm : Acide Ribonucléique messenger  
ARNr : Acide Ribonucléique ribosomique  
BP : Bactéries Probiotiques  
CP : Crude Protein  
DFM : Direct-Fed Microbials  
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis  
EB (GE) : Energie Brute / Gross energy  
*mcrA* : Méthyle Coenzyme-M réductase A  
MO (OM) : Matière Organique / Organic Matter  
MS (DM) : Matière Sèche / Dry Matter  
MSI (DMI) : Matière Sèche Ingérée / Dry Matter Intake  
NDF : Neutral Detergent Fiber  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PL : Production Laitière  
qPCR : Quantitative PCR  
SC : *Saccharomyces cerevisiae*  
SCC : Somatic Cell Count / Nombre de cellules somatiques du lait  
TB : Taux Butyreux du lait  
TL : Taux de Lactose du Lait  
TP : Taux Protéique du lait  
UPGMA : Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Développement de l'acidose ruminale latente : modification des profils microbiens et fermentaires. ....	3
Figure 2. Cascade des événements à l'origine du développement d'une acidose et ses conséquences à l'échelle du rumen et de l'animal .....	7
Figure 3. Grille d'évaluation du risque d'acidose chez les bovins. ....	9
Figure 4. Coévolution des communautés amylolytiques et utilisatrices de lactate chez des bouvillons soumis à un challenge acidogène.....	21
Figure 5. Fluctuations des communautés amylolytiques et utilisatrices de lactate chez des moutons soumis à un régime acidogène: effet de la proportion et de la durée de maintien du régime.....	21
Figure 6. Représentation schématique de la mise en place d'un biofilm sur une particule végétale par des bactéries cellulolytiques.....	27
Figure 7. Digestion de la cellulose en fonction du pH.....	29
Figure 8. Mode d'action des probiotiques chez l'homme.....	37
Figure 9. Schéma décisionnel pour l'attribution du statut QPS pour un agent biologique donné .....	39
Figure 10. Mise en évidence d'une période de latence dans le mode d'action des leurres pour la prévention de l'acidose après une succession de challenges acidogènes chez le moutons. ....	45
Figure 11. Mode d'action des levures à l'échelle du rumen et de l'animal pour prévenir l'acidose latente et améliorer les performances zootechniques. ....	47
Figure 12. Représentation schématique des voies homo et hétérofermentaires chez les lactobacilles. ....	51
Figure 13. Métabolisme carboné chez <i>P. freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> .....	53
Figure 14. Séquence 16S de P63 et résultats d'alignement obtenu sur la base de données RDP.....	55
Figure 15. Relation entre production laitière et matière sèche ingérée chez des vaches laitières supplémentées en bactéries probiotiques seules ou associées à la levure <i>S. cerevisiae</i> . ....	69
Figure 16. Variation du pH ruminal en fonction du pH initial chez des bovins supplémentés en bactéries probiotiques seules ou associées à la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	73
Figure 17. Vitesse de dégradation in sacco de la matière sèche pour les 3 substrats utilisés dans notre modèle d'induction de l'acidose latente.....	81
Figure 18. Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour le développement du modèle d'acidose latente.....	81
Figure 19. Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour évaluer l'efficacité des bactéries probiotiques chez le mouton à l'entretien.....	91
Figure 20. Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour évaluer l'efficacité des bactéries probiotiques chez la vache laitière.....	115
Figure 21. Validation du modèle d'induction de l'acidose chez le mouton à l'entretien sur la base des paramètres fermentaires. ....	145
Figure 22. Relation entre pH ruminal et [AGV] sur les 3 challenges.....	145
Figure 23. Schéma simplifié des voies de dégradation et de fermentation des glucides par les microorganismes du rumen. ....	149
Figure 24. Effets des bactéries probiotiques sur les paramètres fermentaires et microbien du rumen chez le mouton en situation d'acidose lactique.....	155
Figure 25. Effets des bactéries probiotiques sur la résilience de l'écosystème ruminal chez le mouton en situation d'acidose lactique.....	155
Figure 26. Modulation de la communauté bactérienne et des fermentations ruminales par les bactéries probiotiques chez le mouton en situation d'acidose lactique.....	157
Figure 27. Effets des bactéries probiotiques sur le pH ruminal chez le mouton à l'entretien et la vache laitière en situation d'acidose latente propionique. ....	158

---

Figure 28. Effets des bactéries probiotiques sur les paramètres fermentaires et microbiens du rumen chez le mouton en situation d'acidose latente butyrique.....	159
Figure 29. Positionnement de nos résultats sur l'amélioration du pH ruminal par rapport aux données de la littérature. ....	161
Figure 30. Effets des bactéries probiotiques sur les activités fibrolytiques et la digestibilité de la ration chez la vache laitière en situation d'acidose latente butyrique. ....	161
Figure 31. Effets des bactéries probiotiques sur la production de méthane chez la vache laitière en situation d'acidose latente propionique ou butyrique. ....	163
Figure 32. Choix de la solution probiotique en fonction du type d'acidose latente. ....	165
Figure 33. Schéma général du mode d'action des bactéries probiotiques en fonction du type d'acidose latente. ....	167

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Résumé des stratégies de prévention de l'acidose latente chez le ruminant par l'utilisation d'additifs.	11
Tableau 2. Métabolisme (hydrolyse et fermentation) des principales espèces bactériennes ruminales.	15
Tableau 3. Effets des régimes acidogènes sur l'écosystème microbien ruminal.	16
Tableau 4. Effets des régimes acidogènes sur l'écosystème microbien ruminal (suite).	23
Tableau 5. Liste des microorganismes bénéficiant du statut QPS et GRAS	40
Tableau 6. Principales différences entre les probiotiques de 1 <sup>ère</sup> et 2 <sup>e</sup> génération utilisés en alimentation animale	41
Tableau 7. Liste microorganismes autorisés en France pour l'alimentation animale.	43
Tableau 8. Caractéristiques de <i>Lb. plantarum</i> Lp-115 et <i>Lb. rhamnosus</i> Lr-32	52
Tableau 9. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées la levure <i>S. cerevisiae</i> sur l'ingestion, la production et la composition de lait chez la vache laitière.	68
Tableau 10. Effet des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure <i>S. cerevisiae</i> sur les performances zootechniques des vaches laitières.	69
Tableau 11. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure <i>S. cerevisiae</i> sur la croissance des bovins.	70
Tableau 12. Effet des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure <i>S. cerevisiae</i> sur l'ingestion et la croissance des bovins en croissance et à l'engrais.	71
Tableau 13. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure <i>S. cerevisiae</i> sur le pH et les fermentations ruminales.	72
Tableau 14. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure <i>S. cerevisiae</i> sur le pH et les fermentations ruminales.	73
Tableau 15. Récapitulatif des expérimentations réalisées	77
Tableau 16. Caractéristiques des GRF utilisés pour le développement du modèle d'acidose latente.	80
Tableau 17. Paramètres fermentaires et microbiens du rumen 3h post-repas ou post- challenge chez les animaux en situation d'acidose et non supplémentés en bactéries probiotiques	151





## INTRODUCTION GENERALE

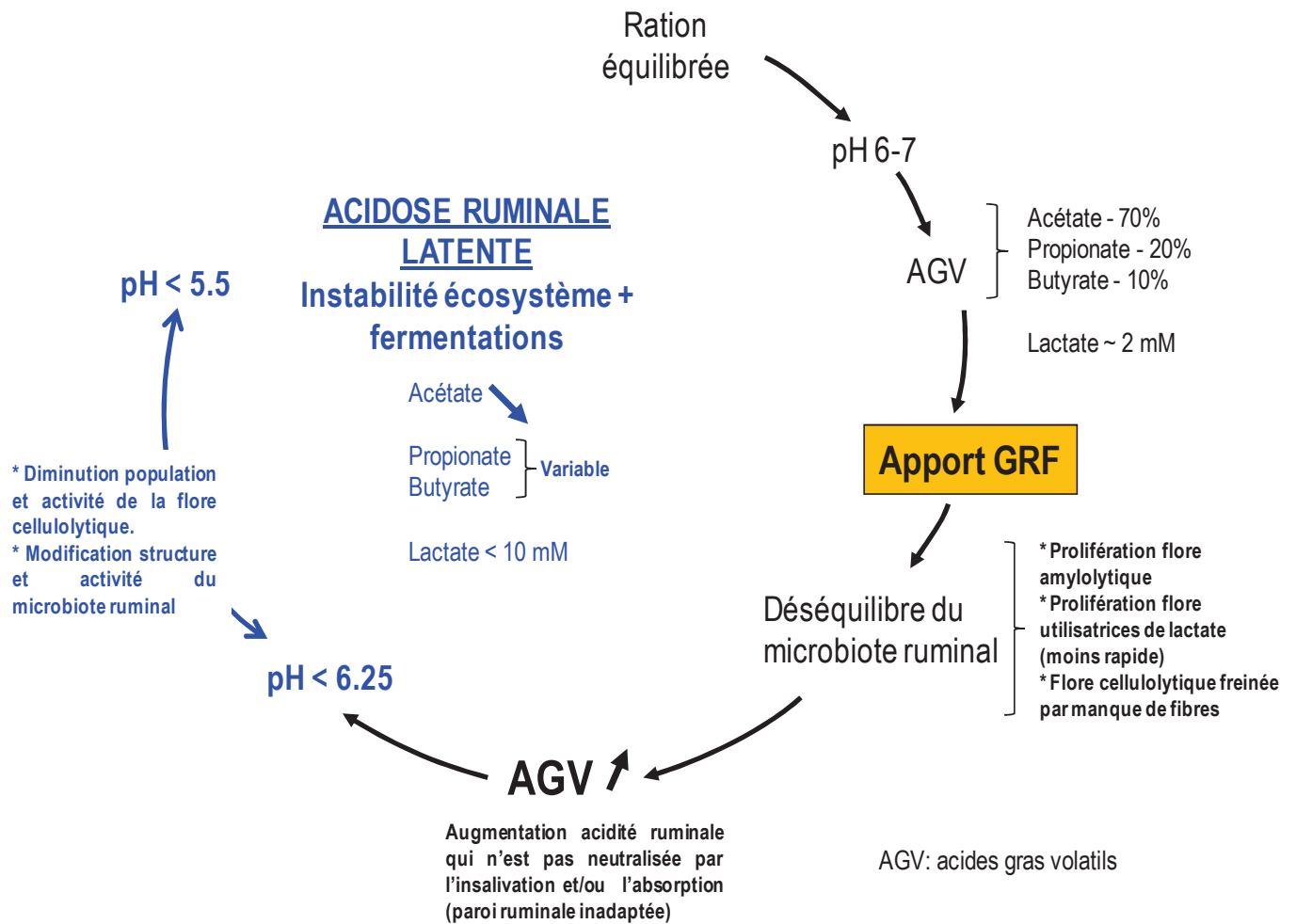


Figure 1. Développement de l'acidose ruminale latente : modification des profils microbiens et fermentaires.

## 1. Définition et critères d'évaluation de l'acidose ruminale latente

### 1.1. Définition

L'apparition de l'acidose ruminale latente (ou chronique, ou sub-clinique, aussi désignée sous le sigle de SARA : SubAcute Ruminal Acidosis) chez les ruminants à fort potentiel est la conséquence de l'intensification des conduites d'élevage du fait de l'utilisation de rations riches en glucides rapidement fermentescibles (**GRF**) et déficientes en fibres, afin de satisfaire les besoins élevés des animaux et augmenter les productions animales. Du point de vue microbiologique, ces régimes entraînent une modification du microbiote<sup>1</sup> ruminal en faveur des populations amylolytiques capables de dégrader l'amidon et de croître rapidement (Figure 1). Parallèlement au développement des bactéries amylolytiques, on assiste à une prolifération des bactéries utilisatrices de lactate, ce qui explique sans doute le fait que l'acidité ruminale soit due à l'accumulation des acides gras volatils (**AGV**) et non du lactate (Martin *et al.*, 2006 ; Nagaraja et Titgemeyer, 2007 ; Sauvant *et al.*, 2006). Les bactéries cellulolytiques qui dégradent les parois végétales sont particulièrement sensibles aux variations de pH, leur croissance et leur activité est fortement entravée pour des pH < 6 (Mouriño *et al.*, 2001). Habituellement, l'homéostasie ruminale est entre autre assurée par l'insalivation qui apporte des substances tampons neutralisant l'acidité ruminale, mais cette fonction est grandement diminuée par la faible fibrosité de ces rations qui réduisent le temps de mastication (Peyraud et Apper-Bossard, 2006). L'état d'acidose latente est caractérisé par des périodes de baisse du pH relativement courtes et modérées, mais qui peuvent se répéter plus ou moins fréquemment (Martin *et al.*, 2006), ce qui exacerbe le déséquilibre au sein du microbiote ruminal et se traduit par une instabilité des fermentations ruminales. En situation d'acidose latente, il est rapporté une réorientation des fermentations microbiennes vers le propionate (Bevans *et al.*, 2005 ; Commun *et al.*, 2009 ; Goad *et al.*, 1998 ; Gozho *et al.*, 2007), le butyrate (Brossard *et al.*, 2004 ; Doreau *et al.*, 2001 ; Harmon *et al.*, 1985), ou vers le propionate et le butyrate à la fois (Blanch *et al.*, 2009 ; Goad *et al.*, 1998 ; Khafipour *et al.*, 2009a). Au vu des orientations fermentaires décrites, on ne devrait donc plus parler **de l'acidose latente mais des acidoses latentes**. Le déterminisme de ces orientations reste difficile à prévoir par les modèles mécanistes du rumen (Offner et Sauvant, 2004), mais des approches empiriques ont récemment permis de progresser vers une meilleure prévision des profils fermentaires à partir des caractéristiques de la ration et du niveau d'ingestion (Lechartier, 2010 ; Nozière *et al.*, 2010).

---

<sup>1</sup> Microbiote : population de microorganismes vivant en accord avec son hôte.

## 1.2. Critères d'évaluation : le pH ruminal

La mesure du pH ruminal demeure l'outil le plus pertinent de diagnostic de l'état d'acidose même si un pH < 6 ne signifie pas obligatoirement que l'animal est en souffrance du fait de la différence de susceptibilité entre individus. Cependant, il n'y a actuellement aucun consensus sur la définition (du point de vue pH) de l'acidose latente et encore moins sur la valeur de pH seuil à partir de laquelle la santé et/ou les productions animales sont affectées (Plaizier *et al.*, 2008). Plusieurs critères ont été proposés pour apprécier l'état d'acidose chez les animaux : la valeur minimale comprise entre 5 et 5,5 (Bauer *et al.*, 1995), le pH ruminal moyen compris entre 5,5 et 6,25 (Sauvant *et al.*, 2004), ou alors l'utilisation de paramètres intégratifs tels que l'aire et le temps pendant lesquels le pH est en dessous d'une valeur physiologiquement acceptable (ex. pH < 5,6 pendant plus de 3h / jour ; Khafipour *et al.*, 2009a,b). Bien que la durée sous pH seuil puisse être différente à pH moyen égal, il a été montré que la durée pendant laquelle le pH < 6 était fortement corrélée au pH moyen (Dragomir *et al.*, 2008 ; Sauvant *et al.*, 1999). Un pH moyen ruminal de 6,25, correspondant à environ 4 h sous un pH de 6, a été proposé comme seuil de détermination de l'acidose latente (Sauvant *et al.*, 2004). Par ailleurs, selon le mode de prélèvement du contenu ruminal, les pH 5, 5,8 et 5,9 ont été proposés comme seuil lorsque l'échantillonnage est réalisé par ruminocentèse, *via* la canule ou par sonde œsophagienne (Duffield *et al.*, 2004). **A l'échelle du troupeau, le diagnostic et la prévention de l'acidose latente nécessitent d'établir des principes d'échantillonnage utilisant une procédure de prélèvement fiables (heure, site et technique de prélèvement) et un nombre d'individus statistiquement valide et applicable en pratique.** Par exemple, échantillonner (par ruminocentèse) un minimum de 12 animaux / troupeaux est nécessaire pour avoir des résultats statistiquement fiables en considérant comme seuil d'acidose un pH < 5,5 (Oetzel, 2004). Des améliorations doivent être apportées à cette démarche car si une réponse positive permettra d'agir rapidement sur le troupeau, une réponse négative n'exclut pas la présence d'individus souffrant dans le troupeau considéré.

**Le développement de pH-mètres miniaturisés pour animaux non canulés est une piste prometteuse en cours de développement (Dascor, Kahne, ...).** Par exemple, le Small Ruminant Ruminal pH Measurement System (Dascor, Escondido, CA) semble être efficace pour mesurer le pH ruminal (Penner *et al.*, 2009) ; cependant, ce pH-mètre miniaturisé doit être équipé d'un dispositif télémétrique pour être utilisable en élevage. Les sondes télémétriques développées par la société Kahne semblent actuellement les mieux adaptées mais la dérive du pH dans le temps constitue un réel problème qu'il faudra solutionner dans les versions à venir (Lin, 2009). Récemment, l'INRA et plus particulièrement l'Unité de Recherches sur les Herbivores (équipe DIMA) a apporté des améliorations notables à ce système qui est en cours de validation.

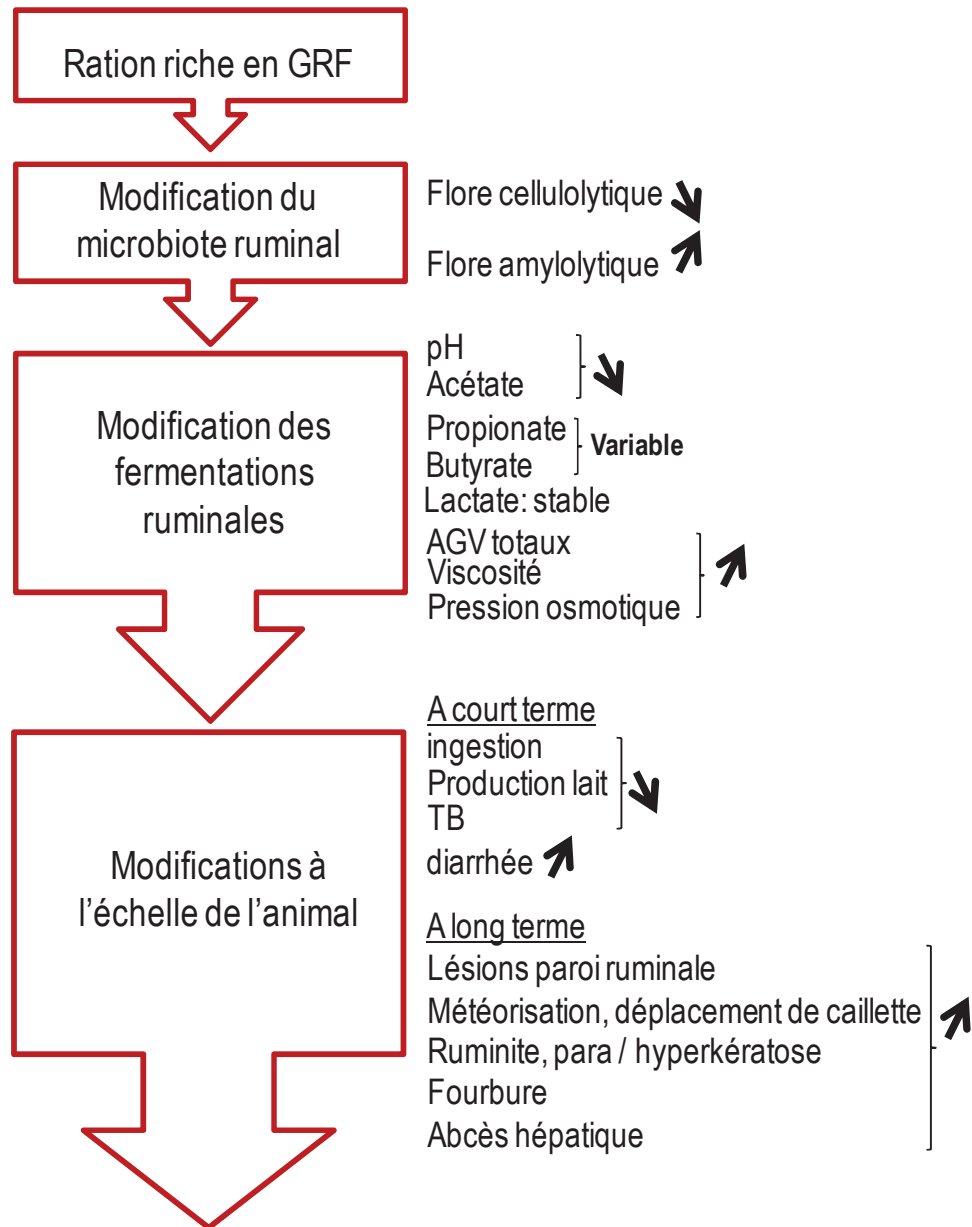
## 2. Prévalence et conséquences

### 2.1. Prévalence

Les périodes de transitions alimentaires, intervenant autour du vêlage pour les ruminants laitiers et lors de la mise à l'engrais des jeunes bovins, sont propices au développement de l'acidose latente car elles font intervenir de profonds changements quantitatifs et qualitatifs de la ration (Enemark, 2008 ; Martin *et al.*, 2006 ; Plaizier *et al.*, 2008). Concrètement, c'est la conséquence de l'inadaptation de l'écosystème ruminal à la digestion de régimes très digestibles, puisqu'il a été rapporté que l'adaptation de la muqueuse ruminale à ce type de régime prend entre quatre et six semaines, tandis que l'adaptation des micro-organismes nécessite environ trois semaines (Kleen *et al.*, 2003). En dehors de ces périodes à risque, l'acidose latente peut également survenir chez des animaux en production recevant des rations hautement énergétiques mais aussi chez des animaux au pâturage (O'Grady *et al.*, 2008) ou alimentés avec un fourrage riche en glucides solubles (Muenger *et al.*, 2010). Les études épidémiologiques sont rares et difficiles à réaliser, mais les données disponibles font état d'une importante prévalence de la pathologie dans les élevages. Au Danemark, une enquête menée auprès de vétérinaires et portant sur 325300 vaches laitières a montré que **22% des troubles de la digestion étaient dus à l'acidose latente** (Enemark et Jørgensen, 2001). Par ailleurs, **une étude réalisée sur 15 troupeaux aux USA a montré que 19% des vaches en début et 26% en milieu de lactation étaient atteintes d'acidose latente** (Garrett *et al.*, 1997 ; Plaizier *et al.*, 2008). **Dans la province du Friesland aux Pays-Bas, une étude sur plusieurs fermes incluant 197 vaches a montre que le stade de lactation n'avait pas d'effet sur l'acidose latente dont la prévalence moyenne était estimée à 18,8%** (Kleen *et al.*, 2009).

### 2.2. Conséquences

Chez la vache laitière, l'un des premiers signes de la pathologie est une **baisse et/ou une irrégularité de l'ingestion** (Fairfield *et al.*, 2007 ; Kleen *et al.*, 2003 ; Krause *et al.*, 2009 ; Peyraud et Apper-Bossard, 2006), mais ce n'est pas systématique. En plus de l'inconfort dû à l'acidité du rumen, (Krause *et al.*, 2009), la baisse de l'ingestion semble impliquer des phénomènes inflammatoires (Khafipour *et al.*, 2009a,b ; Weingarten, 1996). Lors d'une étude terrain incluant 500 vaches, il a été rapporté que l'acidose latente réduisait la production de lait (**PL**) de l'ordre de 2,7 kg/jr, le taux butyreux (**TB**) de 0,3% et le taux protéique (**TP**) de 0,12% (Stone, 1999). Plus récemment, il a été montré une réduction de la PL et du TB tandis que le TP a augmenté suite à une induction expérimentale de l'acidose (Khafipour *et al.*, 2009a,b ; Krause *et al.*, 2009). L'acidose latente affecte également la santé animale ; elle cause dans un premier temps des perturbations d'ordre digestif qui s'étendent au métabolisme pour engendrer ultérieurement des complications locomotrices et infectieuses (ruminite,



**Pertes estimées à 500 millions à 1 milliard \$ US / an**

Figure 2. Cascade des événements à l'origine du développement d'une acidose et ses conséquences à l'échelle du rumen et de l'animal

déplacement de caillette, fourbure, ...) qui sont observées plusieurs jours à plusieurs mois après l'épisode acidotique (Enemark, 2008 ; Martin *et al.*, 2006 ; Plaizier *et al.*, 2008). Les pertes économiques associées à l'acidose latente représenteraient 500 million à 1 milliard \$ US / an, et ces pertes sont principalement dues à une diminution de la production de lait, un taux de réforme élevé et une augmentation des abattages précoces et de la mortalité animale (Enemark, 2008). **De part sa prévalence et les pertes économiques qu'elle engendre, l'acidose latente est considérée comme une problématique majeure pour la nutrition des ruminants à fort potentiel de production.**

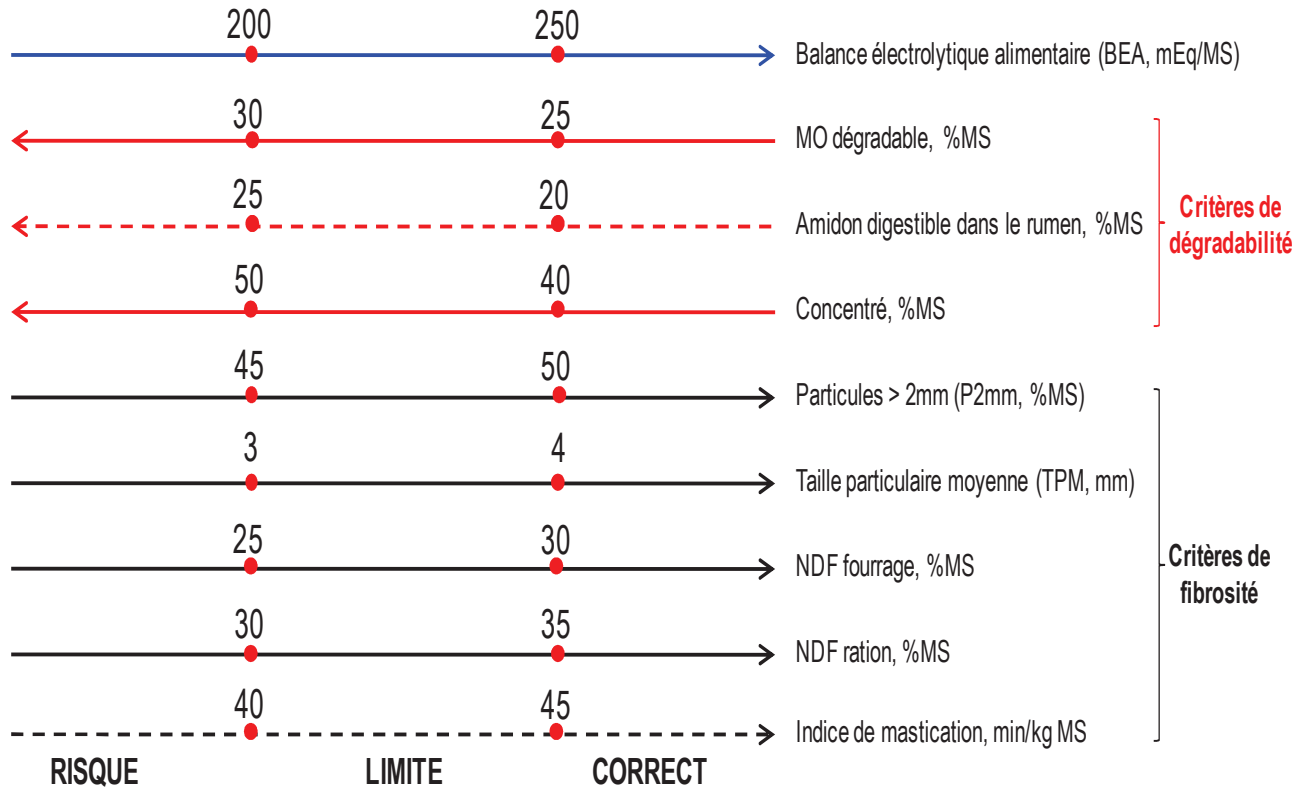
### 3. Stratégies de prévention

#### 3.1. Recommandations pour l'élaboration des rations

Il existe une relation directe entre l'alimentation, l'écosystème ruminal et l'apparition de l'acidose. Le point central lors de la formulation des rations, en accord avec les besoins de l'animal, consiste à permettre une adaptation progressive de l'écosystème ruminal et ne pas provoquer des modifications brusques aboutissant à l'acidose. L'utilisation de critères simples d'emploi pour évaluer le risque d'acidose dès la formulation permettrait de prévenir son apparition. Dans une revue récente (Sauvant et Peyraud, 2010), les auteurs ont analysé (par méta-analyse) les lois de réponses du pH aux facteurs affectant l'homéostasie acido-basique du rumen : critères de fibrosité (teneur en NDF, taille moyenne des particules, ...), critères de dégradabilité (proportion de concentré, teneur en MO dégradable, en amidon dégradable...) et balance électrolytique alimentaire ( $BEA = [Na^+] + [K^+] - [Cl^-]$  en mEq/kg MS) de la ration. Ce travail a permis de mettre en évidence, pour chacun de ces critères, des valeurs seuils (Figure 3) à recommander pour réduire le risque acidogène des rations en tenant compte d'une certaine marge de sécurité (Sauvant et Peyraud, 2010). Selon les auteurs, le risque d'acidose doit en effet être évalué sur différents indicateurs, à intégrer dans les logiciels de calcul des régimes (Sauvant et Peyraud, 2010).

#### 3.2. Prévention par l'utilisation d'additifs chimiques

Afin de minimiser le risque d'acidose chez les ruminants à haut niveau de production, les rations sont souvent supplémentées de tampons chimiques dans l'optique de maintenir un pH optimal voire même améliorer les performances animales. Il existe plusieurs substances tampons (**ST** ;  $NaHCO_3$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $MgO$ ,  $CaCO_3$ , ...) utilisées seules ou en association, mais les plus utilisées sont le bicarbonate et sescarbonates de sodium ( $NaHCO_3$ ,  $Na_2CO_3$ ) à une dose moyenne de 0,75% de la matière sèche. Dans leur méta-analyse, Meschy *et al.* (2004) ont regroupé 40 publications (178 traitements) dans lesquelles l'ensemble des tampons cités au dessus ont été utilisés dans des proportions comprises



Commentaires : Les critères difficilement mesurables en pratique sont figurés en pointillés.

Figure 3. Grille d'évaluation du risque d'acidose chez les bovins (d'après Sauvart et Peyraud, 2010).



entre 0 et 2,5% de la matière sèche. Au niveau ruminal, la supplémentation a été accompagnée d'une augmentation du ratio acétate/propionate et du pH ruminal (+ 0,07 unité pH par % de ST) et ce d'autant plus que le pH initial est bas. De plus, les ST ont augmenté l'ingestion (+ 0,51 de MS kg/jr), la production laitière (+ 0,52 kg/jr) et le taux butyreux (+ 1,5 g/kg de lait). Intra-expérience la digestibilité de l'ADF et du NDF a été augmentée de 2,64 et 1,36% respectivement. Du point de vue mécanistique, la stabilisation du pH ruminal serait due à la capacité des ST à neutraliser les protons (Le Ruyet et Tucker, 1992). A cela s'ajoute une augmentation de l'ingestion d'eau et du taux de dilution du liquide ruminal qui entrainerait un déplacement du site de digestion de l'amidon vers le duodénum (Marden *et al.*, 2008 ; Russell et Chow, 1993).

### 3.2. Prévention par l'utilisation d'additifs biologiques

La dénomination « additifs biologiques » comprend les enzymes, les levures/champignons et les bactéries probiotiques ; mais dans le cadre de ce travail, nous nous consacrerons aux additifs vivants. Dans le but de prévenir l'acidose latente, les levures sont de loin les plus utilisées avec des effets globalement positifs sur le pH ruminal et les performances zootechniques (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010 ; Desnoyers *et al.*, 2009) et ce *via* la modulation du microbiote et des fermentations ruminales (Table 1). Comparativement aux levures, les bactéries, et plus particulièrement celles d'origine ruminale, pourraient s'adapter à l'environnement très compétitif du rumen pour a terme moduler positivement les fermentations et le microbiote ruminal. **De ce fait l'utilisation des bactéries probiotiques constitue un nouveau champ de recherche particulièrement intéressant.**

Au cours d'essais *in vitro* menés par la société Danisco, une augmentation du pH d'un jus de rumen acidifié par un enrichissement en lactate a été observée suite à l'addition de la bactérie propionique *Propionibacterium* P63 seule ou associée aux bactéries lactiques *Lb. plantarum* Lp-115 et *Lb. rhamnosus* Lr-32. Lors d'essais complémentaires simulant l'induction de l'acidose par l'addition d'amidon dans le jus de rumen, des effets significatifs de P63 seule ou associée aux bactéries lactiques ont été observés sur le profil fermentaire. Ces résultats encourageants ont fait l'objet du dépôt de deux Enveloppes Soleau et sont par ailleurs complémentaires des effets *in vivo* sur la réduction de l'acidose observés chez des veaux nouvellement sevrés et ayant fait l'objet d'un dépôt de brevet aux USA (Rehberger *et al.*, 2002). Ainsi, la société Danisco et l'équipe DIMA (Digestion Microbienne et Absorption) de l'Unité de Recherche sur les Herbivores (INRA Theix) ont décidé d'entreprendre un programme de recherche commun dans le cadre d'une convention CIFRE<sup>2</sup> afin **d'étudier *in vivo***

<sup>2</sup> CIFRE : Convention Industrielle de Formation par la Recherche (<http://www.anrt.asso.fr/>).

Substances tampons	Levures / champignons	Bactéries probiotiques
Très étudié	Très étudié	En cours d'évaluation
Bicarbonate de sodium Magnésie Limestone	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Propionibacterium</i> ( <i>P. freudenreichii</i> ) <i>Megasphaera</i> ( <i>M. elsdenii</i> ) <i>Enterococcus</i> ( <i>E. faecium</i> )
Effets positifs sur pH ruminal et zootechnie (ingestion, digestion, lait)	Effets positifs sur pH ruminal et zootechnie (ingestion, digestion, lait)	Paramètre ruminiaux ? Effets positifs sur production laitière et réduction du portage de pathogènes
<b>Action chimique :</b> Neutralisation protons	<b>Action biologique :</b> modulation du microbiote et des fermentations ruminales, amélioration de l'anaérobiose par consommation oxygène.	<b>Mécanismes non élucidés</b>
Meschy <i>et al.</i> , 2004 ; Marden <i>et al.</i> , 2008	Desnoyers <i>et al.</i> , 2009 ; Chaucheyras-Durand et Durand, 2010	Chiquette, 2009 ; Lehloenya <i>et al.</i> , 2008b ; Nocek <i>et al.</i> , 2002, 2003 ; Younts-Dahl <i>et al.</i> , 2004, 2005

**Tableau 1. Résumé des stratégies de prévention de l'acidose latente chez le ruminant par l'utilisation d'additifs.**

**l'efficacité et le mode d'action des bactéries propioniques et/ou lactiques pour prévenir les risques d'acidose latente chez le ruminant.** D'un point de vue mécanistique, l'objectif était de mieux caractériser les modifications de l'écosystème microbien ruminal induites par ces probiotiques, et à les mettre en relation avec les modifications des orientations fermentaires.

La synthèse bibliographique de cette thèse sera découpée en trois chapitres. Le premier sera consacré à l'effet des perturbations nutritionnelles (rations acidogènes) sur la composition, l'activité et la diversité du microbiote ruminal. Dans le second, après une introduction à la réglementation qui régit l'utilisation des additifs microbiens en alimentation animale, nous détaillerons plus particulièrement les applications des levures et des bactéries probiotiques en tant qu'additif microbien dans l'alimentation des ruminants. Enfin, le troisième lors du dernier chapitre sera consacré à une analyse quantitative de la littérature portant sur l'effet des bactéries probiotiques sur l'écosystème ruminal et les performances zootechniques.



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE





## CHAPITRE 1 : EFFETS DES RATIONS ACIDOGÈNES SUR LA COMPOSITION ET L'ACTIVITÉ DU MICROBIOTE RUMINAL

Malgré son rôle central dans le déterminisme des fermentations ruminales, le microbiote ruminal n'a été que très peu étudié en situation d'acidose latente. Pourtant il y a un réel intérêt à identifier des espèces ou des groupes bactériens clés impliqués dans les différentes orientations fermentaires lors de l'acidose ; surtout depuis que l'étude de l'écosystème ruminal est rendue possible par le développement des méthodes métagénomiques (Brulc *et al.*, 2009 ; Galbraith *et al.*, 2004) et métabolomiques (Ametaj *et al.*, 2010) donnant une image globale du microbiote et des produits de fermentations.

**Bien que l'utilisation de rations riches en GRF se soit pas synonyme de situation d'acidose, nous avons rassemblé les rares données traitant de l'effet de l'apport de GRF dans la ration sur les bactéries, les protozoaires et leurs produits de fermentation afin d'apporter des éléments de réponse sur la dynamique du microbiote ruminal, et si possible de mettre en évidence des espèces ou des groupes clés qui pourraient révéler le statut acidotique de l'animal.** Dans un souci de compréhension un tableau récapitulatif des principales bactéries hydrolytiques et fermentatives du rumen a été réalisé (Tableau 1) : on distingue des espèces très spécialisées occupant des niches écologiques<sup>3</sup> étroites (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Succiniclasticum ruminis*,...) et d'autres moins spécialisées (*Butyrivibrio fibrisolvens*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, ...) occupant une gamme plus large de niches écologiques, capables d'hydrolyser et de fermenter une large gamme de substrats. Les données qui seront présentées ici sont issues pour la majorité de travaux utilisant des techniques de biologie moléculaire qui permettent une meilleure estimation de la diversité microbienne du rumen, par opposition aux méthodes culturales (Tableau 2 et 3). Pour les bactéries, nous présenterons l'effet de l'apport de GRF dans la ration selon différents niveaux d'approche en partant du phylum, jusqu'à l'espèce en passant par les différents groupes fonctionnels du rumen (métabolisme du lactate, cellulolyse).

### 1. Comportement des communautés bactériennes

Sur les 15 études recensées, la quantification des microbes a été réalisée soit sur de la phase liquide (PL ; n=8), la phase solide (PS ; n=1) ou du contenu ruminal total (CT ; n=6). Il est important de

<sup>3</sup> Niche écologique : place occupée par une espèce dans un écosystème. Le terme désigne aussi bien l'habitat de l'espèce que le rôle qu'elle joue sur le plan trophique (substrats hydrolysés et/ou fermentés).



connaître le site d'échantillonnage car les bactéries de la phase liquide (PL) ne représentent que 25% de la biomasse bactérienne totale (Forsberg et Lam, 1977).

### 1.1. Au niveau du phylum

A l'état d'équilibre, que ce soit pour des régimes riches en fourrage ou en GRF, **le microbiote ruminal est dominé par 2 phyla** qui sont les **Firmicutes** (15 à 95%) composé des principales bactéries cellulolytiques, lipolytiques, amylolytiques productrices et utilisatrices de lactate (*R. albus*, *R. flavefaciens*, *A. lipolytica*, *E. ruminantium*, *S. ruminantium*, *B. fibrisolvens*, *S. bovis*, *Lactobacillus* spp., *M. elsdenii*) et les **Bacteroidetes** (3,9 à 67%) comprenant essentiellement le genre *Prevotella* (*P. ruminicola*, *P. brevis*, *P. bryantii* et *P. albensis*). On retrouve également en proportions plus faibles les phyla **Proteobacteria** (0,89 à 27%) comprenant les espèces *R. amylophilus*, *S. dextrinosolvans* et *E. coli* ; les **Spirochaetes** (0 à 3,54%) représentés par *T. bryantii* et enfin les **Fibrobacteres** (0,29 à 3,06%) comprenant l'espèce *F. succinogenes*. **D'une manière générale, l'écosystème ruminal contient plus de Firmicutes que de Bacteroidetes** (Ozutsumi *et al.*, 2005 ; Tajima *et al.*, 2000 ; Whitford *et al.*, 1998), même si l'inverse a déjà été observé dans du contenu ruminal total (Fernando *et al.*, 2010 ; 40% de foin + 60% de GRF) ou dans la fraction liquide chez des bouvillons (Kocherginskaya *et al.*, 2001 ; 100% de foin ou 28% de foin + 72% de GRF). Les variations considérables dans la proportion des différents phyla peuvent être non seulement expliquées par des différences dans les espèces animales, les régimes, mais également par des effets méthodologiques liés à l'extraction des acides nucléiques, aux conditions d'amplification par PCR (amorces, enzymes, températures, nombre de cycles, ...) et aux banques de clones. **A cela s'ajoute également la forte variabilité inter-individu qui peut être supérieure à l'effet des traitements expérimentaux, et qui peut atteindre 40%** (Larue *et al.*, 2005 ; Weimer *et al.*, 1999).

Seules les données de Khafipour *et al.* (2009c) chez la vache laitière reflètent la composition du microbiote ruminal en conditions d'acidose avérée, provoquée par un apport plus ou moins important de céréale (acidose modérée ou sévère), ou de granulés de luzerne (durée de pH < 5.6 de 217, 337 et 510 min/jour, respectivement). A notre connaissance, c'est la seule étude dans laquelle l'acidose est étudiée de manière globale avec des données sur les paramètres fermentaires (pH, AGV et lactate), microbiens (structure, dynamique et diversité), et même inflammatoires (LPS, haptoglobine). A l'aide des données TRFLP<sup>4</sup> permettant l'étude de la structure, la dynamique et la diversité du microbiote ruminal, les auteurs ont détecté la présence de 9 phyla : *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*,

<sup>4</sup> TRFLP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism ; méthode moléculaire permettant l'identification d'espèces bactériennes en fonction de la taille des fragments d'ADN (un fragment = une espèce).

*Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *TM7*, *Tenericutes* et *Deinococcus* ; cependant 98% des bactéries ruminales détectées appartenaient à seulement 3 Phyla (*Firmicutes*, *Bacteroidetes* et *Proteobacteria*). Ils ont observé que l'induction d'une acidose sévère par des céréales ou par des granulés de luzerne s'est accompagnée d'une augmentation de la proportion de *Firmicutes* (de 70,8 à 79,7% et de 31 à 61,5%, respectivement) et d'une diminution de la proportion de *Bacteroidetes* (de 24,3 à 16,5 et 66,4 à 36,4%, respectivement), alors que l'induction d'une acidose modérée par les céréales ne s'est pas traduite par des variations des phyla (Tableau 2). Les variations des profils de phyla plus marquées avec les granulés de luzerne s'accompagnaient également de variations de pH plus importantes, ce qui suggère une relation entre la sévérité de l'acidose (du point de vue pH) et les proportions respectives des phyla les plus représentés, *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. Ces résultats indiquent clairement que **certaines conditions d'acidose (acidose modérée ici) ne peuvent être systématiquement associées à une modification du microbiote ruminal sur la base du phylum et qu'il faut par conséquent chercher des indications à une échelle plus fine (genre et espèce)**. Par ailleurs, suite à une augmentation massive de GRF (de 25% à 96%), Tajima *et al.* (2000) ont également observé une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* après 28 jours sur le régime acidogène, mais ont mis en évidence l'existence d'une **étape de transition** (3 jours après le changement de régime) au cours de laquelle **le microbiote, du fait de la disparition des ruminocoques cellulolytiques, est déséquilibré en faveur des *Bacteroidetes* et en particulier des *Prevotelles* qui constituaient 15% de la flore totale.**

L'apparition de l'acidose latente semble s'accompagner d'une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes*, mais ces variations ne sont pas systématiques, en particulier en situation d'acidose latente modérée. L'amplitude des variations des différents phyla pourrait être liée à celles du pH.

## 1.2. Au niveau fonctionnel

### 1.2.1. Les bactéries amylolytiques productrices et utilisatrices de lactate

Contrairement à l'acidose lactique au cours de laquelle le microbiote ruminal est fortement déséquilibré au profit des bactéries amylolytiques productrices de lactate *S. bovis* et *Lactobacillus* spp. (Nagaraja et Titgemeyer, 2007), les choses ne sont pas aussi claires pour l'acidose latente où l'écosystème ruminal est instable et connaît des fluctuations importantes comme rapporté par (Mackie et Gilchrist, 1979). Les études anciennes utilisant des méthodes culturales pour identifier les

microorganismes (Goad *et al.*, 1998 ; Mackie et Gilchrist, 1979 ; Mackie *et al.*, 1978 ; Olumeyan *et al.*, 1986) ont montré une augmentation des communautés amylolytiques et utilisatrices de lactate lors de l'acidose latente. Ces résultats sont en accord avec les données moléculaires récentes qui montrent une prédominance des *Firmicutes* auxquels sont affiliées les principales bactéries amylolytiques et/ou productrices de lactate (**BAPL** ; *Lactobacillus ruminis*, *S. bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Mitsuokella multiacida*, *Selenomonas ruminantium*, ...) et utilisatrices de lactate (**BUL** ; *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*, *Succinoclasticum ruminis*, *Veillonella alcalescens*, *Eubacterium limosum*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, ...).

Trois jours après la transition alimentaires (96% GRF), Tajima *et al.* (2000 et 2001) ont observé une augmentation dans la proportion des BAPL *B. fibrisolvens* (6,9%) et *Lactobacillus ruminis* (8,6%), des BUL formées par le groupe *Selenomonas-Succinoclasticum-Megasphaera* (16%) et des Prevotelles (15%, Tableau 2). De plus la quantification en PCR a révélé une importante augmentation de *S. bovis* (x 67) comparé au premier jour de l'essai (J0, 25% GRF). Après 28 jours de maintien du régime acidogène (J28), le groupe *Selenomonas-Succinoclasticum-Megasphaera* représentait jusqu'à 46% du microbiote ruminal (Tajima *et al.*, 2000), ce qui montre que l'adaptation au régime acidogène s'accompagne d'une prolifération des BUL. Ceci confirme les observations de Goad *et al.* (1998), qui ont rapporté que l'augmentation des BAPL, et surtout des BUL, était plus importante chez les animaux passant de 80 à 100% de maïs que chez ceux passant de 20 à 100% de maïs (Figure 4). Cependant, comme cela a été observé par Mackie et Gilchrist (1979), cette augmentation n'est pas linéaire et connaît des fluctuations importantes (Figure 5) malgré un pH moyen stable (5.75 à 5.80). **Comme l'ont déjà montré les techniques culturales, les outils de biologie moléculaire confirment donc que l'apparition de l'acidose s'accompagne d'une prolifération des BAPL et des BUL.**

#### → Les BAPL clés

Au sein de la communauté des BAPL, les données sont contrastées quant aux espèces bactériennes pouvant être impliquées dans le développement de l'acidose latente. Ainsi, alors que la majorité des données obtenues à l'aide des techniques culturales (Goad *et al.*, 1998 ; Mackie *et al.*, 1978) et moléculaires (Brossard *et al.*, 2004 ; Brossard *et al.*, 2006 ; Fernando *et al.*, 2010 ; Stevenson et Weimer, 2007 ; Tajima *et al.*, 2000) n'ont pas révélé de changement dans la proportion de *S. bovis* ; d'autres études ont montré une augmentation (Khafipour *et al.*, 2009c ; Krause *et al.*, 2003 ; Tajima *et al.*, 2001) pouvant atteindre 67 fois son taux initial (Tajima *et al.*, 2001). **Bien que *S. bovis* ait été considéré jusque là comme l'agent initiateur de l'acidose** du fait de son temps de génération très

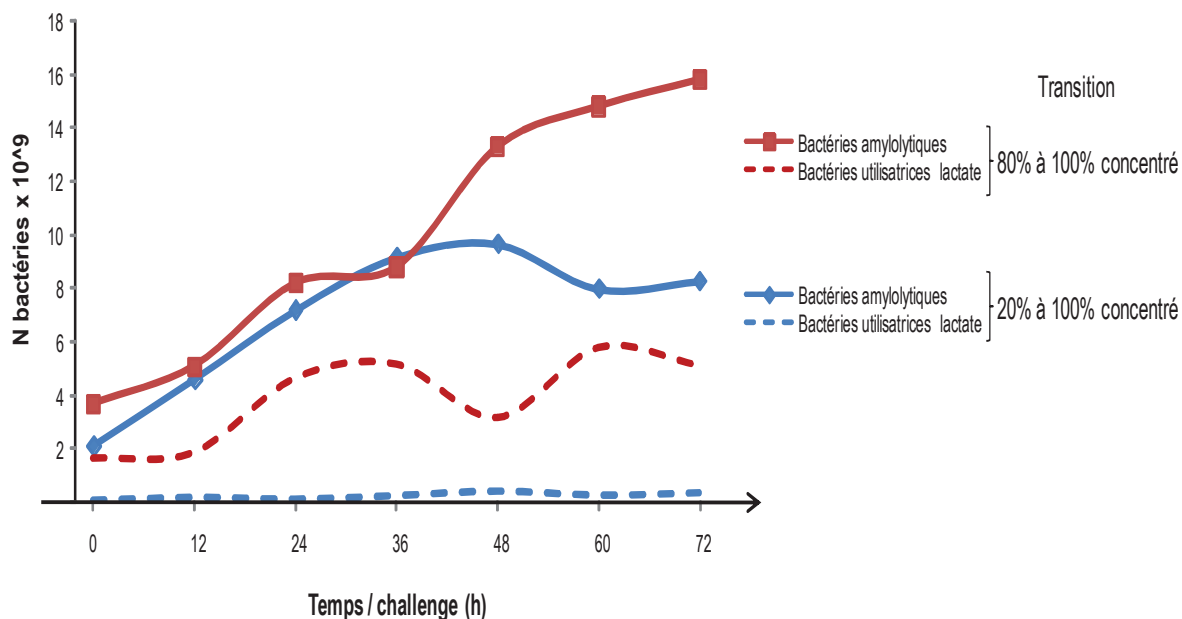


Figure 4. Coévolution des communautés amylolytiques et utilisatrices de lactate chez des bouvillons soumis à un challenge acidogène (d'après Goad *et al.*, 1998).

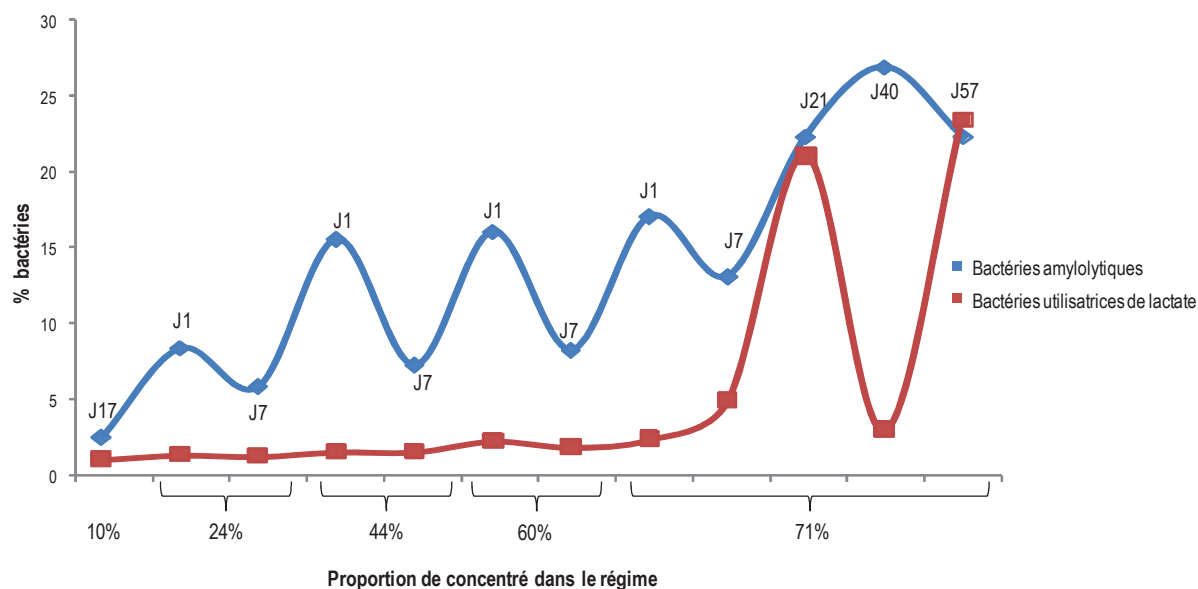


Figure 5. Fluctuations des communautés amylolytiques et utilisatrices de lactate chez des moutons soumis à un régime acidogène : effet de la proportion (10 à 71%) et de la durée de maintien (J1 à J57) du régime (d'après Mackie et Gilchrist., 1979).

court (12 min) et d'une forte activité amylasique qui favorise la prolifération des lactobacilles à des pH plus acides (Coe *et al.*, 1999 ; Goad *et al.*, 1998 ; Mackie *et al.*, 1978 ; Nagaraja et Titgemeyer, 2007 ; Sun *et al.*, 2010), les données disponibles ont montré que l'augmentation de la communauté des BAPL lors de l'acidose latente était due à la prolifération des lactobacilles (Goad *et al.*, 1998 ; Khafipour *et al.*, 2009c ; Krause *et al.*, 2003 ; Mackie *et al.*, 1978 ; Tajima *et al.*, 2000), de *S. ruminantium*, *M. multiacida* et *B. fibrisolvans* (Tajima *et al.*, 2000). Récemment à l'aide de techniques moléculaires, l'espèce *Pediococcus acidilactici* a également été isolée du rumen d'animaux en situation d'acidose (Cobos *et al.*, 2011). Parce que *P. acidilactici* a été isolée sur un milieu utilisé pour *S. bovis* et que ses caractéristiques phénotypiques sont similaires de celles de *S. bovis*, les auteurs pensent que son identification par les techniques culturales a été jusque là confondue avec *S. bovis*. *P. acidilactici* jouerait donc un rôle important dans l'initiation de l'acidose alors que ***S. bovis*** constituerait un agent aggravant de l'acidose. Cette hypothèse semble cohérente avec les données récentes obtenues par biologie moléculaire associant *S. bovis* à la seule forme sévère de l'acidose latente (Khafipour *et al.*, 2009c). Concernant l'établissement des lactobacilles, il a été montré chez la vache alimentée avec 80% de GRF que leur capacité à proliférer n'est pas seulement due à leur acido-résistance mais aussi à la production de bactériocines par les lactobacilles inhibant la croissance des autres bactéries dont celle de *S. bovis* (Wells *et al.*, 1997). **D'après ces données, *P. acidilactici* et les lactobacilles seraient impliqués dans l'apparition de l'acidose latente tandis que *S. bovis* constituerait un agent aggravant faisant évoluer cette pathologie digestive vers des formes plus sévères.**

#### → Les BUL clés

Parmi les espèces formant la communauté des BUL, on retrouve *Succiniclaticum ruminis*, *Selenomonas ruminantium* et *M. elsdenii*. Incapable de dégrader les polymères végétaux, *M. elsdenii* a besoin des autres bactéries amylolytiques et cellulolytiques pour croître. Malgré sa capacité à fermenter le maltose, le saccharose, le glucose et le fructose, *M. elsdenii* a une plus grande affinité pour le lactate, et il est rapporté qu'elle fermente 60 à 80% du lactate ruminal (Counotte *et al.*, 1981) pour produire essentiellement de l'acétate, du propionate et du butyrate (Marounek *et al.*, 1989). Ceci est probablement dû à son acido-résistance et au fait que sa fermentation du lactate n'est pas soumise à la répression catabolique<sup>5</sup> par le glucose ou le maltose (Hino *et al.*, 1994). Par ailleurs, *M. elsdenii* est la seule bactérie ruminale à **produire du propionate à partir du lactate via la voie acrylate** (Hino et Kuroda, 1993). En utilisant des sondes oligonucléotidiques spécifiques de l'ARN ribosomal

<sup>5</sup> Répression catabolique : répression de certains opéron impliqués dans l'utilisation de sucres (ex : opéron lactose) en faveur de l'utilisation du glucose lorsque ce dernier est la source prédominante de carbone dans l'environnement de la bactérie. Dans le cas présent *M. elsdenii* peut utiliser préférentiellement le lactate même si du glucose est disponible.

	Ratio Fourrage:Concentré du régime	Especie animale	Methode d'étude du microbiote	pH moyen	Bactéries totales (x 10 <sup>10</sup> )	% Bactéries amylolytiques (BA)	% Bactéries utilisatrices de lactate (BUL)	% Bactéries cellulolytiques	Protozoaires (x 10 <sup>5</sup> /ml)	Amylase	Carboxyméthylcellulase	Xylanase	Avecelase	
Cantalapiedra-Hijar <i>et al.</i> , 2008	70F : 30C (foin d'herbe)	Caprins	comptage	6.43					5.83					
	30F : 70C (foin d'herbe)			6.21					12.8					
	70F : 30C (foin de luzerne)			6.43						6.75				
	30F : 70C (foin de luzerne)			6.26						13.3				
Ghorbani <i>et al.</i> , 2002	9F : 91C	Bouvillons (CT)	culture / comptage	5.72		3.88 x 10 <sup>9</sup>	0.65 x 10 <sup>9</sup>		25.2					
Hristov <i>et al.</i> , 2001	38F : 62C	Bouvillons	comptage	6.45					8.04	68	44	207		
	5F : 95C			6.02					4.7	132	45	211		
Martin <i>et al.</i> , 1999	100F	Vaches	comptage	6.75					0.6	1.32		7.26	2.63	
	40F : 60C			6.04					10.8	14.44		4.28	1.68	
Goad <i>et al.</i> , 1998	80F : 20C	Bouvillons	culture / comptage	6.7		2.1 x 10 <sup>9</sup>	0.08 x 10 <sup>9</sup>		2.06					
	100C			5.9		7.8 x 10 <sup>9</sup>	0.29 x 10 <sup>9</sup>		1.56					
	20F : 80C			6.4		3.7 x 10 <sup>9</sup>	1.6 x 10 <sup>9</sup>		4.02					
	100C			5.76		11 x 10 <sup>9</sup>	4.2 x 10 <sup>9</sup>		1.98					
Nozière et Michalet-Doreau, 1997	100F	Vaches								1.1				
	70F : 30C									4.3				
	30F : 70C									9.7				
Franzolin et Dehority, 1996	100F	Bouvillons	comptage	6.34					3.61					
	50F : 50C			5.89					6.42					
	25F : 75C			5.69					8.03					
	10F : 90C								11.18					
	100C								10.05					
Martin et Michalet-Doreau, 1994	100F	Vaches								3	7	75		
	65F : 35C									197	7	72		
Olumetyan <i>et al.</i> , 1986	80F : 20C	Bouvillons (CT)	culture / comptage	6.69	25	12.3	5	0.102	2.96					
	50F : 50C			6.12	24	22.2	15.3	0.192	6.07					
	20F : 80C			6.08	30	44.9	30.4	0.103	4.85					
Mackie et Gilchrist, 1979	90F : 10C	Moutons (CT)	culture / comptage		0.26	1.6	0.2							
	29F : 71C				0.85	21.2	22.3							
Grubb et Dehority, 1975	100F	Moutons (CT)	culture / comptage		0.56				4.57					
	40F : 60C				1.68				-	11.2				

F = Fourrage; C = Concentré; CT = Contenu total; pour le dénombrement des bactéries, les résultats sont exprimés en % de bactéries totales sauf pour Goad *et al.*, 1998

**Tableau 4. Effets des régimes acidogènes sur l'écosystème microbien ruminal (suite).**

(Brossard *et al.*, 2004 ; Brossard *et al.*, 2006), les auteurs n'ont pas détecté la présence de *M. elsdenii* chez des moutons recevant une ration comportant 60% de blé, avec un pH ruminal moyen de 5.85 et une teneur en lactate dans le rumen inférieure à 2 mM. Les auteurs ont expliqué ceci par une production de lactate insuffisante pour stimuler la prolifération de *M. elsdenii* qui comme les autres BUL requiert non seulement des régimes riches en céréales (Khafipour *et al.*, 2009c) mais également un certain temps de latence pour proliférer (Figure 5). Un manque de sensibilité de cette technique est également envisageable puisque l'utilisation de techniques moléculaires plus sensibles (qPCR et TRFLP) a montré une augmentation de *M. elsdenii* suite à l'apport de GRF chez le mouton (Bekele *et al.*, 2010), le bouvillon en croissance (Fernando *et al.*, 2010) et la vache laitière (Khafipour *et al.*, 2009c).

*Selenomonas ruminantium* constitue l'autre BUL majeure dans le rumen d'animaux nourris avec des régimes acidogènes, en raison de son métabolisme particulier qui lui permet de produire mais aussi d'utiliser le lactate pour produire du propionate par la **voie du succinate** (Nagaraja et Titgemeyer, 2007). Contrairement à *M. elsdenii*, *S. ruminantium* est soumis à une répression catabolique par le glucose, le saccharose et le xylose, qu'elle utilise préférentiellement au lactate (Russell et Baldwin, 1978). Sa fermentation du lactate est moins efficace en conditions acidogènes car sa LDH (Lactate DésHydrogénase) est réprimée par la présence de glucose (Asanuma et Hino, 2005). Bien que les études rassemblées dans le Tableau 2 soient contrastées, la majorité indique une augmentation de *S. ruminantium* dans le rumen, suite à un apport de GRF (Brossard *et al.*, 2004 ; Brossard *et al.*, 2006 ; Fernando *et al.*, 2010 ; Stevenson et Weimer, 2007 ; Tajima *et al.*, 2000). Toutefois, dans le modèle d'étude de l'acidose développé par Khafipour *et al.* (2009), l'augmentation de la population de *S. ruminantium* n'a été observée qu'en situation d'acidose modérée, laissant penser qu'elle est peu résistante aux conditions très acidogènes par comparaison avec *M. elsdenii* (Khafipour *et al.*, 2009c). A ce jour peu de données sont disponibles sur les autres BUL soit parce qu'elles jouent un rôle mineur comparé à *M. elsdenii* et *S. ruminantium* ou parce qu'elles ont été tout simplement moins étudiées.

#### → **Les activités amylase et LDH**

Concernant les activités enzymatiques (Tableau 3) impliquées dans la dégradation de l'amidon (amylase) et du métabolisme du lactate (LDH, lactate racémase) les auteurs rapportent une augmentation de l'activité amylasique (Brossard *et al.*, 2006 ; Hristov *et al.*, 2001 ; Martin et Michalet-Doreau, 1995 ; Martin *et al.*, 1999a ; Nozière et Michalet-Doreau, 1997) proportionnelle à la quantité d'amidon dégradable dans la ration, et ce quelle que soit l'espèce animale utilisée (ovins, bovins), et indépendamment du statut acidotique des animaux. Inversement, les données sur l'activité LDH



seraient théoriquement plus pertinentes pour apprécier le statut acidotique des animaux, car elles apporteraient des informations sur la production du lactate par les BAPL et son utilisation par les BUL. Malheureusement, une seule donnée est disponible et fait état d'une diminution de l'activité LDH chez des moutons alimentés avec 60% de céréales (Brossard *et al.*, 2004). L'effet des situations d'acidose sur l'activité LDH ne peut donc pas être discuté davantage ici.

**Il semble que l'apparition de l'acidose latente s'accompagne d'une augmentation parallèle des communautés productrices et utilisatrices de lactate ce qui expliquerait l'absence d'accumulation de ce métabolite dans le rumen. Concernant les bactéries amylolytiques et/ou productrices de lactate, *P. acidilactici* et les lactobacilles seraient impliqués dans le développement de l'acidose alors que *S. bovis*, contrairement à ce qui est généralement admis, serait un agent aggravant de l'acidose ruminale. De part son acido-résistance et une plus grande affinité pour le lactate, *M. elsdenii* serait la principale bactérie utilisatrice de lactate en situation d'acidose, mais sa présence est indépendante du statut acidotique du rumen. De même, l'augmentation de l'activité amylasique n'est pas directement reliée au statut acidotique du rumen, alors que les effets sur les activités lactate-racémase et -déshydrogénase restent à démontrer.**

### 1.2.2. Les bactéries cellulolytiques

*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* et *Ruminococcus albus* sont considérées comme les trois espèces cellulolytiques majeures. De plus, ces 3 espèces sont également pectinolytiques et *F. succinogenes* est capable de dégrader l'amidon, en particulier l'amyloextrine. En se basant sur les données rassemblées (Tableaux 2 et 3), l'effet des rations acidogènes semble contrasté car certaines études montrent une diminution (Bekele *et al.*, 2010 ; Fernando *et al.*, 2010 ; Khafipour *et al.*, 2009c ; Tajima *et al.*, 2001 ; Weimer *et al.*, 1999), d'autres un maintien (Martin *et al.*, 2001 ; Olumeyan *et al.*, 1986 ; Stevenson et Weimer, 2007 ; Weimer *et al.*, 1999) voire une augmentation de la communauté (Khafipour *et al.*, 2009c ; Olumeyan *et al.*, 1986). En plus, de la forte variabilité individuelle au sein du microbiote ruminal en général (Larue *et al.*, 2005) et de la flore cellulolytique en particulier (Weimer *et al.*, 1999), plusieurs autres paramètres peuvent expliquer cette discordance dans les résultats.

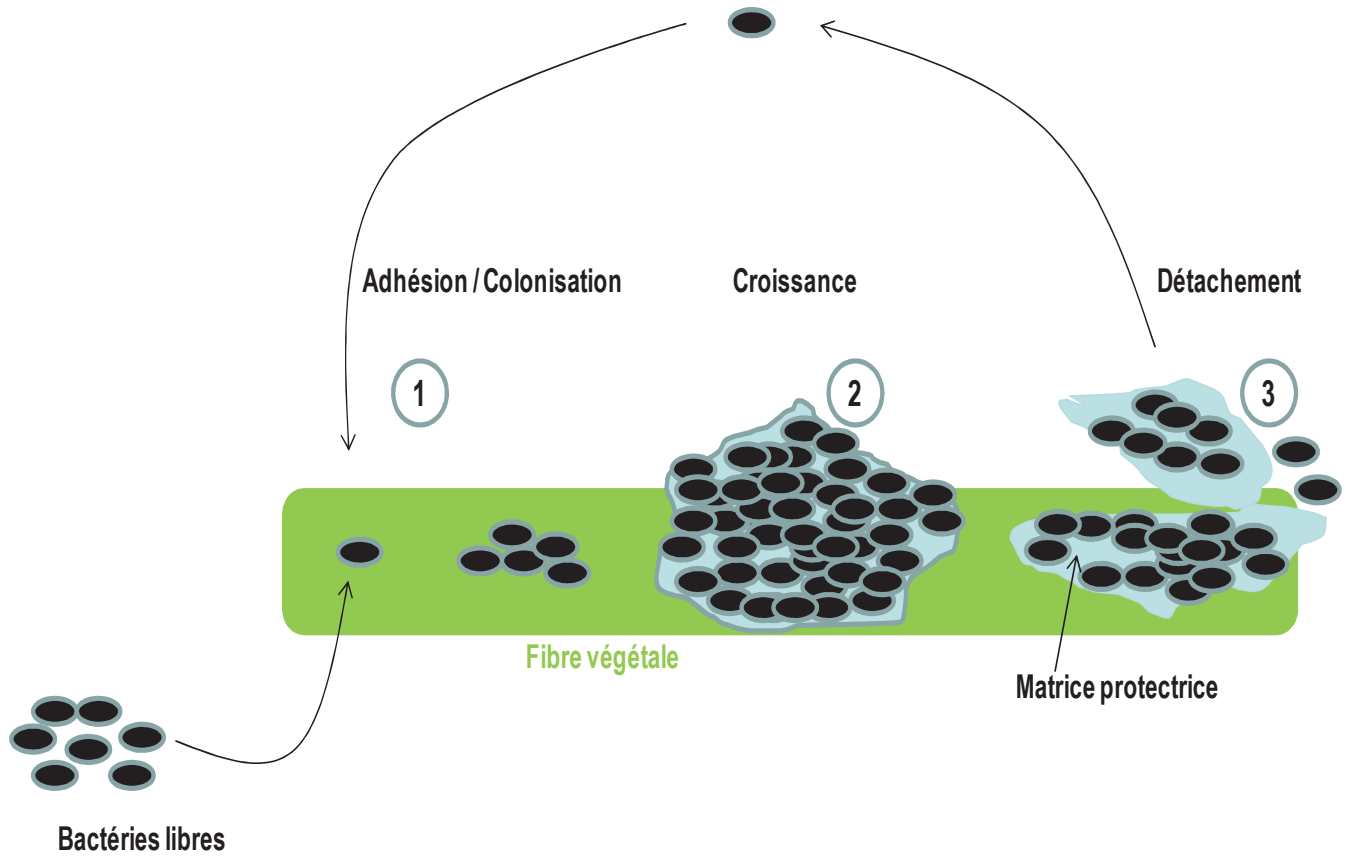


→ **Adaptation aux conditions acidogènes**

*F. succinogenes* est communément considérée comme étant l'espèce dominante parmi les 3 principales bactéries cellulolytiques (Michalet-Doreau *et al.*, 2002 ; Stevenson et Weimer, 2007 ; Tajima *et al.*, 2001) et cette comparaison n'est possible que parce que ces 3 bactéries possèdent chacune 3 copies du gène ADNr 16S dans leur génome (M. Morrisson, communication personnelle). Cependant, la prédominance de *F. succinogenes* n'est pas toujours vérifiée (Martin *et al.*, 2001 ; Mosoni *et al.*, 2007 ; Weimer *et al.*, 1999) et les proportions respectives de chacune des espèces varient pour des raisons encore non élucidées. D'autre part, l'effet des rations acidogènes varie entre les 3 espèces. En effet, dans une étude décrivant l'effet d'une transition alimentaire (25 vs. 92% de GRF), la proportion de *F. succinogenes* a été diminuée 20 fois après 3 jours puis 57 fois après 28 jours de maintien de la ration acidogène, alors que la proportion de *R. flavefaciens* a été diminuée par 10 (Tajima *et al.*, 2001). Lors de situations d'acidoses latentes avérées (Khafipour *et al.*, 2009c), il a été montré une diminution des proportions de *R. albus* et *R. flavefaciens* uniquement pour la forme sévère de l'acidose induite en augmentant la proportion de céréales (pH < 5.6 pendant 337 min/j), tandis que la proportion des deux espèces précitées a augmenté à la fois en situation d'acidose modérée induite par l'apport de céréales, et d'acidose sévère induite par les granulés de luzerne (pH < 5.6 pendant 217 et 510 min/j, respectivement). **Ceci suggère que la nature du régime prévaut sur le pH, en ce qui concerne la proportion des bactéries cellulolytiques dans l'écosystème bactérien du rumen.** Il est bien établi que les bactéries cellulolytiques colonisent les fibres végétales et forment des biofilms<sup>6</sup> pour les dégrader (Edwards *et al.*, 2007). On peut suggérer que la présence de fibres même sous forme de granulés a permis le développement de biofilms qui ont protégé les bactéries cellulolytiques de l'acidité environnante (Figure 6) et qui seraient à l'origine de l'augmentation des populations de *R. albus* et *R. flavefaciens*.

D'autre part, le développement d'une communauté cellulolytique acido-tolérante est également envisageable. Ainsi, une étude sur des moutons soumis à une succession de 3 challenges acidogènes (80% foin + 20% blé pendant 21 jours puis 40% foin + 60% blé pendant 5 jours) répétés sur 3 périodes a montré une adaptation progressive de la flore cellulolytique au pH acide (Silberberg *et al.*, 2008). En effet, alors que le premier challenge avait induit une forte diminution de la communauté cellulolytique et du pH ruminal (temps passé sous pH 5.6 > 10 h/jr) ; la communauté cellulolytique est revenue à son niveau initial au cours des challenges suivants malgré un pH ruminal encore plus acide (temps passé sous pH 5.6 = 15 h/jr). **Cette étude in vivo montre que des facteurs autres que le pH**

<sup>6</sup>Biofilms : organisation structurée de microorganismes dans une matrice polysaccharidique et protéique, protectrice et nutritive, adhérant à une surface.



**Figure 6. Représentation schématique de la mise en place d'un biofilm sur une particule végétale par des bactéries cellulolytiques.**

Commentaire : Lors de l'étape 1, une bactérie sous forme libre adhère à la surface de la fibre végétale et commence à se multiplier. Lorsque la densité bactérienne atteint un certain seuil, il y a activation du quorum sensing (phénomène de communication bactérienne densité-dépendant) qui aboutit à la formation du biofilm (étape 2). Cette structure est très résistante aux conditions environnementales ce qui protège les bactéries formant le biofilm. Lorsque la ressource arrive à épuisement, le biofilm se désagrège (étape 3) et les bactéries libres vont initier un nouveau cycle.

conditionnent la croissance des bactéries cellulolytiques. D'un point de vue biotechnologique, la sélection de ces bactéries résistantes au pH acide pourrait constituer un bon moyen pour améliorer la digestion des fibres.

→ **Compétition au sein de la communauté cellulolytique**

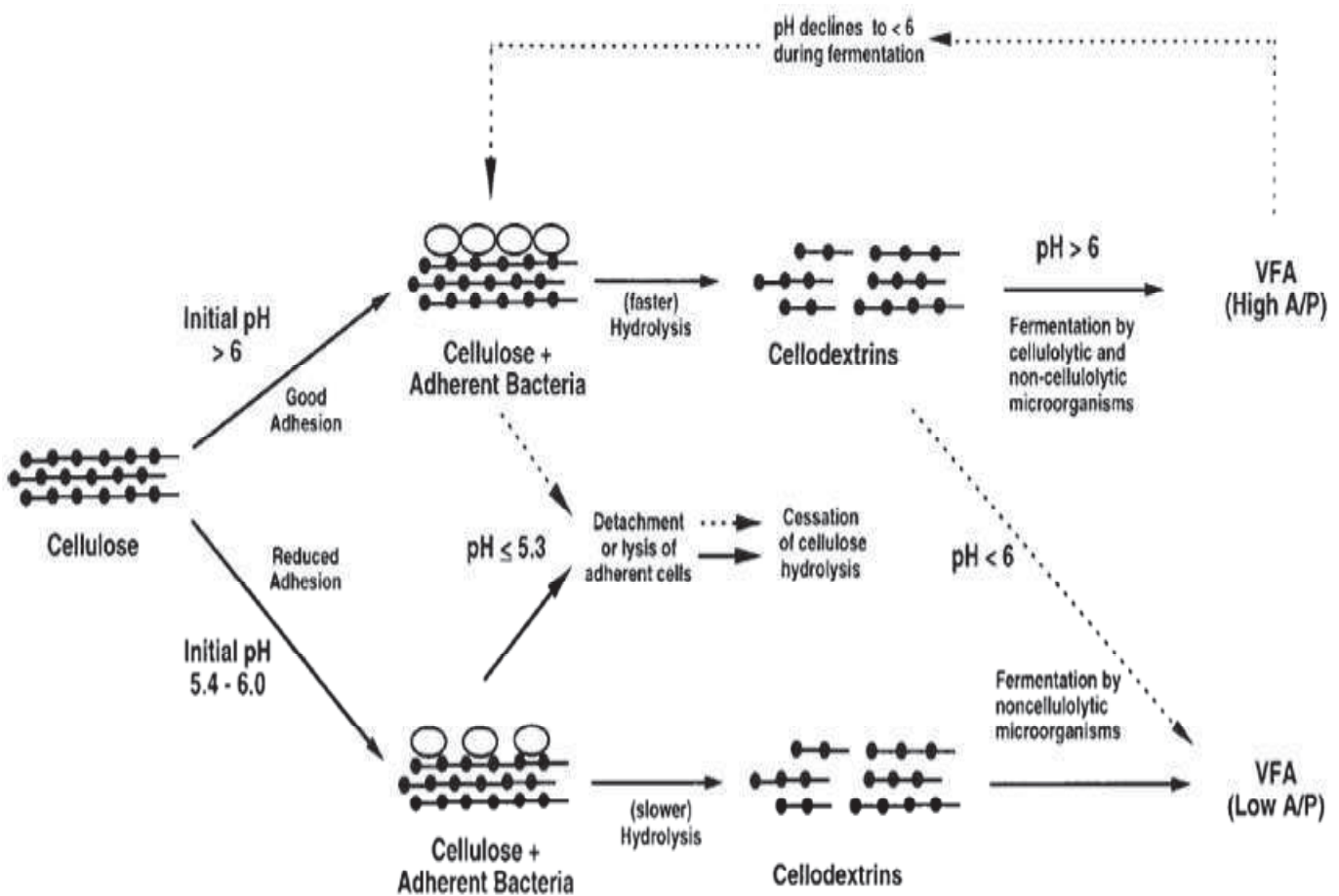
En plus de l'effet du régime et des conditions physicochimiques ruminales, **la dynamique de la population cellulolytique est contrôlée par les phénomènes d'interaction entre les bactéries cellulolytiques et notamment la compétition pour les ressources.** Ce phénomène également appelé 'exclusion compétitive' est exacerbé lorsque les conditions ruminales sont hostiles comme c'est le cas lors de l'acidose où l'alimentation des animaux est déficiente en fibres. Shi *et al.* (1997) ont montré, dans des conditions de culture apportant de la cellulose en quantité limitée, que la co-culture de *F. succinogenes* S85 et *R. flavefaciens* FD-1 était dominée par *R. flavefaciens* (> 96%) et que la co-culture de *F. succinogenes* et *R. albus* 7 était dominée par *F. succinogenes* (80%). En excès de cellulose, les co-cultures donnaient lieu à des communautés bactériennes cellulolytiques équilibrées (Shi *et al.*, 1997). Lorsque les deux ruminocoques ont été mis en co-culture dans un milieu apportant de la cellulose en excès, les résultats étaient variables allant d'une monoculture de *R. albus* à un équilibre des deux espèces tandis qu'en limitant la quantité de cellulose *R. flavefaciens* dominait la co-culture (85%). Dans une autre étude où les trois espèces ont été cultivées simultanément, la triculture était dominée par *R. albus* > *R. flavefaciens* > *F. succinogenes*. Ces résultats montrent que les interactions varient selon les espèces présentes et que chacune est influencée par les deux autres. **L'explication de ces observations est multifactorielle car la prédominance d'une espèce donnée dépend de sa capacité d'adhésion aux particules, son adaptabilité, son taux de croissance lors de conditions hostiles, son affinité pour les produits de dégradation des polymères et la production de molécules inhibitrices (Chen et Weimer, 2001 ; Mosoni *et al.*, 1997 ; Shi *et al.*, 1997).** Il a par ailleurs été montré que *R. albus* et *R. flavefaciens* produisaient des molécules inhibant la croissance de *R. flavefaciens* et *F. succinogenes*, respectivement (Chen et Weimer, 2001 ; Odenyo *et al.*, 1994). La molécule produite par *R. albus* a été identifiée comme étant une bactériocine, nommée albusin B (Chen *et al.*, 2004).

→ **Les activités cellulolytiques**

Concernant les principales activités cellulolytiques (carboxyméthylcellulase, xylanase, avicelase) permettant de dégrader les parois végétales, les rares études recensées (Tableau 3) ont reporté une diminution de ces activités chez des animaux en situation d'acidose latente

## pH EFFECTS ON CELLULOSE DIGESTION

857

Figure 7. Digestion de la cellulose en fonction du pH (d'après Mouriño *et al.*, 2001).

(Brossard *et al.*, 2006 ; Martin et Michalet-Doreau, 1995 ; Martin *et al.*, 1999a ; Martin *et al.*, 2001). C'est une conséquence logique étant donné que les enzymes sont des protéines dont l'activité est dépendante des conditions physicochimiques dont le pH. Selon Martin *et al.* (1999), la diminution de l'activité cellulolytique serait d'autant plus importante que l'amidon contenu dans la ration est rapidement dégradé du fait d'un effet direct du pH ruminal sur les enzymes et/ou d'une régulation catabolique par les produits de la dégradation des polymères végétaux (Martin *et al.*, 2002). Cette diminution d'activité enzymatique (qui induit une diminution de la vitesse de dégradation des parois, (Nozière *et al.*, 1996)) ainsi que la lyse et/ou le détachement des bactéries causés par le pH acide (Mouriño *et al.*, 2001) (Figure 7), contribuent à la diminution de la dégradation des polymères pariétaux observée lors de l'acidose latente (Krajcarski-Hunt *et al.*, 2002 ; Plaizier *et al.*, 2008)

**Il ressort que l'acidose a un effet négatif sur les activités enzymatiques fibrolytiques et la dégradation des polymères pariétaux dans le rumen. En revanche, l'effet sur la densité des différentes espèces cellulolytiques est variable et multifactoriel. Le pH ruminal, le régime, les capacités d'adaptation des différentes espèces et les phénomènes d'interactions microbiennes sont autant de facteurs pouvant être modifiés lors de situations nutritionnelles défavorables comme c'est le cas lors de l'acidose latente.**

### 1.2.3. Autres bactéries

#### → Le genre *Prevotella*

Les Prevotelles (phylum *Bacteroidetes*) représentent selon les études 12 à 60% du microbiote ruminal (Bekele *et al.*, 2010 ; Stevenson et Weimer, 2007 ; Whitford *et al.*, 1998 ; Wood *et al.*, 1998). Avec des proportions en GRF similaires (67 et 63%), les Prevotelles représentaient 20% du microbiote chez le mouton (Bekele *et al.*, 2010), tandis que leur proportion atteignait 59% chez des vaches laitières (Stevenson et Weimer, 2007). En plus d'un effet espèce animale plus que probable, Bekele *et al.* (2010) attribuent cette différence aux conditions expérimentales incluant la technique d'extraction de l'ADN, la méthode de quantification (absolue vs. relative) et le degré de spécificité des amorces qui dans l'étude de Stevenson et Weimer, (2007) amplifiaient les *Prevotellaceae* mais aussi les *Bacteroides* d'où la surestimation observée. Par ailleurs, au sein du genre *Prevotella*, les espèces cultivables (*P. ruminicola*, *P. bryantii*, *P. albensis*, *P. brevis*) ne représentent qu'une faible proportion estimée à environ 23% (Bekele *et al.*, 2010). Les Prevotelles sont très réactives et s'adaptent aisément aux rations riches en GRF grâce à une plasticité métabolique incomparable qui leur permet de dégrader et de fermenter un panel important de substrats (cellulose, hémicellulose, amidon, pectine, protéines, peptides). Ceci

explique également le fait qu'elles soient présentes en proportions importantes quel que soit le régime (Bekele *et al.*, 2010 ; Khafipour *et al.*, 2009c ; Stevenson et Weimer, 2007 ; Tajima *et al.*, 2001 ; Tajima *et al.*, 2000 ; Whitford *et al.*, 1998). **Parmi les espèces cultivables, *P. ruminicola* est toujours prédominante tandis que *P. bryantii* est celle qui semble être la plus influencée par les changements de régime.** Sa proportion a été augmentée 263 fois chez des vaches (Tajima *et al.*, 2001) et 10000 fois chez des bouvillons (Fernando *et al.*, 2010) suite à un enrichissement de la ration en GRF (de 25 à 92% et de 0 à 60% de GRF, respectivement). De part sa vitesse de croissance élevée sur des régimes amyliacés et son métabolisme fermentaire aboutissant à la production de succinate et de propionate, *P. bryantii* (souche 25A) a été récemment utilisée comme probiotique afin de prévenir une acidose latente provoquée chez la vache laitière (Chiquette *et al.*, 2008).

#### → *Escherichia coli*

En condition d'acidose latente sévère, Khafipour *et al.* (2009c) ont montré que la bactérie *E. coli* (phylum *Proteobacteria*) pourrait être l'un des facteurs microbiens prédisposant à l'acidose. Cette récente observation est d'autant plus intéressante que la lyse de cette bactérie à Gram négatif libère un LPS connu pour être très toxique (Khafipour *et al.*, 2009c) et qui pourrait être lié à l'inflammation d'organes chez les ruminants souffrant d'acidose latente. Ce résultat original concernant le rôle de la bactérie *E. coli* dans l'étiologie de l'acidose latente nécessite des recherches complémentaires.

## 2. Dynamique de la communauté des protozoaires ciliés

Il est rapporté que l'augmentation modérée de la proportion de GRF dans la ration induit une augmentation de la communauté de protozoaires (Dennis *et al.*, 1983), alors que l'apport de rations riches ou à base de GRF uniquement a des effets négatifs sur cette communauté microbienne pouvant aller jusqu'à la défaunation (Franzolin et Dehority, 1996 ; Towne *et al.*, 1990a ; Towne *et al.*, 1990b ; Vance *et al.*, 1972) ; ceci s'explique par la forte sensibilité des protozoaires aux variations du pH ruminal (Nagaraja et Titgemeyer, 2007). Cependant, dans les études rassemblées dont les pH sont compatibles avec une situation d'acidose latente (pH compris entre 6.04 et 5.6 ; Tableaux 2 et 3), les résultats sont assez contrastés et il y a davantage de données rapportant une augmentation (Brossard *et al.*, 2004 ; Franzolin et Dehority, 1996 ; Grubb et Dehority, 1975 ; Martin *et al.*, 1999b ; Olumeyan *et al.*, 1986) que celles rapportant une diminution (Goad *et al.*, 1998 ; Hristov *et al.*, 2001 ; Khafipour *et al.*, 2009c) des protozoaires. Etant donné que le pH et le type d'amidon (rapide vs. lent) ne permettent pas d'apporter une explication à la variabilité de ces données, **un effet toxique du propionate associé à un pH acide**

(pH < 6), déjà suggéré par (Fonty *et al.*, 1995) est envisageable, d'autant plus que les études mentionnant une diminution des ciliés font également état d'une forte augmentation du propionate (de 23 à 33%, Hristov *et al.* (2001) ; de 13 à 28% et de 19 à 35%, Goad *et al.* (1998) ; de 22 à 35%, Khafipour *et al.* (2009a, b).

Parmi les protozoaires ciliés présents dans le rumen, le genre *Entodinium* est de loin majoritaire (75 à 85%) et il semble que les rations acidogènes favorisent sa prédominance jusqu'à représenter 90-99% de la communauté (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009 ; Franzolin et Dehority, 1996 ; Goad *et al.*, 1998 ; Hristov *et al.*, 2001 ; Karnati *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 1999b ; Olumeyan *et al.*, 1986). Chez le mouton passant de 0 à 60% de blé, Brossard *et al.* (2004) ont mis en relation l'apparition de l'acidose latente butyrique et l'augmentation des entodiniomorphes qui représentaient 87% des ciliés. Dans cette étude les protozoaires ont probablement évité l'apparition d'une acidose lactique par un phénomène de compétition, pour le substrat, avec les bactéries amylolytiques et productrices de lactate. En effet, les protozoaires ingèrent et stockent les grains d'amidon qu'ils fermentent lentement en acides gras volatils et notamment en butyrate (Eugène *et al.*, 2004 ; Morgavi *et al.*, 2008 ; Ozutsumi *et al.*, 2005,2006), métabolisent le lactate (Fonty *et al.*, 1995) et exercent une activité de prédation en phagocytant les bactéries précitées (Sharp *et al.*, 1994).

**Il apparaît d'après ces données que l'effet de l'acidose sur les protozoaires dépend du type d'acidose latente. En effet, leur nombre augmente lors de l'acidose butyrique et diminue en situation d'acidose propionique, qui par ailleurs constitue la forme la plus répandue dans les systèmes d'élevage intensif. Compte tenu des diverses fonctions bénéfiques assurées par les protozoaires (régulation des fermentations, métabolisation du lactate, prédation des bactéries amylolytiques, amélioration de la fibrolyse, ...), l'acidose latente propionique leur est défavorable et l'action délétère induite par le propionate se répercute sur l'ensemble de l'écosystème microbien ruminal.**

### 3. Production de molécules immunogènes

En plus des acides (AGV, lactate) dont le rôle dans l'apparition de l'acidose n'est plus à démontrer, d'autres molécules d'origine microbienne telles que les amines biogènes et les lipopolysaccharides (LPS) bactériens sont suspectées d'être impliquées dans l'apparition des troubles de santé associés à l'acidose latente (ruminite, fourbure). La plus connue de ces amines biogènes est l'histamine qui est formée par l'action de décarboxylases exogènes des microorganismes sur l'histidine. Plusieurs auteurs



ont montré une relation directe entre le pH ruminal et la concentration en histamine (Nagaraja et Titgemeyer, 2007). A ce sujet, Garner *et al.* (2002) ont identifié une bactérie acido-tolérante, *Allisonella histaminiformans*, utilisant l'histidine comme seule source de carbone pour former de l'histamine **incriminée dans le développement des fourbures** (Garner *et al.*, 2002).

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des complexes macromoléculaires toxiques présents de manière constitutive dans la membrane externe de toutes les bactéries à Gram négatif et qui ne sont libérés que lors de la lyse bactérienne. Sur le plan structural, le LPS est constitué d'un lipide A doué de propriété toxique et d'une partie polysaccharidique débordant la membrane externe. Il est observé une augmentation du LPS ruminal et des protéines inflammatoires (haptoglobine, sérum amyloïde A) lors de l'acidose latente (Emmanuel *et al.*, 2008 ; Gozho *et al.*, 2006,2007 ; Gozho *et al.*, 2005 ; Plaizier *et al.*, 2008) du fait de la lyse des bactéries à Gram négatif sous l'effet des conditions acidogènes mais aussi d'une libération accrue par certaines bactéries à croissance rapide (Gozho *et al.*, 2006). Le pH acide, l'augmentation de la pression osmotique et du LPS pourrait augmenter la perméabilité de la paroi ruminale laissant passer des molécules toxiques et causer une inflammation systémique (Chin *et al.*, 2006 ; Khafipour *et al.*, 2009c). Dans leurs modèles, Khafipour *et al.* (2009a,b) ont observé une importante augmentation du LPS et de l'osmolarité dans le rumen avec les deux méthodes d'induction de l'acidose (céréales vs. granulés de luzerne). Cependant seule l'acidose provoquée en augmentant la proportion de céréales a été associée à l'augmentation des protéines inflammatoires (haptoglobine, sérum amyloïde A) et de LPS dans le sang. L'inflammation étant probablement due au passage du LPS du rumen vers la circulation sanguine, les auteurs pensent que **le LPS ne peut être un indicateur de l'acidose mais seulement d'une diminution de la fonction barrière de la paroi du rumen. D'autres facteurs physiologiques et microbiens responsables de l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium ruminal sont à rechercher.**

#### 4. Conclusion : une vision trop simpliste du microbiote ruminal !

Jusqu'à présent l'étude du microbiote ruminal a concerné essentiellement les bactéries cultivables/cultivées considérées comme majeures dans les processus fermentaires (*F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *S. bovis*, *Lactobacillus*, *M. elsdenii*, *S. ruminantium*, *B. fibrisolvens*, *R. amylophilus*, *B. fibrisolvens*, *Prevotella*, *A. lipolytica*). A la lumière des techniques moléculaires, il apparaît que ces bactéries représentent moins de 10% des bactéries ruminales ce qui est évidemment insuffisant pour expliquer par exemple le rôle du microbiote ruminal dans l'apparition de l'acidose



latente. Par ailleurs, l'utilisation de l'ADN ne prend pas en compte la viabilité et l'activité des bactéries ruminales puisqu'il peut aussi bien s'agir d'un ADN extracellulaire provenant de bactéries lysées, que d'un ADN extrait de spores et des bactéries VBNC (Viable But Non Culturable), qui sont des formes de résistance aux conditions hostiles, n'ayant pas d'activité métabolique (du moins dans le sens où elles ne participent pas aux processus fermentaires). **La question qui se pose alors est la suivante : est ce que les communautés les plus représentées sont les plus actives au moment de l'échantillonnage ?** L'ARN est plus sensible à la dégradation comparé à l'ADN, ce qui a freiné son utilisation pour l'étude du microbiote ruminal bien qu'il soit le marqueur de l'activité. Récemment, son utilisation (Kang *et al.*, 2009) a conduit à des résultats originaux. En effet, les protéobactéries représentaient 29% des 87 clones détectés ce qui leur conférerait pour la première fois un rôle important dans les processus fermentaires. Grâce à l'amélioration des techniques d'extraction d'ARN permettant son obtention en quantité et qualité satisfaisante (Béra-Maillet *et al.*, 2009 ; Kang *et al.*, 2009 ; Popova *et al.*, 2010), des résultats originaux sont attendus et permettront d'améliorer notre connaissance sur les groupes microbiens impliqués dans les fermentations ruminales.

**Parce que les bactéries classiquement étudiées (BAPL, BUL, bactéries cellulolytiques) ne constituent qu'une faible proportion du microbiote ruminal, d'autres groupes bactériens (*Prevotella*, *E. coli*) de même que protozoaires et champignons, dont le rôle dans les processus fermentaires a probablement été sous-estimé jusqu'ici, devraient être inclus dans les études à venir. Une approche globale de l'écosystème microbien est indispensable pour prendre en compte les interactions entre les différents acteurs microbiens de l'écosystème ruminal non seulement en termes de structure mais également d'activité ou de fonction. Aujourd'hui les techniques d'extraction de l'ARN ont été considérablement améliorées et leur utilisation permettra de suivre les micro-organismes métaboliquement actifs ce qui n'était pas le cas jusqu'à présent par l'utilisation de l'ADN. Enfin, l'utilisation des techniques moléculaires (métagénomique) de même que l'application des outils métabolomiques pour la caractérisation des produits de fermentation permettra une meilleure connaissance de la dynamique du microbiote (quantité, composition, activité) et de ses modifications lors de situations nutritionnelles défavorables comme l'acidose.**



## CHAPITRE 2 : UTILISATION DES PROBIOTIQUES EN ALIMENTATION ANIMALE

### 1. Les probiotiques

#### 1.1. Historique et définitions

Le terme probiotique dont la signification est « pour la vie » a été utilisé pour la première fois par Lilly et Stilwell pour désigner des substances produites par des micro-organismes et ayant la propriété de stimuler la croissance d'autres micro-organismes (Lilly et Stillwell, 1965). Il est actuellement utilisé pour des microorganismes associés à des effets bénéfiques pour l'hôte lorsqu'ils sont apportés en quantité suffisante. L'observation initiale du rôle positif joué par certaines bactéries est attribuée au Prix Nobel Eli Metchnikoff. Ce scientifique russe du début du siècle dernier qui travaillait à l'Institut Pasteur a suggéré que « l'allongement de la durée de vie des paysans Bulgares serait dû à leur consommation de lait fermenté » (Metchnikoff, 1908). A cette même époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les enfants souffrant de diarrhée avaient dans leurs selles un faible nombre de bifidobactéries, alors qu'elles étaient, au contraire, abondantes dans les selles d'enfants en bonne santé (Tissier, 1906). A partir de ces observations, Il suggéra que ces bactéries pourraient être administrées à des patients souffrant de diarrhée pour les aider à restaurer une flore intestinale saine.

Afin de souligner la nature microbienne des probiotiques, Fuller (Fuller, 1989) a redéfini ce terme comme « une préparation microbienne vivante ayant un effet bénéfique sur l'hôte en améliorant son équilibre intestinal ». Par la suite, d'autres définitions ont été proposées pour souligner l'importance de la ou des souches microbiennes qui composent la préparation, la dose administrée et le site d'action qui peut être différent de l'intestin. Une définition plus récente, mais probablement pas la dernière, présente les probiotiques comme « des **microorganismes vivants** qui, lorsqu'ils sont administrés en **quantité adéquate, confèrent des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte** "(FAO<sup>7</sup>/WHO<sup>8</sup> 2001). **Ces définitions restreignent l'utilisation du mot probiotique à des produits contenant des microorganismes vivants dont les effets sont ciblés sur la santé, ce qui la rend incomplète car elle n'inclue pas les probiotiques utilisés pour améliorer les performances animales.**

<sup>7</sup>FAO: Food and Agriculture Organization

<sup>8</sup> WHO: World Health Organization

Les observations de Metchnikoff et Tissier ont été si attrayantes que l'exploitation commerciale a immédiatement suivie leurs travaux scientifiques. En effet, 14 années après la mort de Metchnikoff, Minoru Shirota (Japon) a lancé la première boisson à base de lait fermenté, **Yakult**, contenant un lactobacille (*Lb. casei*) isolé de selles d'un enfant sain. Bien que les allégations nutritionnelles attribuées aux probiotiques ne soient pas toujours démontrées, le concept de probiotique a été considéré comme scientifiquement prouvé et n'a reçu que peu d'intérêt durant des décennies. Cependant, au cours des 20 dernières années, la recherche a considérablement progressé et des progrès considérables ont été accomplis dans la sélection et la caractérisation des probiotiques et la justification de leurs effets sur la santé humaine notamment (Kleerebezem et Vaughan, 2009 ; Ouwehand *et al.*, 2002a). Leurs différents modes d'actions sont schématisés dans la Figure 8. C'est sur l'impulsion des recherches sur l'homme que l'utilisation des probiotiques en alimentation animale a eu un regain d'intérêt au cours de ces dernières années.

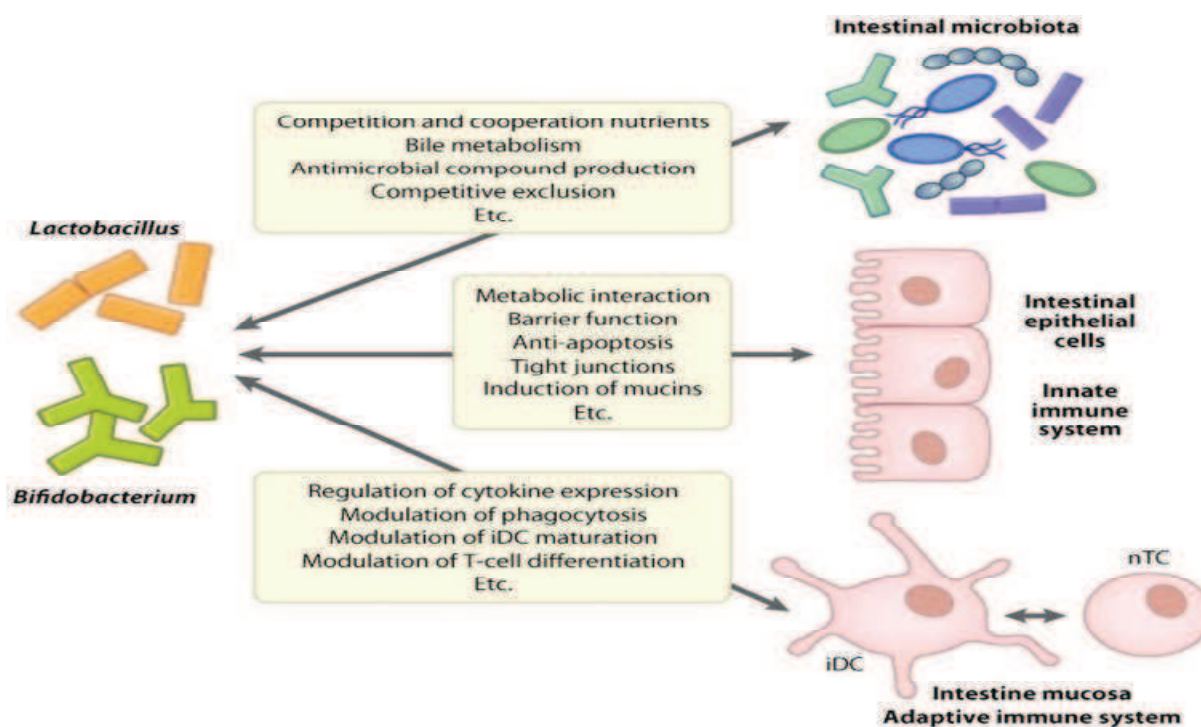


Figure 8. Mode d'action des probiotiques chez l'homme (d'après Kleerebezem et Vaughan, 2009).

## 1.2. Réglementation

Au sein de l'Union Européenne, de part la diminution progressive de l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance en alimentation animale puis leur interdiction au 01/06/2006, l'utilisation des probiotiques chez les ruminants connaît un regain d'intérêt depuis une quinzaine d'années. D'après l'autorité européenne de sécurité des aliments « les additifs ne doivent pas avoir un effet défavorable sur la santé animale et humaine ni porter préjudice au consommateur de produits animaux ». Mis à part la possibilité de retrouver des métabolites provenant des antibiotiques dans les produits animaux (lait, viande), le principal risque est le transfert d'antibiorésistance entre bactéries provenant du tube digestif des animaux et celles du tractus digestif humain. Par ailleurs, les affaires de l'encéphalite bovine et de la dioxine sont encore très présentes dans les esprits en Europe. De ce fait, l'utilisation de probiotiques apparaît comme étant une « **solution biologique** » bénéficiant d'une image positive de la part des consommateurs et pouvant être une alternative efficace en alimentation animale.

### 1.2.1. Notions QPS et GRAS

Les microorganismes (bactéries, levures) sont utilisés depuis très longtemps dans la production de denrées alimentaires et d'aliments pour animaux et le seront encore davantage dans l'avenir compte tenu des effets bénéfiques qui leur sont associés aussi bien chez l'homme que chez les animaux (élevage et compagnie). Certains microorganismes sont utilisés depuis longtemps (lait fermenté, saucissons secs, ...) en toute sécurité (notion de **Familiarity** en anglais), alors que d'autres moins bien connus peuvent présenter un risque pour les consommateurs. Afin de garantir l'innocuité des microorganismes avant leur mise sur le marché, l'EFSA a proposé en 2007 le système d'évaluation **QPS** (Qualified Presumption of Safety) dont l'attribution à une espèce donnée repose sur un arbre décisionnel comprenant quatre critères : taxonomie, connaissances disponibles, pathogénicité éventuelle et utilisation finale du microorganisme considéré (Figure 9). Pour les microorganismes non QPS, il sera recommandé une évaluation complète au cas par cas et ce au niveau de la souche (Leuschner *et al.*, 2010). Enfin, l'approche QPS prévoit de réactualiser la liste des espèces reconnues en fonction des découvertes scientifiques (changement de taxonomie, transfert de gènes de résistance,...).

Ce concept, récent en Europe, a été inspiré mais ne copie pas le système américain **GRAS** (Generally Recognised As Safe ; <http://www.fda.gov/>) mis en place en 1958 aux Etats-Unis. Pour ceux qui considèrent à tort les statuts QPS et GRAS comme équivalents (Sanz-Penella *et al.*, 2009), l'EFSA considère le concept QPS comme un outil interne (au niveau européen) d'évaluation des risques des agents biologiques (EFSA., 2009 ; Leuschner *et al.*, 2010) adapté aux réglementations en vigueur.

C'est par exemple la question de l'acquisition de facteurs de résistance aux antibiotiques qui sont hautement indésirables en Europe mais de moindre importance aux USA. La liste des espèces bénéficiant du statut QPS est mise à jour chaque année par le groupe scientifique sur les risques biologiques (BIOHAZ<sup>9</sup>) de l'EFSA et les bactéries bénéficiant du statut QPS et GRAS pour l'année 2009 et 2010 sont présentées dans le Tableau 5.

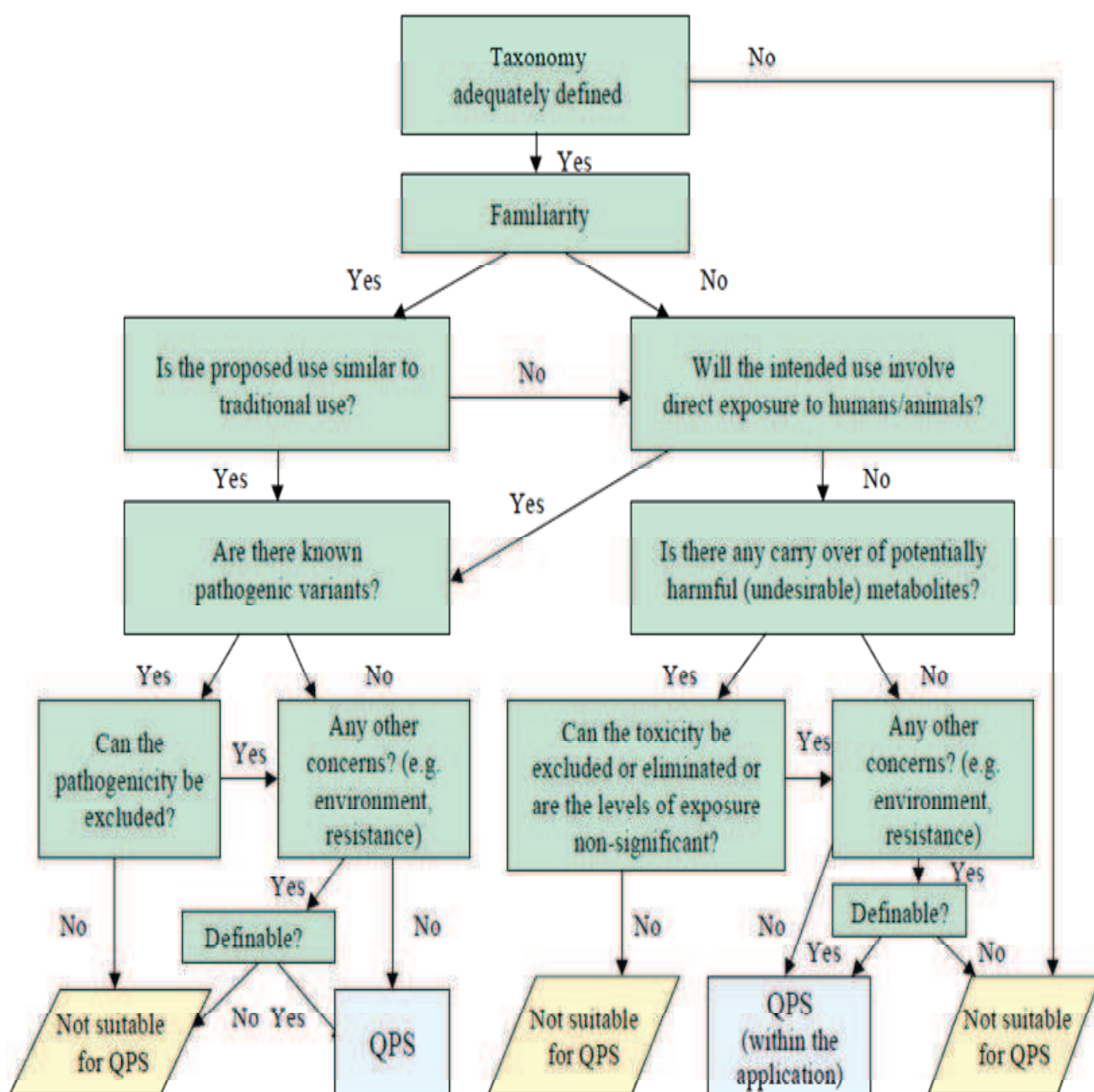


Figure 9. Schéma décisionnel pour l'attribution du statut QPS pour un agent biologique donné (source : [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out178_en.pdf)).

<sup>9</sup> BIOHAZ: Biological Hazards



<i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacteroides amylophilus</i>	<i>Propionibacterium acidopropionici</i> (cattle only)
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Bacteroides ruminicola</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	<i>Bacteroides suis</i>	<i>Propionibacterium shermanii</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Enterococcus cremosis</i>
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Enterococcus diacetylactis</i>
	<i>Lactobacillus buchneri</i> (cattle only)	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Enterococcus intermedius</i>
	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Enterococcus lactis</i>
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Enterococcus thermophilus</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Bacillus lentus</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
	<i>Lactobacillus farciminis</i> (swine only)	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Pichia angusta</i>	<i>Lactobacillus cellubiosus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Pichia anomala</i>	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i>
<i>Pichia jadinii</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Bacillus clausii</i>
	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Bacillus fusiformis</i>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lactobacillus coryneformis</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Lactobacillus grasserii</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
	<i>Lactobacillus kefiranoformis</i>	
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	
	<i>Lactobacillus mucosae</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>	
<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
<i>Oenococcus oeni</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
	<i>Lactobacillus pontis</i>	
<i>Pediococcus acidilacticii</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	
<i>Pediococcus cerevisiae</i> (damnosus)	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	
<i>Pediococcus destrinicus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
GRAS	QPS	les deux

Tableau 5. Liste des microorganismes bénéficiant du statut QPS (source : EFSA, 2009) et GRAS (Source : AAFCO<sup>10</sup>, 2010). GRAS en noir, QPS en rouge et ceux bénéficiant des deux statuts en bleu. Les souches utilisées dans le cadre de ce travail de thèse sont affiliées aux espèces surlignées en jaune.

<sup>10</sup> AAFCO : Association of American Feed Control Officials (<http://www.aafco.org/>).

### 1.2.2. Critères de sélection

Dans leur revue, Bernardeau et Vernoux (2009), ont identifié deux générations de probiotiques. Ceux de **1<sup>ère</sup> génération** (de 1950 à 1993, Tableau 6) caractérisés par une **efficacité supposée** et une **absence de réglementation** qui étaient sélectionnés de manière empirique sans réel savoir scientifique sur leur identité, leur mode d'action et leur innocuité. A titre d'exemple, le probiotique Paciflor™ décrit initialement comme *Bacillus subtilis* et utilisé depuis les années 1950 comme additif en alimentation animale. A la lumière des techniques moléculaires actuelles, il a été montré que ce probiotique est en réalité l'espèce toxigène<sup>11</sup> *Bacillus cereus* IP5832. Ce produit est maintenant interdit en Europe mais encore utilisé comme probiotique chez l'homme dans de nombreux pays (Sanchez *et al.*, 2009). Le manque de données scientifiques caractérisée par des effets anecdotiques sur les performances zootechniques et un mécanisme d'action inconnu ont amené les professionnels de la production animale (vétérinaires, nutritionnistes, éleveurs) à considérer le concept probiotique avec grand scepticisme (Bernardeau et Vernoux, 2009).

Probiotiques utilisés en alimentation animale		
	Première génération	Seconde génération
Période	1950 - 1993	1993 - ?
Réglementation	Absente	Dir 70/524/EC modifiée 93/114/EC Règlement 1831/2003/CE
Micro-organismes	Mals définis	Bien définis
	Mono / multi souches	Mono / double souches
Innocuité	Non évalués	Evalués
Efficacité	Cible principalement la performance de croissance	Cible les performances de croissance et la santé animale
	Absence d'analyse statistique	Avec analyses statistiques
Mode d'action	Non étudié, inconnu	Etudié, ± connu
Cibles	Intérêts alimentaires	Alimentation, santé

Tableau 6. Principales différences entre les probiotiques de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>e</sup> génération utilisés en alimentation animale (d'après Bernardeau et Vernoux, 2009).

<sup>11</sup> Toxinogène : qualifie un microorganisme producteur de toxines.



A contrario, les **probiotiques de 2<sup>e</sup> génération** ont été sélectionnés sur des bases scientifiques solides et une réglementation très rigoureuse (AFSSA<sup>12</sup> et EFSA) qui exige de la part des industriels une démonstration scientifique de l'innocuité des micro-organismes (pour l'animal, le manipulateur, le consommateur et l'environnement) et la preuve de leur efficacité (Mantovani *et al.*, 2006).

Les trois volets du dossier d'enregistrement européen appliqués aux probiotiques sont :

- a) identité et qualité: caractéristiques de la souche (taxonomie, métabolisme, propriétés, ...), processus de fabrication, stabilité du probiotique (seul ou en mélange), méthode d'analyse ;
- b) sécurité : pour l'espèce cible (innocuité à 10 fois la dose recommandée), pour le manipulateur, le consommateur (absence d'antibiorésistance, génotoxicité<sup>13</sup> et mutagénicité<sup>14</sup>) et pour l'environnement ;
- c) efficacité : à démontrer pour l'espèce cible par un minimum de trois études significatives dans deux lieux différents. Le volet efficacité décrit l'espèce cible, les conditions (âge, stade physiologique, type de production), les doses d'utilisation, les performances revendiquées ainsi que les mécanismes d'action possibles. Les allégations possibles pour des probiotiques peuvent concerner des effets sur la performance animale, la production animale, le bien-être animal ou l'environnement ;

**La difficulté scientifique, la charge financière et la complexité des dossiers d'autorisation vont définitivement mettre un terme à l'utilisation abusive et non fondée des probiotiques en alimentation animale. C'est du moins le but fixé par l'EFSA au sein de l'Union Européenne pour que les probiotiques présents sur le marché soient considérés comme plus sûrs et plus efficaces. En revanche, les différences existant entre les dispositifs QPS et GRAS font que des probiotiques non-autorisés en Europe peuvent être autorisés aux USA (cf. suite du manuscrit).**

<sup>12</sup> AFSA : Agence Française de Santé et Sécurité Alimentaire (créée en 1998).

<sup>13</sup> Génotoxicité : propriété de provoquer une altération du patrimoine génétique cellulaire non transmissible à la descendance et qui se traduit par un dysfonctionnement cellulaire pouvant conduire à des cancers des organes touchés.

<sup>14</sup> Mutagénicité : propriété de provoquer des mutations héréditaires sur les cellules germinales (reproductives) théoriquement transmissibles à la descendance.

## Synthèse bibliographique : Intérêts des bactéries probiotiques dans l'alimentation des ruminants en situation d'acidose

Additif	Exploitant	Espèces cibles	Teneur (UFC / kg)		Durée autorisation
			mini	maxi	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - CBS 493.94 YEA-SACC	Altech France	Chevaux	1.6E+09		16/10/2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - CNCM I-1077 LEVUCCELL SC 20 - LEVUCCELL SC10 ME	Lallemand SAS	Chevaux	3.0E+09		20/10/2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - CNCM I-1077 LEVUCCELL SC 20 - LEVUCCELL SC10 ME	Lallemand SAS	Chevaux	3.0E+09		20/10/2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - NCYC Sc 47 ACTISAF (Règl. 897/2009 - Cir. AFCA-31/2009)	Lesaffre Feed Additives; ACTISAF (Règl. 897/2009 - Cir. AFCA-31/2009)	Chevaux	8.0E+08	7.0E+09	21/03/2017
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> NCIMB 40112/CNCM I-1012 TOYOCERIN	Rubinum SA	Dindes engraissement	2.0E+08	1.0E+09	14/03/2018
		Lapines Reproductrices			29/05/2019
		Agneaux à l'engrais	1.4E+09	1.4E+10	20/10/2016
		Chèvres Laitières	7.0E+08	7.5E+09	16/03/2017
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - NCYC Sc 47 ACTISAF (Règl. 897/2009 - Cir. AFCA-31/2009)	Lesaffre Feed Additives	Porcs à l'engrais	1.25E+09	1.0E+10	27/03/2018
		Bufflonnes Laitières	5.0E+08	1.4E+09	08/04/2019
		Veaux d'élevage	1.5E+09		28/10/2020
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - MUCL 39885 BIOSPRINT	Prosol S.p.A.	Truies	6.4E+09		19/10/2019
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - CNCM I-1077 LEVUCCELL SC 20 - LEVUCCELL SC10 ME	Lallemand SAS	Chèvres Laitières	5.0E+08	3.0E+09	22/03/2017
		Brebis Laitières	1.2E+09	1.2E+09	
		Agneaux	3.0E+09	7.3E+09	08/01/2019
<i>Bacillus subtilis</i> C-3102 - DSM 15544 CALSPORIN	Calpis Co. Ltd	Poulets engraissement	5.0E+08	1.0E+09	20/10/2016
		Porcelets (sevrés)	3.0E+08		13/05/2020
<i>Bacillus subtilis</i> - DSM 17299 O35	Chr. Hansen A/S	Poulets engraissement	8.0E+08	1.6E+09	22/10/2017
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> - CECT 5940 ECOBIOI et ECOBIOI Plus	Norel SA	Poulets engraissement	1.0E+09	1.0E+09	08/01/2019
<i>Bacillus subtilis</i> - ATCC PTA-6737 PB6	Kemin Europa N.V.	Poulets engraissement	1.0E+07		01/03/2020
<i>Clostridium butyricum</i> - MIYAIRI 588 (FERM-P 1467) MIYA-GOLD S	Miyarisan Pharmaceutical Co. Ltd représenté par Mitsui&Co. Deutschland GmbH	Poulets engraissement	5.0E+08		19/10/2019
		Porcelets	5.0E+08	4.0E+09	05/06/2017
<i>Enterococcus faecium</i> - DSM 7134 BONVITAL	Lactosan Starterkulturen GmbH & Co	Porcs engraissement	2.0E+08	1.0E+09	
		Truies	5.0E+08	1.0E+09	09/01/2018
		Poulets engraissement	5.0E+08		26/11/2020
<i>Enterococcus faecium</i> - DSM 3530 BIOMIN IMB 52	Biomin GmbH	Poulets engraissement	5.0E+08	2.5E+09	20/10/2016
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> - CNCM I-3698 <i>Lactobacillus farcinis</i> - CNCM I-3699 SORBIFLORE	Danisco France SAS	Porcelets	5.0E+08	9.0E+08	08/01/2019
<i>Pedococcus acidilacti</i> - CNCM MA 18/5M BACTOCELL PA	Lallemand SAS	Salmonidés	3.0E+09		20/10/2019
		Crevettes	1.0E+09		
		Porcelets (maxi 35 kg)	1.28E+09	3.2E+09	
<i>Bacillus licheniformis</i> - DSM 5749 <i>Bacillus subtilis</i> - DSM 5750 ZB	BIOPUS Chr. Hansen A/S	Porcs engraissement	1.28E+09	1.28E+09	Indéterminée
		Truies (2 sem. avant mise bas et pendant lactation)	1.28E+09	1.28E+09	Indéterminée
		Dindons engraissement	1.28E+09	1.28E+09	Indéterminée
		Veaux (maxi 3 mois)	1.28E+09	1.28E+09	Indéterminée
		Porcelets (maxi 2 mois)	1.0E+09	1.0E+09	Indéterminée
		Truies (de l'insémination au sevrage)	5.0E+08	2.0E+09	Indéterminée
<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i> NCIMB 40112/CNCM I-1012 TOYOCERIN	Rubinum SA	Porcs engraissement	2.0E+08	1.0E+09	Indéterminée
		Bovins à l'engrais	2.0E+08	2.0E+08	Indéterminée
		Poulets engraissement	2.0E+08	1.0E+09	Indéterminée
		Lapins engraissement	2.0E+08	5.0E+09	Indéterminée
		Bovins d'engraisement	4.0E+09	8.0E+09	Indéterminée
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCYC Sc 47	Lesaffre Feed Additives; ACTISAF (Règl. 897/2009 - Cir. AFCA-31/2009)	Truies	5.0E+09	1.0E+10	Indéterminée
		Porcelets (sevrés)	5.0E+09	1.0E+10	Indéterminée
		Lapins engraissement	2.5E+09	7.5E+09	Indéterminée
		Vaches laitières	4.0E+08	2.0E+09	Indéterminée
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - CNCM I-1079 LEVUCCELL SB 20	Lallemand SAS	Porcelets (jusqu'à 35 kg)	2.0E+09	6.0E+09	Indéterminée
		Truies	1.0E+09	6.0E+09	Indéterminée
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 493.94 YEA-SACC	Altech France	Veaux (maxi 6 mois)	2.0E+08	2.0E+09	Indéterminée
		Bovins à l'engraisement	1.7E+08	1.7E+08	
		Vaches laitières	5.0E+07	3.5E+08	Indéterminée
		Veaux (maxi 6 mois)	1.0E+09	6.6E+09	Indéterminée
<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 CYLACTIN	DSM Nutritional Products	Porcs engraissement	3.5E+08	1.0E+09	Indéterminée
		Poulets engraissement	3.0E+08	2.8E+09	
		Truies	7.0E+08	1.25E+09	Indéterminée
		Porcelets (jusqu'à 35 kg)	3.5E+08	1.0E+09	Indéterminée
<i>Enterococcus faecium</i> - DSM 7134 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> - DSM 7133 PROVITA LE		Veaux (maxi 4 mois)	1.0E+09	6.0E+09	Indéterminée
		Porcelets (sevrés)	2.5E+09	5.0E+09	Indéterminée
<i>Enterococcus faecium</i> DSM 10663/NCIMB 10415 ORALIN	Chevit GmBH	Poulets engraissement	1.0E+09	1.0E+10	Indéterminée
		Veaux (maxi 6 mois)	1.0E+09	1.0E+10	Indéterminée
		Porcelets	1.0E+09	1.0E+10	Indéterminée
		Dindes engraissement	1.0E+07	1.0E+09	Indéterminée
<i>Enterococcus faecium</i> - NCIMB 11181 LACTIFERM	Chr. Hansen A/S	Veaux (maxi 6 mois)	5.0E+08	2.0E+10	Indéterminée
		Porcelets (maxi 4 mois)	5.0E+08	2.0E+10	
		Poulets engraissement	2.5E+08	1.5E+10	25/11/2009
<i>Enterococcus faecium</i> - ATCC 53519 <i>Enterococcus faecium</i> - ATCC 55593 PIONEER PDFM	PROBIOS	Poulets engraissement	1.0E+08	1.0E+08	Indéterminée
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - MUCL 39885	biosprint	Porcelets (sevrés)	3.0E+09	3.0E+09	Indéterminée
		Bovins d'engraisement	9.0E+09	9.0E+09	Indéterminée
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> - CNCM I-1077 LEVUCCELL SC 20	Lallemand SAS	Vaches laitières	1.23E+09	1.23E+09	Indéterminée
		Vaches laitières	4.0E+08	2.0E+09	Indéterminée
		Bovins d'engraisement	5.0E+08	1.6E+09	Indéterminée
<i>Pedococcus acidilacti</i> - CNCM MA 18/5M BACTOCELL - FERMAID	Lallemand SAS	Poulets engraissement	1.0E+09	1.0E+10	Indéterminée
		Porcs engraissement	1.0E+09	1.0E+09	Indéterminée
<i>Enterococcus faecium</i> - CECT 4515 FECINOR	Norel SA	Porcelets (sevrés)	1.0E+09	1.0E+09	Indéterminée
		Porcelets (sevrés)	1.0E+09	1.0E+10	Indéterminée
<i>Lactobacillus farcinis</i> - CNCM MA 67/4R BIACTON	Chemvet A/S	Poulets engraissement			
		Dindons engraissement	5.0E+08	1.0E+09	08/01/2011
		Poules pondeuses			
<i>Lactobacillus acidophilus</i> - D2/CSL CECT 4529	D2-CSL	Poules pondeuses	1.0E+09	1.0E+09	Indéterminée
<i>Kluyveromyces marxianus-fragilis</i> - B0399 - MUCL 41579 TURVAL B0399	TURVAL	Porcelets (sevrés)	6.0E+06	6.0E+06	12/06/2010

Les additifs apparaissant en caractères gris italiques sont ceux pour lesquels nous ne savons pas encore si un dossier de renouvellement d'autorisation a été reçu par la Commission UE. Les ruminants sont sirignés en jaune et les autorisations arrivant prochainement à expiration en bleu.

**Tableau 7. Liste microorganismes autorisés en France pour l'alimentation animale (source : AFCA-CIAL, mise à jour Novembre 2010).**

### 1.2.3. Classification des probiotiques en alimentation animale

Selon leurs fonctions et leurs propriétés, les additifs pour l'alimentation animale sont classés dans une ou plusieurs des catégories suivantes (**Règlement 1831/2003/CE**) :

- a) additifs technologiques: toutes les substances ajoutées aux aliments pour animaux à des fins technologiques;
- b) additifs sensoriels: toutes les substances qui, ajoutées à l'alimentation animale, améliorent ou modifient les propriétés organoleptiques des aliments pour animaux ou les caractéristiques visuelles des denrées alimentaires issues d'animaux;
- c) additifs nutritionnels;
- d) additifs zootechniques: tous les additifs utilisés pour influencer favorablement les performances des animaux en bonne santé ou l'environnement;
- e) coccidiostatiques et histomonostatiques.

Les probiotiques utilisés en alimentation animale sont affiliés à la catégorie «**additifs zootechniques**» qui désignent les groupes fonctionnels suivants:

- a) améliorateurs de digestibilité: substances qui, utilisées dans l'alimentation animale, renforcent la digestibilité du régime alimentaire, par leur action sur certaines matières premières pour aliments des animaux ;
- b) stabilisateurs de la flore intestinale: **micro-organismes** (bactérie et/ou levure) ou autres substances chimiquement définies qui, utilisés dans l'alimentation animale, ont un effet bénéfique sur la flore intestinale ;
- c) substances qui ont un effet positif sur l'environnement ;
- d) autres additifs zootechniques ;

En plus de ces caractéristiques, il faut garder à l'esprit deux autres qui ne sont pas citées précédemment à savoir ; le probiotique doit être **vivant** (cf. définition probiotique) au moment de son utilisation afin d'exercer son effet dans la zone ciblée (rumen, intestin...) et présenter une **totale innocuité** (aucun risque pour la santé de l'animal, du manipulateur, du consommateur et enfin sur l'environnement). La liste des additifs microbiens autorisés en France dans le domaine de l'alimentation animale est présentée dans le Tableau 7.



### 1.3. Exemples d'applications chez le ruminant

#### 1.3.1. Les levures probiotiques : prévention de l'acidose ruminale latente et amélioration des performances animales

Les levures sont des champignons unicellulaires microscopiques de taille variable (6 à 50 µm). Elles sont connues depuis très longtemps et employées en alimentation (œnologie, boulangerie, ...) et en santé humaine (synthèse d'antibiotiques, régulation flore digestive). Par ailleurs les extraits de levures sont largement utilisés pour la culture des bactéries du fait de la richesse des levures en nutriments et facteurs de croissance nécessaires à la croissance bactérienne. La principale espèce utilisée en alimentation des ruminants est *Saccharomyces cerevisiae* et son emploi a eu des effets contrastés (effets nuls et positifs) à la fois sur les fermentations ruminales et les performances zootechniques. Une analyse quantitative de la littérature par méta-analyse (110 publications, 157 expériences, 376 traitements) a récemment montré une amélioration des fermentations ruminales et des performances zootechniques suite à l'apport de *S. cerevisiae* (Desnoyers *et al.*, 2009). Les auteurs ont rapporté une augmentation du pH ruminal (+ 0,03 unités pH), des AGV totaux (+ 2,17 mM) et une diminution de la concentration en lactate (- 0,9 mM), mais sans effet sur le ratio acétate/propionate. De plus, l'apport des levures a augmenté l'ingestion (+ 0,44 g / kg de poids vif), la digestibilité de la matière organique (+ 0,8%), la production laitière (+ 1,2 g/kg PV) et le taux butyreux (+ ,05%). Par ailleurs, les auteurs ont mentionné que l'effet bénéfique des levures sur le pH, les AGV et le lactate augmentait avec l'ingestion et la proportion de concentré dans la ration. Un effet dose a été également noté sur les paramètres fermentaires (pH, concentrations en AGV et en lactate), et zootechniques (ingestion, production de lait) ainsi que sur la digestion de la matière organique de la ration (Desnoyers *et al.*, 2009). Toutefois, comme cela a été souligné par les auteurs, il faudra interpréter ces résultats avec précaution car les résultats de cette analyse quantitative peuvent être biaisés sachant que les études rapportant des effets nuls et/ou négatifs des levures peuvent être moins publiés (publiables).

Au niveau de l'écosystème microbien, l'efficacité et le mode d'action des levures pour prévenir l'acidose latente semble dépendre des profils fermentaires (Brossard *et al.*, 2006 ; Chaucheyras-Durand *et Durand*, 2010). Elles stimuleraient les bactéries impliquées dans le métabolisme du lactate (*M. elsdenii*, *S. ruminantium*) pour des acidoses de type propionique, et les protozoaires pour des acidoses de type butyrique. Par ailleurs, il a été montré l'existence d'une période de latence entre le début de la supplémentation en levures et l'apparition des premiers effets bénéfiques chez les animaux supplémentés. Chez des moutons soumis à une succession de 3 stress acidogènes de 5 jours chacun (40% foin + 60% blé) séparés d'une période de repos de 21 jours (80% foin + 20% blé ;

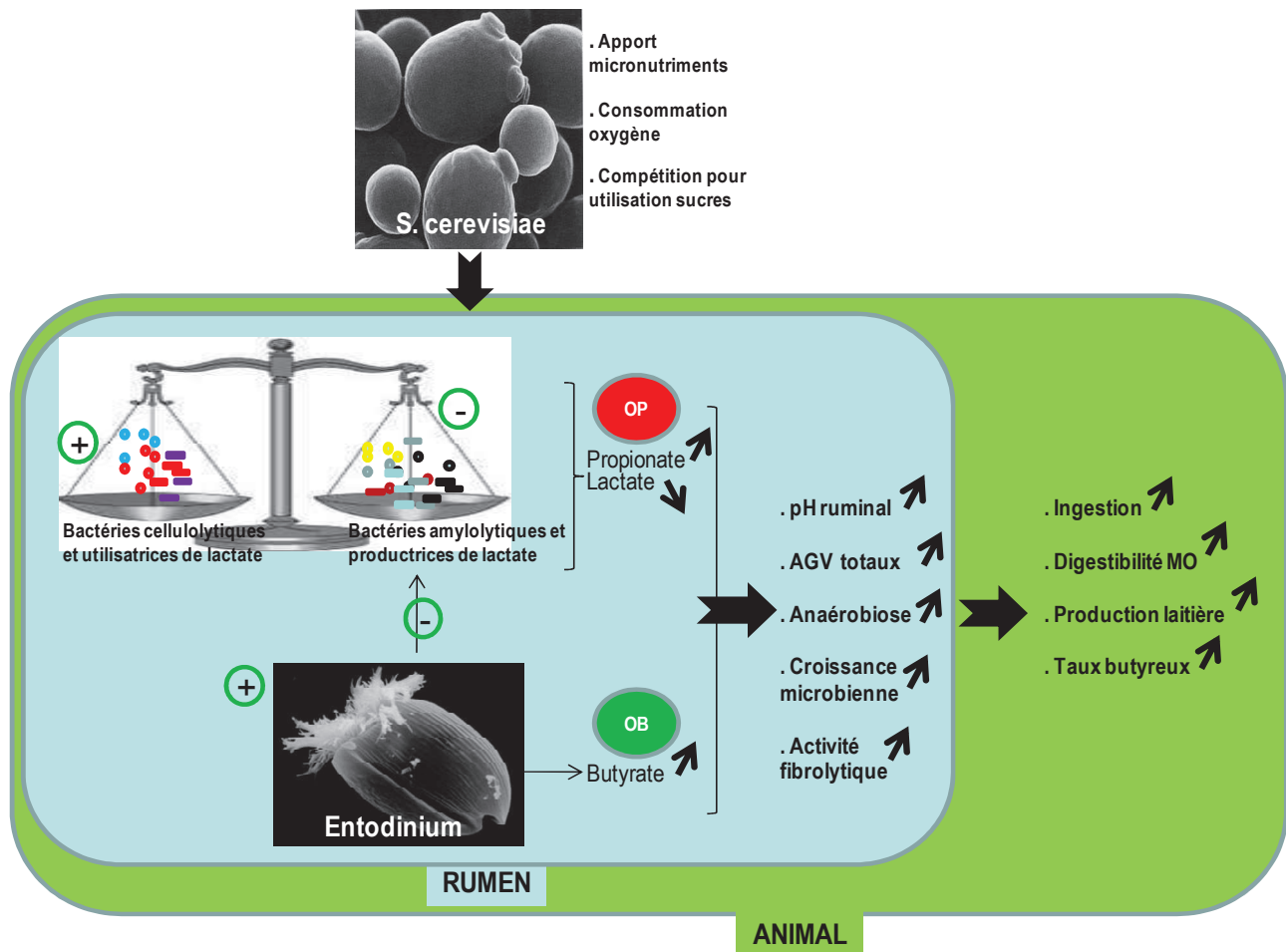


Figure 11. Mode d'action des levures à l'échelle du rumen et de l'animal pour prévenir l'acidose latente et améliorer les performances zootechniques.

Commentaires : OP = orientation propionique / OB = orientation butyrique. Les symboles (+) indiquent une stimulation de la croissance via l'apport de micronutriments et l'amélioration de l'anaérobiose via la consommation de l'oxygène. Les symboles (-) indiquent des effets négatifs liés à des phénomènes de compétition et/ou de prédation.

Silberberg *et al.*, 2008), l'amélioration du pH n'a été observée qu'à partir du 2<sup>e</sup> stress (Figure 10). Parallèlement, une diminution de *S. bovis* et des lactobacilles (producteurs de lactate), un maintien de la flore cellulolytique et une plus grande diversité bactérienne ont été observés avec la succession des challenges. Cet effet bénéfique sur la diversité bactérienne confirme les observations faites chez des chèvres laitières après cinq semaines de supplémentation en levures d'un régime acidogène (Desnoyers *et al.*, 2008). Au contraire, l'**effet levure** au niveau du rumen semble disparaître aussitôt après l'arrêt de la distribution. Ce temps de latence est probablement le temps nécessaire à l'écosystème microbien pour s'adapter à l'apport de levures mais aussi celui requis pour que les levures exercent leurs actions (amélioration de l'anaérobiose par consommation de l'oxygène, libération de nutriments et facteurs de croissance, compétition pour le glucose avec les bactéries productrices de lactate, ...). Un schéma général résumant le mode d'action des levures pour prévenir l'acidose latente chez le ruminant est disponible (Figure 11).

### 1.3.2. Les bactéries probiotiques : amélioration de la santé animale

Par opposition aux levures, l'utilisation des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose ruminale latente constitue un nouveau champ de recherche et les rares données actuellement disponibles dans la littérature ont fait l'objet d'une analyse quantitative que nous discuterons dans le Chapitre 3 de cette bibliographie. Ici, nous nous limiterons à présenter leurs effets sur la santé animale.

Le jeune ruminant est particulièrement sensible au développement de germes pathogènes (*E. coli* enterotoxique, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., ...) responsables de diarrhées à l'origine d'une baisse des performances de croissance, une augmentation des coûts vétérinaires et pouvant également causer la mort de l'animal (plus 50% des diarrhées et 60% de la mortalité survient dans les premières semaines de la vie). Concernant l'utilisation des bactéries probiotiques chez le veau, la supplémentation en *E. coli* Nissle 1917 (von Buenau *et al.*, 2005) ou en *Lactobacillus* spp. (Timmerman *et al.*, 2005) a montré des effets intéressants en diminuant les épisodes de diarrhées et les coûts vétérinaires associés (de Vrese et Marteau, 2007 ; Timmerman *et al.*, 2005 ; von Buenau *et al.*, 2005).

Chez le ruminant adulte, outre la volonté d'améliorer les performances zootechniques, les bactéries probiotiques sont très utilisées afin de réduire le portage de la l'entérobactérie *E. coli* O157:H7. Cette souche est présente naturellement dans le tractus digestif des ruminants et sa prévalence dans les fèces de bovins viande est estimée entre 15 et 28% (Brashears *et al.*, 2003). La contamination des carcasses peut se faire *via* un contact direct avec les matières fécales ou avec la peau de l'animal mais aussi de manière indirecte du fait d'un manque d'hygiène du personnel lors de l'abattage des animaux.

*E. coli* O157:H7 est responsable de toxi-infections alimentaires graves (Maladie du Hamburger) mais aussi de pertes économiques lorsque les produits contaminés doivent être détruits. Plusieurs études récentes ont montré que **l'utilisation des *Lb. acidophilus* seuls** (Stephens *et al.*, 2007a ; Stephens *et al.*, 2007b) **ou associés à *P. freudenreichii*** (Brashears *et al.*, 2003 ; Elam *et al.*, 2003 ; Tabe *et al.*, 2008 ; Younts-Dahl *et al.*, 2004 ; Younts-Dahl *et al.*, 2005) **permettait de réduire la prévalence de ce germe chez les bovins viande**. Une étude récente utilisant des spores *Bacillus subtilis* 166 (Arthur *et al.*, 2010) n'a pas eu d'effet sur *E. coli* O157:H7. Pour les auteurs, l'inefficacité de l'additif serait due soit au fait que les spores n'aient pas eu le temps de germer ou que le probiotique n'ait pas été en contact avec *E. coli* pour exercer son effet. D'autre part, l'association de bactéries lactiques à la levure *S. cerevisiae* (*Lb. acidophilus* BT1386 + *S. cerevisiae* BP-31702) n'a pas été efficace pour réduire la prévalence d'*E. coli* dans les 3 zones testées : fèces, zone périnéale et jarret (Stephens *et al.*, 2010). Les auteurs ont par contre montré que parmi les 3 échantillonnages, la zone périnéale serait la plus sensible pour le dépistage d'*E. coli* O157:H7.

A notre connaissance, une seule étude a été conduite chez les ovins. Il a été montré une diminution de la prévalence de *E. coli* O157 H7 en utilisant la bactérie productrice de lactate *S. faecium* seule, ou en association avec d'autres bactéries lactiques (*S. faecium* + *Lb. acidophilus* et *S. faecium* + *Lb. acidophilus* + *Lb. fermentum* + *Lb. casei* + *Lb. plantarum*) mais pas lorsque *Lb. acidophilus* a été utilisée seule (Lema *et al.*, 2001).



#### 1.4. Les bactéries lactiques (LAB)

Les bactéries lactiques (Lactic Acid Bacteria ou LAB) constituent un groupe hétérogène de bactéries bénéfiques (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, ...) qui ont en commun la capacité de produire de l'acide lactique comme produit final des fermentations. Cette propriété est exploitée par l'homme depuis des milliers d'années pour la production de produits fermentés. Aujourd'hui les propriétés métaboliques de ces bactéries sont encore exploitées mais à plus grande échelle et l'une de leur application consiste à les utiliser comme probiotiques pour améliorer la santé humaine et animale grâce à leur effets bénéfiques sur la microflore de l'hôte (Bernardeau *et al.*, 2006). En plus de l'effet santé, chez l'animal, cette supplémentation a aussi pour but d'améliorer la croissance (efficacité alimentaire, gain de poids, production lait). Parmi les bactéries lactiques, les lactobacilles appartenant au phylum des *Firmicutes* sont de loin les plus utilisés et ce depuis plusieurs milliers d'années. Cette longue histoire d'utilisation n'est sans doute pas étrangère au fait que 36 espèces sont reconnues comme QPS et/ou GRAS (Tableau 5). Les lactobacilles sont des bactéries Gram +, non sporulantes anaérobies à aérobies facultatives. Ces bactéries ubiquistes sont très répandues dans l'environnement végétal, animal et humain et forment un groupe très hétérogène au niveau morphologique, métabolique et phylogénétique (Tailliez, 2004). Au sein des lactobacilles, on distingue 3 groupes sur la base de l'ADNr 16S (Tailliez, 2004) :

- a) groupe *Lb. delbrueckii* : homofermentaires stricts incapables de fermenter les pentoses : ils possèdent une fructose-1,6-diphosphate aldolase (FDP) qui scinde les hexoses en 2 molécules de triose pour donner deux molécules de lactate;
- b) groupe *Weissella paramesenteroides* (anciennement *Leuconostoc paramesenteroides*) : hétérofermentaires stricts : ils ne possèdent pas de FDP mais une phosphocétolase qui scinde les pentoses en lactate et acétate ;
- c) groupe *Lb. casei/Pediococcus* : hétérofermentaires facultatifs : ils métabolisent les hexoses par homofermentation et sont aussi capables de métaboliser les pentoses grâce à une phosphocétolase inductible (Figure 12).

Le but de cette partie n'est pas de faire une revue détaillée sur les lactobacilles mais seulement de présenter quelques caractéristiques des souches qui seront utilisées dans notre travail expérimental : ***Lb. plantarum* Lp-115 et *Lb. rhamnosus* Lr-32.**

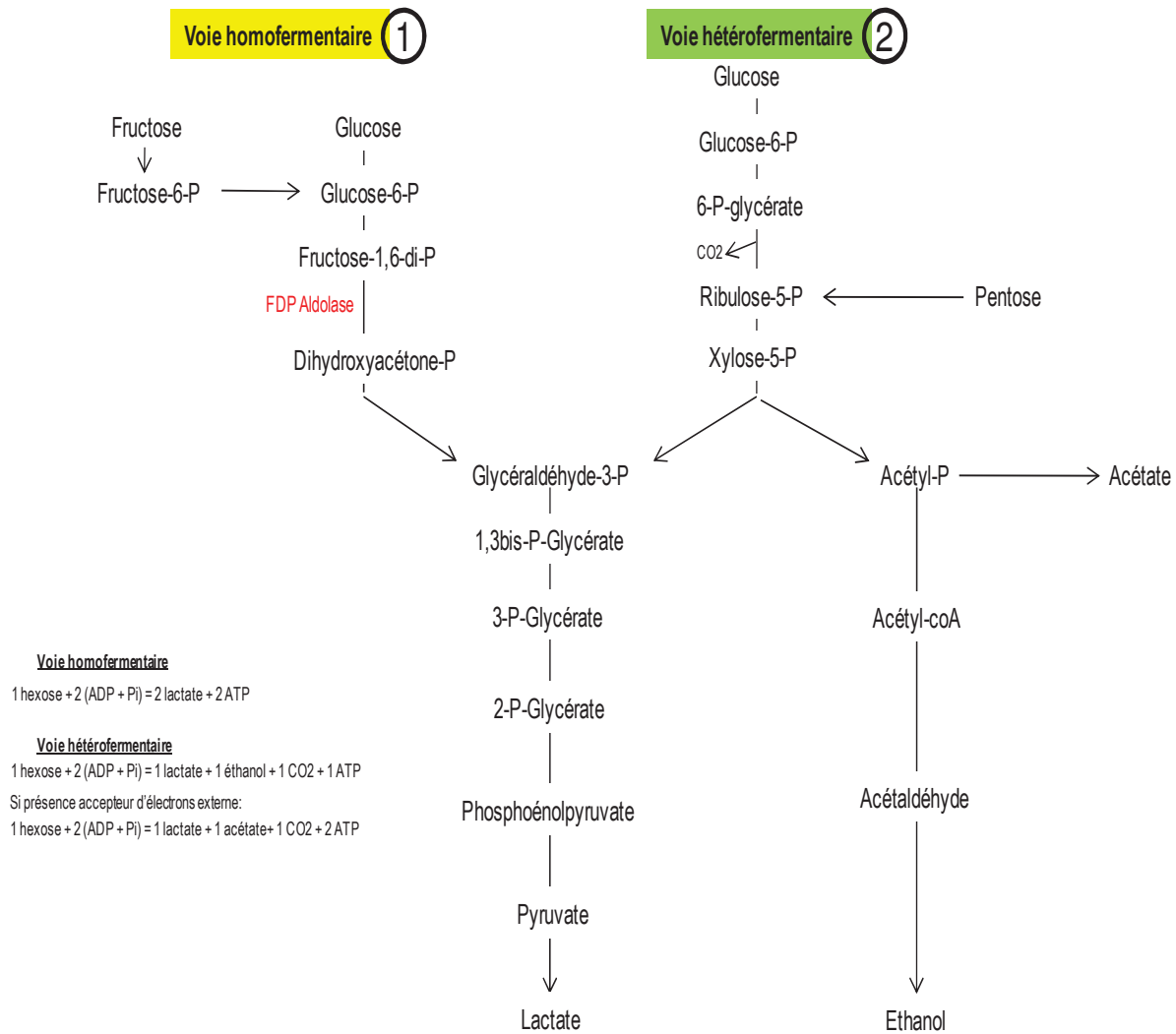


Figure 12. Représentation schématique des voies homo et hétérofermentaires chez les lactobacilles. Les nombres 1 et 2 indiquent les voies métaboliques impliquées qui sont respectivement la glycolyse et la voie des pentoses-phosphates phosphocétolase.

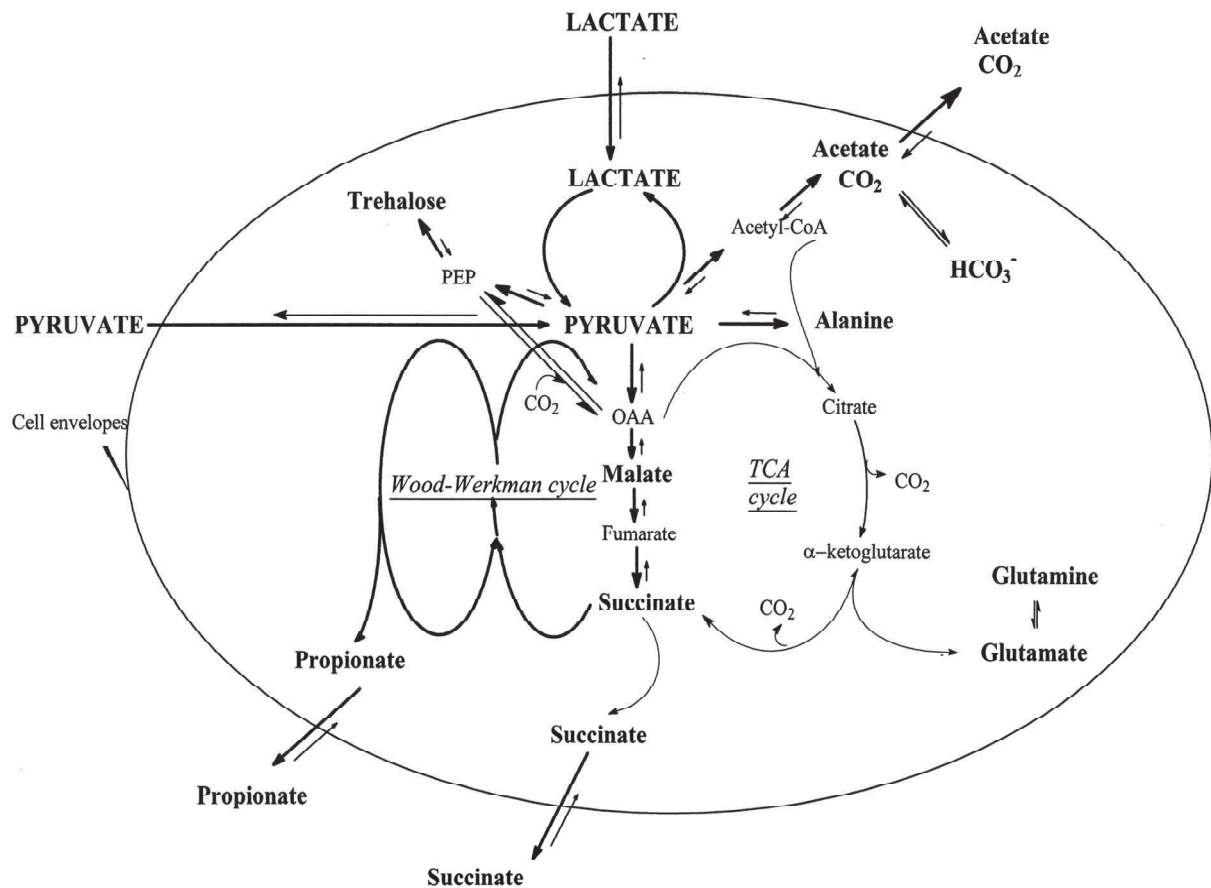
### 1.4.1. Les souches *Lb. plantarum* Lp-115 et *Lb. rhamnosus* Lr-32

Les espèces *Lb. plantarum* et *Lb. rhamnosus* dont sont issues les souches Lp-115 et Lr-32 appartiennent au groupe *Lb. casei*/Pediococcus. Si ces deux espèces sont toutes deux hétérofermentaires facultatives, le ratio des isomères L-lactate/D-lactate produit diffère (Tableau 8) puisque *Lb. rhamnosus* produit majoritairement du L-lactate alors que *Lb. plantarum* produit une quantité équivalente des deux formes (Manome *et al.*, 1998).

	<i>Lb. rhamnosus</i> Lr-32	<i>Lb. plantarum</i> Lp-115
<b>Source</b>	commercial strains (Danisco)	
<b>Strain deposit</b>	ATCC Number: SD5217	ATCC Number: SD5209
<b>Morphology</b>	Gram positive non sporulating rods of varied lengths, commonly occurring in short chains	
<b>Origin</b>	Plant	Unknown
<b>Metabolism</b>	Facultative heterofermentative (D/L-Lactate : 50/50)	Facultative heterofermentative (D/L-Lactate : 5/95)
<b>Safety status</b>	QPS	QPS and GRAS
<b>Main effects (Human / Mice)</b>	Resist to gastrointestinal tract environment; Compete with pathogens for adhesion sites; Immunomodulation	

Tableau 8. Caractéristiques de *Lb. plantarum* Lp-115 et *Lb. rhamnosus* Lr-32 (source : <http://www.daniscodietarysupplements.com/index.php>)

Jusqu'à présent, les études menées avec Lp-115 et Lr-32 avaient pour but de stimuler le système immunitaire de l'hôte et sont déjà commercialisées pour l'homme sous l'appellation **FloraFIT®** comprenant une gamme d'espèces probiotiques à utiliser seules ou en association. Comme l'exige la définition d'un probiotique, les deux souches sont capables de résister aux conditions drastiques (pH acide, bile) du tractus digestif, d'adhérer à la muqueuse intestinale (Collado *et al.*, 2008 ; Collado *et al.*, 2007 ; Ding et Shah, 2007) et de stimuler l'immunité chez l'hôte (Daniel *et al.*, 2006 ; Foligne *et al.*, 2007 ; Paineau *et al.*, 2008). Bien qu'aucune étude n'ait encore montré la production de bactériocines par les souches précitées, ce mécanisme ainsi que la production d'autres métabolites antimicrobiens est une caractéristique commune des LAB. La combinaison de tous ces facteurs permet aux LAB de coloniser le tractus digestif pour empêcher l'installation d'une flore pathogène. Cette compétition pour les sites d'adhésion mais aussi pour les nutriments constitue le mécanisme d'**exclusion compétitive**,



Equation théorique de la fermentation du lactate:  
 $3 \text{ lactate} \rightarrow 2 \text{ propionate} + 1 \text{ acétate} + 1 \text{ CO}_2 + 1 \text{ H}_2\text{O}$

Figure 13. Métabolisme carboné chez *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Les abréviations OAA et PEP signifient respectivement oxaloacétate et phosphoénolpyruvate (d'après Deborde et Boyaval, 2000).

et est sans doute responsable des résultats prometteurs de l'utilisation des lactobacilles en santé humaine (maladies inflammatoires du tube digestif, intolérance au lactose, diarrhées à *rotavirus* et allergies chez l'enfant, ...).

Chez l'animal, leur utilisation est en cours de recherche sur les ruminants et les monogastriques (porcs et équidés). Pour le moment, en plus de nos travaux qui seront développés dans la suite du manuscrit, des essais sur les équidés (cheval athlète) ont été conduits par l'équipe de V. Julliand à AGROSUP Dijon en partenariat avec Danisco. Les résultats obtenus sont intéressants car chez le cheval, la digestibilité des fibres a été améliorée de 3,6% en moyenne suite à la supplémentation avec Lp-115 et la bactéries propioniques P63 (Faubladier *et al.*, 2010 ; Goachet *et al.*, 2010). Cette amélioration de la digestibilité des fibres a fait l'objet d'un dépôt de brevet en 2010 (Berger, 2010).

### 1.5. Les bactéries propioniques (PAB)

Les bactéries propioniques (propionibactéries ou PAB pour Propionic Acid Bacteria) appartiennent au phylum des *Actinobacteria* également appelé HGCGPB pour High GC Gram positive Bacteria. Ce sont des bactéries Gram +, pléomorphes, non mobiles, non sporulantes, anaérobies à aérotolérantes et mésophiles. Elles n'ont pas d'exigences nutritionnelles particulières mais nécessitent la présence de biotine et de vitamine B5 pour croître. Selon leur habitat, on peut classer les propionibactéries en 2 groupes :

a) Les PAB cutanées : ce groupe comprend les espèces pathogènes opportunistes<sup>15</sup> *Propionibacterium acnes*, *P. avidum*, *P. granulosum*, *P. innocuum* et *P. propionicum* (Perry et Lambert, 2006). Ces espèces sont pathogènes, et l'espèce la plus connue est *P. acnes* responsable entre autres de l'acné chez les adolescents mais aussi d'autres pathologies chez l'homme ;

b) Les PAB laitières ou classiques : ce groupe est formé des espèces *P. jensenii*, *P. acidipropionici*, *P. thoenii* et *P. freudenreichii* qui comprend les sous-espèces *P. freudenreichii* subsp. *freudenreichii* et *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, qui contrairement à la première fermente le lactose mais ne réduit pas les nitrates (<http://www.bacterio.cict.fr>). Parce que nous nous intéressons au potentiel probiotique des PAB, nous ne parlerons ici que des PAB laitières. Ces dernières fermentent les sucres et le lactate grâce à un métabolisme original et complexe (Figure 13) impliquant plusieurs cycles (Deborde et Boyaval, 2000 ; Falentin *et al.*, 2010 ; Piveteau, 1999), et utilisent préférentiellement le L-lactate (Piveteau, 1999). Récemment, le séquençage et l'annotation du génome de *P. freudenreichii* CIRM-BIA1 a montré la présence de gènes codant pour des perméases spécifique du

<sup>15</sup> Pathogène opportuniste : microorganisme habituellement inoffensif mais pouvant devenir pathogène chez un sujet compromis (immunodéficience, ...).

### Séquence de l'ADNr 16S de P63 (5' – 3')

AGAGTTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGG [REDACTED] GGGGTACACGAGTGCGCAACG  
GGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCATCACTTCGGGATAACGCTAGGAACTGGTGCTAATACCGGATATGAGCTCTCATCGCATGGTGGGGTTG  
GAAAGTTCTGGCGGTGGTGGATGGACTCGCGTCTATCAGCTTGTGGTGGAGTTGTGGCTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGT  
GACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCTACGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCC  
CGGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGT [REDACTED] GTGCCTTCGGGGTGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGGGTGATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTGATCAGTCGGAAGTGAA  
AACTTGGGCTTAAACCCTGGGCGTCTTCGATACGGGTTGACTTGAGGAAGGTAGGGGAGAATGGAATTCCTGGT [REDACTED]  
TCAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGTCTCTGGACCTTCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGCTTAGATACCCTGGTAG  
[REDACTED] TGTGGGGTCCATTCCACGGATTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCG  
CAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAGCGCGGAGCATGCGGATTAATTGATGCAACGCAAGAACCTTACCTGGGTTTGACA  
TGGATTGTAACGGTCAGAGATGGCCGCCCTTGTGGGCCGATTACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCACTGTTGCCAGCAATTCGGTTGGGGACTCAGTGGAGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACG [REDACTED] CGACACTGTGAGGTGGAGCGAATCTCAAAAAG  
CCAGTCTCAGTTCGGATTGGGCTGCAACTCGACCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGG  
GCTTGTACACCCGCCCGT

### SeqMatch : Result

**Seqmatch:** version 3  
**RDP Data:** release 10.22  
**Data Set:** both type and non-type strains, both environmental (uncultured) sequences and isolates, near-full-length sequences (≥1200 bases), good quality sequences  
**Comments:** 615916 sequences were included in the search  
The screening was based on 7-base oligomers  
**Query Submit Date:** Mon Dec 06 08:08:54 EST 2010

Match hit format: short ID, orientation, similarity score, S\_ab score, unique common oligomers and sequence full name. More [help is available](#).

**Lineage:** no rank Root

**Results for Query Sequence:** unknown, 1316 unique oligos

**domain** Bacteria (20) (match sequences)

phylum "Actinobacteria" (20)

class Actinobacteria (20)

subclass Actinobacteridae (20)

order Actinomycetales (20)

suborder Propionibacterineae (20)

family Propionibacteriaceae (20)

genus Propionibacterium (20)

<a href="#">S000128362</a>	not_calculated	0.925	1115	Propionibacterium jensenii; DSM 20535.; X53219
<a href="#">S000128363</a>	not_calculated	0.859	1224	Propionibacterium thoenii; DSM 20276.; X53220
<a href="#">S000328225</a>	not_calculated	0.881	1415	Propionibacterium acidipropionici; DH42; AY360222
<a href="#">S000352749</a>	not_calculated	0.866	1371	Propionibacterium acidipropionici; type strain: NCFB 563; AJ704569
<a href="#">S000352751</a>	not_calculated	0.888	1383	Propionibacterium jensenii (T); type strain: DSM 20535; AJ704571
<a href="#">S000352752</a>	not_calculated	0.877	1372	Propionibacterium thoenii (T); type strain: NCFB 568; AJ704572
<a href="#">S000389739</a>	not_calculated	0.860	1411	Propionibacterium microaerophilum (T); M5; AF234623
<a href="#">S000412246</a>	not_calculated	0.875	1178	Propionibacterium acidipropionici; ATCC 4965; AY533299
<a href="#">S000539933</a>	not_calculated	0.840	1391	Propionibacterium jensenii; NCFB 571; AJ937773
<a href="#">S000925785</a>	not_calculated	0.842	1361	Propionibacterium sp. ADS25; AM884909
<a href="#">S001792893</a>	not_calculated	0.881	1398	Propionibacterium acidipropionici; JCM 6432; AB536774
<a href="#">S001792990</a>	not_calculated	0.881	1398	Propionibacterium acidipropionici; JCM 6431; AB538432
<a href="#">S001872323</a>	not_calculated	0.877	1258	Propionibacterium sp. HK-1; AB540663
<a href="#">S002117690</a>	not_calculated	0.961	1272	uncultured bacterium; ncd334c05c1; HM312664
<a href="#">S002121449</a>	not_calculated	0.958	1275	uncultured bacterium; ncd306a02c1; HM316423
<a href="#">S002151402</a>	not_calculated	0.851	1321	Propionibacterium acidipropionici; LET 102; FN824482
<a href="#">S002151403</a>	not_calculated	0.847	1320	Propionibacterium acidipropionici; LET 103; FN824483
<a href="#">S002151405</a>	not_calculated	0.855	1325	Propionibacterium acidipropionici; LET 105; FN824485
<a href="#">S002151407</a>	not_calculated	0.846	1314	Propionibacterium acidipropionici; LET 107; FN824487
<a href="#">S002151409</a>	not_calculated	0.849	1325	Propionibacterium acidipropionici; LET 109; FN824489

Figure 14. Séquence 16S de P63 (fournit par X. Smith, Danisco USA) et résultats d'alignement obtenu sur la base de données RDP (Ribosome Data Project ; <http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>).

L-lactate mais pas du D-lactate (Falentin *et al.*, 2010); ceci concorde avec l'utilisation préférentielle de l'isomère L-lactate citée précédemment (Piveteau, 1999).

Les PAB laitières sont importantes pour la fabrication de fromages de type Emmental (PAB responsables des trous et des qualités organoleptiques), la production biologique de propionate et de vitamine B12 ainsi que pour leurs propriétés probiotiques (Falentin *et al.*, 2010 ; Jan *et al.*, 2001 ; Meile *et al.*, 2008 ; Piveteau, 1999). L'utilisation des bactéries propioniques comme probiotiques est une piste prometteuse aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010 ; Cousin *et al.*, 2010 ; Falentin *et al.*, 2010). Comme on pourrait s'y attendre, les effets bénéfiques reconnus aux PAB sont similaires à ceux des lactobacilles et des bifidobactéries. Brièvement, en annotant le génome de *P. freudenreichii* reconnue comme GRAS et QPS, Falentin *et al.* (2010) ont remarqué la présence de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion à l'épithélium intestinal, l'immunostimulation, la résistance aux conditions ardues du tractus digestif (bile, température, pH, ...), et la production de molécules bifidogènes. Ces résultats sont en accord avec des données déjà rapportées *in vitro* et *in vivo* pour les espèces *P. freudenreichii*, *P. jensenii* et *P. acidopropionici* (Boyaval *et al.*, 1999 ; Huang *et al.*, 2003 ; Jan *et al.*, 2001 ; Lan *et al.*, 2007 ; Leverrier *et al.*, 2005 ; Ouwehand *et al.*, 2002b ; Pérez Chaia *et al.*, 1999). D'autre part, *P. freudenreichii* a la propriété de convertir l'acide linoléique en acide linoléique conjugué (CLA) (McIntosh *et al.*, 2009 ; Rainio *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2007) ayant des propriétés anticancéreuses (Doreau *et al.*, 2009). Ces CLA sont retrouvés dans les produits animaux (lait, viande) leur conférant ainsi un intérêt nutritionnel qui s'ajoute aux propriétés probiotiques citées précédemment. Bien que non citée au dessus, la faculté de produire des CLA est partagée par les lactobacilles (Alonso *et al.*, 2003 ; Kishino *et al.*, 2003 ; Macouzet *et al.*, 2009). Pour une recherche plus détaillée du potentiel probiotique des PAB chez l'homme, on peut se reporter à deux revues récentes sur le sujet (Cousin *et al.*, 2010 ; Falentin *et al.*, 2010).

### 1.5.1. La souche *Propionibacterium P63*

Après avoir introduit le potentiel probiotique des PAB, la suite de cette partie sera consacrée à décrire la souche **P63** sur laquelle porte ce travail de thèse. L'identité de P63 n'est pas clairement établie dans la littérature. Bien qu'elle soit identifiée comme *P. jensenii* dans l'étude ayant permis sa sélection parmi plusieurs souches affiliées aux espèces *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. acidopropionici* et *P. thoenii* (Parrott *et al.*, 2001), et les trois brevets relatifs à son utilisation chez la volaille (Rehberger, 1999) le porc et les ruminants (Rehberger *et al.*, 2002) et les équidés (Berger, 2010) ; elle a été identifiée comme étant une souche de *P. freudenreichii* dans trois essais publiés sous forme de résumés (les seuls existants) et rapportant son utilisation pour réduire le risque d'acidose ruminale et



améliorer les performances zootechniques chez des veaux nouvellement sevrés (Swinney-Floyd *et al.*, 1999) nourris avec des rations acidogènes. Ce flou autour de l'identité de P63 peut s'expliquer par la technique d'identification utilisée puisque sur la base de critères biochimiques, P63 serait une souche de *P. freudenreichii* alors que les techniques moléculaires utilisant l'ADNr 16S l'identifient comme *P. jensenii* (X. Smith, communication personnelle) ce qui est cohérent avec le résultat obtenu en comparant la séquence 16S de P63 aux milliers de séquences contenues dans la base de données RDP (Figure 14). Cette ambiguïté peut aussi s'expliquer par la réglementation qui régit l'utilisation des probiotiques en alimentation animale. En effet, contrairement à *P. jensenii*, *P. freudenreichii* est considérée comme GRAS et QPS, et elle figure sur la liste AAFCO (Tableau 5) autorisant son emploi comme additif zootechnique chez le ruminant aux USA. Il apparaît ici que le statut GRAS est beaucoup plus souple que le statut QPS sur l'identité des additifs zootechniques microbiens puisqu'une souche génétiquement apparentée à *P. jensenii* est commercialisée sous le nom de *P. freudenreichii*.

Alors qu'en Europe l'utilisation de P63 est en cours d'évaluation sur les ruminants (UR1213 Herbivores, Theix) et les équidés (AGROSUP, Dijon), elle est largement commercialisée aux USA. La souche P63 est la propriété de l'Oklahoma State University et la licence d'exploitation est détenue par la société AGTECH Product Inc. (actuellement Danisco après acquisition d'AGTECH en Novembre 2008). La souche *Propionibacterium* P63 est commercialement exploitée par les sociétés, Priority IAC (<http://www.forhealthycows.com/>) et Lallemand (<http://www.microcellgold.com/>) sous les appellations **DCP™** et **Micro-Cell® PB** respectivement. Elle est également commercialisée par la société Bio-Vet Inc. (<http://www.bio-vet.com/>) dans plusieurs produits où elle est associée à d'autres bactéries propioniques et/ou lactiques. Nous avons recensé deux études où P63 a été utilisée pour prévenir l'acidose chez les jeunes bovins nouvellement sevrés (Swinney-Floyd *et al.*, 1999) et la vache laitière (Schneider *et al.*, 2009). Dans les deux cas, les travaux ont été publiés sous forme de résumés lors de congrès. Dans l'étude de Swinney-Floyd *et al.* (1999), l'association de P63 avec *L. acidophilus* LA 53545 (autres appellations : LA BG2FO4 et BT 1386) a permis d'améliorer le gain moyen quotidien (GMQ) et l'efficacité alimentaire (Swinney-Floyd *et al.*, 1999). Bien qu'aucune donnée n'ait été présentée sur le pH ruminal, les auteurs ont conclu à une diminution du risque d'acidose chez les animaux supplémentés avec P63 + LA 53545 et ce travail a fait l'objet d'un brevet aux USA (Rehberger *et al.*, 2002). Aujourd'hui, l'additif développé a été enrichi en enzymes, levures, et prébiotiques et il est commercialisé aux USA (Priority IAC) sous l'appellation **P-One Program™** :

- ✓ P-One™ : *Lb. acidophilus* A4000h™ et A2020™
- ✓ DCP™ : *Propionibacterium* P63



- ✓ Enzymes : amylase, protéase,  $\beta$ -glucanase, hémicellulase
- ✓ *Saccharomyces cerevisiae*
- ✓ Mannanoligosaccharides (MOS)

Concrètement ce programme consiste à modifier la ration de base (augmentation de l'amidon et des protéines digestibles, diminution de la MAT) et à supplémenter les animaux avec le P-One Program™. La souche P63 est offerte aux animaux pendant 2 à 3 semaines environ (prepartum ou au cours de la lactation) afin d'établir une population stable de P63 dans le rumen puisque d'après **les informations commerciales** dont on dispose, il semblerait que P63 soit capable de coloniser le rumen (Zimmer, 1999). Après cette première étape, les animaux sont supplémentés avec le reste des ingrédients. Il en résulterait une stimulation de la production de lactate (par P-One™) qui serait métabolisé en propionate par P63. Si ce principe de supplémentation séquentielle paraît judicieux, **l'idée selon laquelle P63 puisse s'établir dans le rumen reste à démontrer**. Le P-One Program™ a été évalué par la société AGTECH dans 4 fermes américaines comptant 1000, 1100, 2700 et 4800 vaches laitières alimentées avec une ration acidogène. Au sein de chaque ferme le liquide ruminal a été prélevé à l'aide de sondes œsophagiennes et mesuré à différents temps après le repas du matin (+ 4h, + 7h et + 10h) sur 12 vaches en début de lactation et 12 au pic de lactation (288 prélèvements au total). Le statut acidotique des animaux a été évalué en utilisant le seuil pH < 5,5 proposé par Oetzel (2004). **Quels que soient le temps de prélèvement et la période de lactation (début ou pic) considérés, aucun signe d'acidose latente n'a été observé (Schneider et al., 2009)**. L'élément le plus surprenant est que les pH étaient supérieurs 6,5 pour tous les prélèvements postprandiaux. On peut donc se questionner sur l'origine de l'observation qui serait soit due à l'additif, preuve d'une efficacité exceptionnelle, ou alors à la technique d'échantillonnage par sonde œsophagienne réputée imprécise. En effet, un prélèvement précis et répétable sur plusieurs animaux est très difficile, sans oublier une éventuelle contamination par la salive conduisant à une surestimation du pH ruminal par cette technique comparée à la ruminocentèse par exemple (Enemark et al., 2002). **Enfin il n'est pas possible d'attribuer l'effet préventif de l'additif à P63 per se compte tenu des nombreux éléments constituant l'additif et l'absence d'animaux témoins dans le schéma expérimental.**

A ce jour, il n'existe à notre connaissance aucune étude *in vivo* démontrant une stabilisation du pH et/ou une amélioration des performances zootechniques par l'utilisation de P63 seule ou associée aux souches Lp-115 ou Lr-32.



## CHAPITRE 3 : INTERET DES BACTERIES PROBIOTIQUES DANS L'ALIMENTATION DES RUMINANTS EN SITUATION D'ACIDOSE

**Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article qui sera prochainement soumis à INRA  
Productions Animales**

A. LETTAT<sup>1,2</sup>, C. MARTIN<sup>1</sup>, P. NOZIERE<sup>1</sup>

1) INRA, UR1213 Herbivores, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 St Genès Champanelle

2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain, France

### INTRODUCTION

Jusque là, l'utilisation des bactéries probiotiques (**BP**) chez le ruminant adulte, avait pour but d'améliorer les performances zootechniques (augmentation de la production de lait et du gain de poids des animaux en engraissement) et de réduire le portage de bactéries pathogènes (*E. coli* O157:H7, Salmonelles ; essentiellement chez les bovins à l'engrais). Les bactéries utilisées sont principalement des souches issues des genres *Lactobacillus* et *Propionibacteria*. Les hypothèses quant aux mécanismes impliqués sont que l'utilisation conjointe des bactéries lactiques et propioniques permettrait au niveau du rumen une production accrue de lactate qui serait métabolisé par les propionibactéries en propionate. Le propionate, prélevé à hauteur de 90% en moyenne par le foie, constitue le principal (50-70%) précurseur de glucose *via* la néoglucogenèse (Brockman, 1990 ; Loncke *et al.*, 2009). Chez la vache laitière l'augmentation du glucose (provenant du propionate) permettrait d'augmenter la synthèse de lactose (glucose + galactose) dans la glande mammaire et par conséquent la quantité de lait (Francisco *et al.*, 2002 ; Stein *et al.*, 2006 ; Weiss *et al.*, 2008). Chez le ruminant à l'engrais, la disponibilité en glucose provenant du propionate limiterait sa production à partir des acides aminés glucoformateurs, ce qui les rend plus disponibles pour la synthèse de protéines musculaire (Lehloenya *et al.*, 2008a). Au niveau ruminal, l'hypothèse est que l'apport de bactéries productrices de lactate permettrait la production d'un niveau de lactate pouvant stimuler la croissance des bactéries utilisatrices. Ce mécanisme s'apparente à un **effet vaccin** permettant à la flore utilisatrice de lactate d'être efficace lors de situations nutritionnelles conduisant à l'apparition de l'acidose (Nocek *et al.*, 2002 ; Nocek *et al.*, 2003). Cependant, si cette théorie paraît logique dans des conditions d'acidose lactique, qu'en est-il réellement pour l'acidose latente, situation au cours de laquelle il n'y a pas d'accumulation de lactate ? Il faudra donc faire évoluer cette théorie comme étant un **moyen d'adaptation du microbiote à des**

**conditions anormalement acides** du fait d'une alimentation riche en GRF entraînant une baisse de pH par une accumulation d'AGV.

Afin de prévenir l'acidose latente chez le ruminant à haut potentiel de production, l'utilisation d'additifs microbiens semble constituer une solution efficace. Si les levures ont été largement étudiées (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010 ; Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008 ; Desnoyers *et al.*, 2009), l'utilisation des BP constitue un nouveau champ de recherche particulièrement intéressant car contrairement aux levures, les bactéries, et plus particulièrement celles d'origine ruminale, pourraient potentiellement mieux s'adapter aux conditions anaérobies du rumen et produire de meilleurs effets.

## MATERIEL ET METHODES

Parce que le nombre d'études relatives à l'utilisation des BP en condition d'acidose latente avérée est très faible (9 publications), nous avons rassemblé tous les essais au cours desquels les effets d'un apport de BP sur les performances zootechniques et/ou les paramètres fermentaires du rumen ont été étudiés avec des rations de base présentant un risque acidogène potentiel (plus de 30% de GRF dans la ration). L'ensemble des résultats de ces essais a été organisé dans une base de données regroupant un total de 35 expériences (86 traitements) :

- 20 sur la vache laitière : 56% de GRF en moyenne (varie entre 39 à 70%) ;
- 7 sur le bovin à l'engrais : 93 % de GRF en moyenne (varie de 83 à 96%) ;
- 7 sur le bovin en croissance : 85% de GRF en moyenne (varie de 56 à 100%) ;

Parce que les BP n'étaient pas toujours utilisées seules, nous avons analysé les réponses animales (fermentation et performances zootechniques) à l'apport de bactéries probiotiques seules (BP) et à l'apport simultané de BP associées à la levure *S. cerevisiae* (BP + levure **SC**). Par ailleurs, le type de BP utilisées (lactiques, propioniques et autres) a été pris en compte. Les réponses zootechniques analysées ont été : pour la vache laitière, la production laitière (PL), l'ingestion de la matière sèche (MSI), les taux butyreux (TB), protéique (TP) et de lactose (TL) ainsi que le nombre de cellules somatiques du lait ; pour les bovins à l'engrais ou en croissance, le poids vif (PV), la MSI, le gain moyen quotidien (GMQ) et l'efficacité alimentaire.

Les données ont été analysées graphiquement à l'aide du logiciel Minitab 15, afin de dissocier les variations intra et inter-expériences. Les variations intra expérience des paramètres ruminiaux et zootechniques liées aux apports de BP ont été calculées, en prenant en compte la nature des probiotiques (BP seules, vs. BP + levure SC).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Amélioration des performances zootechniques

#### 1.1. Vaches laitières

Peu d'études ont été entreprises pour évaluer l'effet des BP sur les performances zootechniques des vaches laitières même s'il est bien établi que l'acidose latente a des conséquences négatives sur les performances animales : ingestion, production et composition du lait (Gozho *et al.*, 2006,2007 ; Gozho *et al.*, 2005 ; Kleen *et al.*, 2003 ; Nocek, 1997). Au total, 19 études ont été recensées chez la vache laitière, dont 5 publiées sous forme de résumés incomplets (régime, % GRF, et dose de probiotiques non renseignés), et une étude sur les ovins (brebis) (Tableau 9). Les rations offertes aux animaux comportaient entre 39 et 70% de GRF avec une proportion moyenne de 54%. La plupart des rations comprenait des tampons. Les additifs utilisés étaient très diversifiés en termes d'espèces, de doses et d'associations utilisées. Les facteurs expérimentaux étaient les suivants :

- Bactéries lactiques seules : 3 expériences ;
- Bactéries lactiques + Levure *S. cerevisiae* : 4 expériences;
- Bactéries propioniques seules : 5 expériences (dont 3 contenant également *S. cerevisiae* dans la ration de base) ;
- Bactéries propioniques + Levure *S. cerevisiae* : 2 expériences ;
- Bactéries propioniques + bactéries lactiques : 2 expériences ;
- Autres bactéries : 3 expériences ;

Comparé aux vaches témoins (Tableau 10), l'analyse statistique a montré que l'utilisation des **BP seules** (qu'elles soient lactiques, propioniques ou autres) n'a en moyenne pas modifié significativement l'ingestion (- 0,27 kg/jr), la PL (+ 0,89 kg/jr), ni la composition du lait. En revanche, l'utilisation des BP (lactiques ou propioniques) **conjointement avec la levure *S. cerevisiae*** a permis d'augmenter la MSI (+ 1,70 kg/jr) et la PL (+ 2,36 kg/jr), sans affecter la composition du lait. Ce résultat suggère une synergie entre levures et bactéries, mais aucun essai n'a été directement focalisé sur l'étude de cette interaction. **Enfin, d'une manière plus générale, l'augmentation de la PL suite à la supplémentation en probiotiques est significativement liée à une augmentation de l'ingestion** ( $P < 0.001$  ; Figure 15).

Si l'on regarde plus en détail les résultats rapportés avec les bactéries seules, on remarque que les effets positifs les plus nets ont été observés avec les bactéries lactiques seules (lactobacilles et entérocoques). Toutefois, dans l'étude de Gomez-Basauri *et al.* (2001) l'apport de bactéries lactique

était jumelé à du mannanoligosaccharide (polymère de mannose extrait de la paroi de *S. cerevisiae*). En revanche, à l'exception des résultats de West *et al.* (2005) qui n'ont pas été publiés dans des revues scientifiques (West *et al.*, 2005), l'utilisation des bactéries propioniques seules (*P. freudenreichii* P169 ou PF24) ou en association avec des bactéries lactiques n'ont amélioré ni l'ingestion, ni la production laitière (Francisco *et al.*, 2002 ; Raeth-Knight *et al.*, 2007 ; Weiss *et al.*, 2008) alors que les souches PF24 (Bovamine™) et P169 (Danisco) sont commercialement exploitées aux USA. De la même manière, aucun effet n'a été observé suite à la supplémentation des vaches avec *P. bryantii* 25A (Chiquette *et al.*, 2008) et *M. elsdenii* NCIMB 41125 (Hagg *et al.*, 2010).

**Sur la base des données disponibles, l'amélioration des performances chez la vache laitière avec des bactéries probiotiques est avérée en utilisant des bactéries lactiques seules (des souches de *Lb. acidophilus* essentiellement) ou en associant des souches de bactéries lactiques (*Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* et *E. faecium*) ou propioniques (*P. freudenreichii* P169) à la levure *S. cerevisiae*.**

### 1.2. Bovins en croissance et à l'engrais

Nous avons recensés 15 expériences (35 traitements, Tableau 11), dans lesquelles les animaux étaient alimentés avec des rations comportant 89% de GRF en moyenne (de 56 à 100%). L'essentiel des rations comprenait des antibiotiques promoteurs de croissance. Les facteurs expérimentaux étaient les suivants :

- Bactéries lactiques seules : 5 expériences ;
- Bactéries lactiques + Levure *S. cerevisiae* : 1 expérience ;
- Bactéries propioniques seules : 3 expériences ;
- Bactéries propioniques + Levure *S. cerevisiae* : 1 expérience ;
- Bactéries propioniques + bactéries lactiques : 5 expériences ;

En moyenne, aucun effet des BP seules ou en association n'a été observé sur l'ingestion et sur l'efficacité alimentaire. Les effets les plus marqués sur le GMQ ont été comme attendu observés sur les bovins en croissance, mais aucun effet sur le GMQ n'a été observé sur les bovins en finition (Tableau 12). L'utilisation des bactéries lactiques seules ou associées à des propionibactéries constitue l'essentiel des données rassemblées (10 expériences sur 15). Les effets positifs les plus notables sur les performances (GMQ, efficacité) des bovins en croissance ont été observés avec l'association entre bactéries lactiques et propioniques (Swinney-Floyd *et al.*, 1999). La même tendance est observée sur

les bovins en finition (Rust *et al.*, 2000 ; Swinney-Floyd *et al.*, 1999). Les rares données sur le rumen disponibles au sein de ces essais ne permettent pas de dégager les mécanismes d'action impliqués.

**En conclusion, chez la vache laitière, l'amélioration de la production laitière n'est avérée que par l'utilisation de bactéries lactiques seules, ou alors en associant des bactéries lactiques ou propioniques à la levure *S. cerevisiae*. Ces effets semblent en partie expliqués par une augmentation de l'ingestion. Chez le bovin viande, les effets positifs sur la croissance ont été essentiellement obtenus par l'apport de bactéries probiotiques associant des bactéries lactiques et des bactéries propioniques (*Lb. acidophilus* et *P. freudenreichii*).**

Que ce soit chez la vache laitière ou chez le bovin en croissance, les effets relativement modérés observés sur les performances animales (lait, viande) ne peuvent être attribués exclusivement aux probiotiques utilisés (BP et BP + levure SC). En effet la présence de tampons et/ou de promoteurs de croissance dans les rations peuvent également avoir contribué à une stabilisation de l'écosystème.

## 2. Prévention de l'acidose ruminale

Jusqu'à ce jour, seules 20 expériences rapportent l'effet des bactéries probiotiques sur le pH et/ou les fermentations ruminales chez la vache laitière et le bovin en croissance (Tableau 13). Les rations acidogènes comportaient une proportion moyenne en GRF de 66% (de 39 à 100%). Parmi ces études, 11 (en gras dans le tableau) avaient pour but d'évaluer leur efficacité à maintenir le pH ruminal. Plusieurs espèces et associations d'espèces ont été évaluées :

- Bactéries lactiques seules : 3 expériences;
- Bactéries lactiques + Levure *S. cerevisiae* : 6 publications ;
- Bactéries propioniques seules : 4 publications ;
- Bactéries propioniques + Levure *S. cerevisiae* : 1 expérience ;
- Bactéries propioniques + bactéries lactiques : 2 expériences ;
- Autres bactéries : 4 expériences ;

### 2.1. Effets sur le pH ruminal

Chez la vache laitière, aucun effet significatif (Tableau 14) n'a été observé en utilisant des bactéries propioniques, que ce soit seules (Stein *et al.*, 2006) ou en association avec des bactéries lactiques (Raeth-Knight *et al.*, 2007) ; de même, aucun effet sur le pH n'a été observé avec les bactéries favorisant la production de propionate *P. bryantii* et *M. elsdenii* (Chiquette *et al.*, 2008 ; Hagg *et al.*, 2010). Les seules études rapportant un effet significatif sur le pH ont été obtenues par **l'association de bactéries lactiques avec la levure *S. cerevisiae*** (Chiquette, 2009 ; Nocek *et al.*, 2003). L'amélioration particulièrement importante dans l'étude de Chiquette (+0.43 unités), était associée à une variation des profils fermentaires au profit du propionate et du butyrate.

Chez des bovins en croissance, aucun effet significatif (Tableau 14) des BP n'a été observé sur le pH ruminal, quelle que soit la composition des BP étudiées : bactérie propionique seule, *P. acidopropionici* P15 (Ghorbani *et al.*, 2002) ou *P. freudenreichii* P169 (Lehloenya *et al.*, 2008a), ou associée à la bactérie lactique *E. faecium* 212 (Ghorbani *et al.*, 2002), ou à la levure *S. cerevisiae* (Lehloenya *et al.*, 2008a) ; bactérie lactique seule (EF212) ou associée à la levure *S. cerevisiae* (Beauchemin *et al.*, 2003).

En raison de la diversité des situations expérimentales entre les rares essais disponibles (types d'animaux, de régime, nature et dose des BP utilisées...), il est difficile de tirer une conclusion quant à



l'efficacité relative des différentes probiotiques. Toutefois, le regroupement des données suggère que **la régulation du pH ruminal par les BP n'est effective que lorsque le pH ruminal avec la ration de base est suffisamment faible** (Figure 16). On peut noter au passage que dans la seule étude ayant montré un effet de la supplémentation sur le pH (Chiquette, 2009), aucun antibiotique ni tampon n'était inclus dans la ration de base (pH initial de 5.41).

## 2.2. Effets sur les profils fermentaires

Les effets des BP sur les fermentations ruminales sont variables et en moyenne **assez faibles** : on observe généralement une augmentation des AGVT et de l'ammoniac (maximum = + 11 mM et + 43 mg/L, respectivement, Chiquette, 2008) et une diminution de la proportion d'acétate (maximum = - 4.8 mol / 100 mol, (Chiquette, 2009)), essentiellement au profit du propionate (maximum = + 7,7 mol / 100 mol, (Beauchemin *et al.*, 2003)). Une tendance similaire mais non chiffrée dans la publication a été rapportée dans d'autres travaux (Weiss *et al.* 2008 ; Chiquette, 2009). Concernant le lactate, les concentrations ont été soit indétectables (Beauchemin *et al.*, 2003 ; Ghorbani *et al.*, 2002 ; Lehloenya *et al.*, 2008a) ou alors < 10 mM, seuil généralement admis pour les cas d'acidose latente (Martin *et al.*, 2006), pour les autres essais. **Les rares données disponibles ne permettent pas de conclure si les associations BP + levures SC sont plus efficaces que les BP seules.**

## 2.3. Effets sur le microbiote ruminal

Malgré son implication directe dans l'acidose, seules 3 études (Beauchemin *et al.*, 2003 ; Chiquette, 2009 ; Ghorbani *et al.*, 2002) ont été recensées sur l'effet des BP sur le microbiote ruminal. Ghorbani *et al.* (2002) ont observé une diminution du nombre de bactéries amylolytiques et une augmentation de la des protozoaires suite à l'apport de *P. acidopropionici* P15, ce qui explique l'augmentation du butyrate dans leur étude. Cette stimulation des protozoaires est bénéfique car de par leur fonctions diverses (métabolisation du lactate, prédation des bactéries amylolytiques, séquestration de l'amidon qu'ils fermentent lentement en AGV, ...) ils contribuent à stabiliser le pH et les fermentations ruminales. Dans l'étude de Beauchemin *et al.* (2003), aucun effet n'a été observé suite à l'apport de *E. faecium* + *S. cerevisiae* alors que la supplémentation en *E. faecium* seul a augmenté le nombre de coliformes et avait tendance à diminuer le nombre de protozoaires, ce qui constitue un effet négatif pour l'animal. Enfin, dans l'étude de Chiquette (2009), l'effet préventif sur l'acidose n'a pas été associé une modification dans les populations cellulolytiques (*F. succinogenes*, *R. albus* et *R. flavefaciens*) et utilisatrices de lactate (*M. elsdenii*). **En résumé, si les connaissances sur le microbiote ruminal en situation d'acidose latente sont très limitées (cf. chapitre 1), celles sur l'effet des bactéries probiotiques utilisées pour la prévenir le sont encore davantage.**

**Il est difficile d'expliquer la variabilité de l'efficacité des traitements bactéries probiotiques pour stabiliser le pH ruminal compte tenu du faible nombre d'études, de la variabilité des conditions expérimentales, et du fait que l'essentiel des rations étudiées étaient supplémentées avec des tampons. Les effets bénéfiques les plus marqués ont été observés chez la vache laitière pour des associations bactéries lactiques + levures, lorsque le pH moyen initial était bas (5.4). Il est donc possible que ces effets ne soient pas spécifiques des bactéries probiotiques, mais des levures, dont les effets ont déjà été rapportés dans la littérature. Une action synergique des deux types microbiens n'est pas à exclure.**

### 3. Conclusions

L'analyse des données publiées nous permet de soutenir les conclusions suivantes :

- a) L'utilisation de bactéries probiotique peut améliorer la production laitière en stimulant l'ingestion. Les effets sont avérés avec des bactéries lactiques seules ou des associations bactéries (lactiques ou propioniques) + Levures (*S. cerevisiae*).
- b) L'utilisation de bactéries probiotique peut améliorer la croissance chez les bovins viande. Les effets sont avérés avec l'utilisation conjointe de bactéries lactiques + bactéries propioniques.
- c) Au niveau ruminal, l'efficacité des bactéries probiotiques pour contrôler les fermentations semble fortement dépendre du pH initial. Les effets positifs ont été observés avec l'utilisation conjointe de bactéries lactiques et de la levure *S. cerevisiae*.

*Synthèse bibliographique : Intérêts des bactéries probiotiques dans l'alimentation des ruminants en situation d'acidose*

Etude	Régime	% GRF	Distribution	% Amidon	% NDF	% ADF	% CP	Tampons	Animal	Nb Animaux	Traitement	Dose en UFC / jr	PV (kg)	MSI (/ jr)	PL (/ jr)	PL (kg)	TB (%)	TP (%)	TL (%)	Cellules (x 10 <sup>3</sup> / ml)
Jaquette et al. 1988	corn silage + alfalfa + pelleted grain										Témoin LA BT1386				29.1 <sup>a</sup> <b>30.9<sup>b</sup></b>	3.81 3.75	3.30 3.36			
Ware et al. 1988	alfalfa hay + silage + whole cottonseed + grain concentrate + protein										Témoin LA BT1386	2 x 10 <sup>9</sup>		21.2 21.4	31.8 <sup>a</sup> <b>33.6<sup>b</sup></b>	3.64 3.63				
Komari et al. 1999	tropical feeding conditions								VL		Témoin LA + SC			nr	8.2 <sup>a</sup> <b>9.28<sup>b</sup></b>	3.30 <sup>a</sup> <b>3.57<sup>b</sup></b>	3.09 3.13			
Block et al. 2000											Témoin SC + LP + EF	5 x 10 <sup>9</sup>		24.6 25.1	48.2 <sup>a</sup> <b>49.1<sup>b</sup></b>	3.01 <sup>a</sup> <b>3.27<sup>b</sup></b>				
Gomez-Basauri et al. 2001	corn silage + alfalfa/ grass hay + corp silage + whey + commercial feed blend										LA + LC+ EF + mannanigosaccharides	10 <sup>9</sup>		25 <sup>a</sup> <b>24.6<sup>b</sup></b>	38.8 <sup>a</sup> <b>39.6<sup>b</sup></b>	4.24 <sup>a</sup> <b>4.34<sup>b</sup></b>	3.02 3.04			
Nocek et al. 2003	16.8% corn silage + 28.6% Haylage + 8.5% HMEC + 20.9% ground shell cron + 1.6% wheat starch + 12% rumen inert fat + 9.9% protein supplement	54.6	ad lib		29.5	17.6	18.6	1% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0.007% limestone + 0.003 MgO		16	Témoin			18.6	34.2 <sup>a</sup>	3.67	3.40 <sup>a</sup>			
										16	EF + SC	5 x 10 <sup>9</sup>		20.5	<b>36.5<sup>b</sup></b>	3.88	<b>3.54<sup>b</sup></b>			
Nocek and Krautz 2006	9.8%haylages + 43.7%corn silage + 16.5%corn meal + 6.9%roasted soybeans + 17.9% protein	46	ad lib		30.6		18.4	1.4% limestone		22	Témoin		627	20 <sup>a</sup>	36.9 <sup>a</sup>	4.76 <sup>a</sup>	3.12	4.59 <sup>a</sup>	210	
										22	EF + SC	5 x 10 <sup>9</sup>	613	<b>22.7<sup>b</sup></b>	<b>39.2<sup>b</sup></b>	<b>4.44<sup>b</sup></b>	3.13	<b>4.65<sup>b</sup></b>	154	
Chiquette et al. 2008	20% grass silage + 20% corn silage + 41% barley grain + 8% soybean meal + 9% protein supplement	60			29.8		18.3	0.5% limestone		6	Témoin		nr	21.2	35.1	3.54 <sup>a</sup>	3.25			
										6	PB 25A	2 x 10 <sup>11</sup>		21.2	35.1	<b>3.87<sup>b</sup></b>	3.25			
Franclaco et al. 2002	31.9% sorghum/sudan silage + 21.25% alfalfa hay + 7.97% cottonseed + 0.86% rumofat + 37.18% grain mix (corn)	45			30.94	20.76	18.73	< 0.5% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , limestone et MgO		10	Témoin		616 <sup>a</sup>	23.9	40.9	3.20				
									VL multipares (début lactation)	9	P169	17 g		<b>667<sup>b</sup></b>	23.4	39.9	3.02			
Weiss et al. 2008	35.5% corn silage + 18% alfalfa silage + 19.6% ground corn grain + 4.8% soybean roasted meal + 10% roasted soybean + 6.3% soybean hulls	46.5		31.1	31.4		16.6	0.79% limestone + 0.35% Ca(HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> + 0.08% MgO + 0.2% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		25	Témoin		660	23.5 <sup>a</sup>	45.3	4.12	2.72	4.69		
										25	P169	6 x 10 <sup>11</sup>	643	<b>22.5<sup>b</sup></b>	44.9	4.00	2.73	4.72		
Hagg et al., 2010	31.9% lucerne hay + 7.9% eragrostis curvula hay + 35% ground maize meal + 3.9% molasses + 7.9% whole cottonseed + 10.2% soybean meal + 1.6% maize gluten 60	60	ad lib		28.2		25.1			15	Témoin			634	23.1	43.9	3.34	3.12	4.70	
								0.79% Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		15	Me NCIMB 41125	10 <sup>9</sup>		616	22.4	42.7	3.58	3.01	4.70	
Hagg et al., 2010	19.6% lucerne hay + 7.9% eragrostis curvula hay + 47.9% ground maize meal + 3.9% molasses + 7.5% whole cottonseed + 9.4% soybean meal + 2% maize gluten 60 + 0.27% urea	70	ad lib		23.8		25.9			15	Témoin			634	24.3	45.1	3.60	3.12	4.86	
										15	Me NCIMB 41125	10 <sup>9</sup>		616	23.8	44.2	2.88	3.18	4.81	
Ferguson et al., 2010	27.01% corn silage + 16.39% alfalfz haylage + 9.83% Grass haylage + 1.76% grass hay + 25.6%corn grain + 9.48% soybean meal 48 + 5.29% animal protein + 1.53% fat + 2.91% minerals/vitamins	60.5		26.7	34.4	22.2	14.1	?	VL (début à milieu lactation)	9	Témoin			22.02	33.8 <sup>a</sup>	3.57 <sup>a</sup>	2.89		832 <sup>a</sup>	
										10	P63 (avant vêlage) puis LA jusqu'à 22 semaines	?		21.3	33.3 <sup>a</sup>	<b>3.82<sup>b</sup></b>	2.91		2512 <sup>a</sup>	
										10	Bacillus pumilus 8G-134	5 x 10 <sup>9</sup>		21.91	<b>35.5<sup>b</sup></b>	<b>3.81<sup>b</sup></b>	2.88		93 <sup>b</sup>	
										10	Bacillus pumilus 8G-134	1 x 10 <sup>10</sup>		21.48	<b>35.1<sup>b</sup></b>	<b>3.68<sup>b</sup></b>	2.90		91 <sup>b</sup>	
Lehloeny et al. 2008b	25.2% corn silage + 20.75% alfalfa (RFV 180) + 38.2% grain mix + 6.53% whole cottonseed + 7.98% corn gluten feed	54	ad lib		39.6	26.9	16.5	< 0.5% CaCO <sub>3</sub> , Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> et MgO	VL multipares (début à fin lactation)	6	Témoin				30.7	4.78	3.02	4.92	116	
									VL primipares (début à fin lactation)	5	P169 + SC	6 x 10 <sup>11</sup> + 56 g	+		32.0	4.45	3.04	4.90	186	
									VL primipares (début à fin lactation)	4	Témoin				38.8 <sup>a</sup>	4.31 <sup>a</sup>	2.79	4.63 <sup>a</sup>	152 <sup>a</sup>	
										5	P169 + SC	6 x 10 <sup>11</sup> + 56 g	-		<b>44<sup>b</sup></b>	<b>3.97<sup>b</sup></b>	2.82	<b>4.79<sup>b</sup></b>	323 <sup>b</sup>	
Stein et al. 2006	48.5% grain mix + 16.4% sorghum silage + 16.94% alfalfa + 6.53% grass hay + 4.07% whole cottonseed + 6.6% corn gluten feed + <u>vestat</u>	60	ad lib		25.1	38.7	17.1	0.94% CaCO <sub>3</sub> + 0.54% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0.27% MgO	VL multipares (début à fin lactation)	8	Témoin				31.4 <sup>a</sup>	3.50	NS	4.93 <sup>a</sup>	169 <sup>a</sup>	
									VL primipares (début à fin lactation)	6	P169	6 x 10 <sup>10</sup>	+		<b>34<sup>b</sup></b>	3.50	NS	<b>4.89<sup>b</sup></b>	92 <sup>a</sup>	
										5	P169	6 x 10 <sup>11</sup>	+		<b>34.2<sup>b</sup></b>	3.60	NS	<b>5.00<sup>b</sup></b>	36 <sup>a</sup>	
										5	Témoin			31.4 <sup>a</sup>	3.80 <sup>a</sup>	3.00 <sup>a</sup>	4.77 <sup>a</sup>	169 <sup>a</sup>		
										8	P169	6 x 10 <sup>10</sup>			<b>34<sup>b</sup></b>	3.80 <sup>a</sup>	<b>3.11<sup>b</sup></b>	<b>4.91<sup>b</sup></b>	92 <sup>a</sup>	
										6	P169	6 x 10 <sup>11</sup>	-		<b>34.2<sup>b</sup></b>	<b>3.6<sup>b</sup></b>	<b>3.11<sup>b</sup></b>	<b>5.12<sup>b</sup></b>	36 <sup>a</sup>	
de Ondarza & Seymour 2008	26.9% corn silage + 25.2% alfalfa and grass haylage + 19.5% corn meal + 6.85% soybean meal + 6.7% whole cottonseed + 2.6% silage hulls + 2.25% carola meal + <u>0.23% yeast</u>	48	ad lib	22.66	32.6	21.98	18.34	1.1% CaCO <sub>3</sub> + 0.57% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0.11% MgO	VL multipares (début à fin lactation)	119	Témoin				43.1 <sup>a</sup>	3.57	2.79		243	
										115	PF169	6*10 <sup>10</sup>			<b>44.3<sup>b</sup></b>	3.47	2.82		161	
Raeth-Knight et al. 2007	47.9% corn silage + 3.3% corn grain + 35.9% protein mix + 12.9% alfalfa hay	39		24.1	28.8	15.6	17.2	< 0.5% MgO, Ca(HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> et Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	VL primi et multipares (milieu lactation)	18	Témoin			24.2	41.1	3.27	2.86	4.84	115	
										17	LA747 + PF24	10 <sup>9</sup> + 2 x 10 <sup>9</sup>		23.9	42.2	3.16	2.78	4.78	126	
										18	LA747 + PF24 + LA45	10 <sup>9</sup> + 2 x 10 <sup>9</sup> + 5 x 10 <sup>9</sup>		23.6	41.5	3.08	2.82	4.80	120	
West et al. 2005	31.6% corn silage + 7.4% alfalfa hay + 10.7% whole cottonseed + 21.86% steam-flaked corn + 2.46% corn grain + 9.3% soybean hulls + 9.32% soybean meal + 3.74% Prolac + 2.57% mineral-vitamins	61		26.74	16.31	20.34			VL (milieu lactation)	16	Témoin			25.5	37.7 <sup>a</sup>	3.19	2.95			
										16	PF + LA	100 g		26.2	<b>39.6<sup>b</sup></b>	3.23	2.94			
										16	PF + LA + LA'	100 g		26.3	<b>38.5<sup>b</sup></b>	3.40	3.00			
Kritas et al. 2006	1 kg corn + 0.3 kg soy + 0.25 kg alfalfa hay + pasture	64.5							Brebis	46	Témoin			0.80 <sup>a</sup>	7.10 <sup>a</sup>	5.30 <sup>a</sup>				
										48	Bacillus subtilis + Bacillus licheniformis	2.56 x 10 <sup>9</sup>		<b>0.90<sup>b</sup></b>	<b>7.70<sup>b</sup></b>	<b>5.88<sup>b</sup></b>				

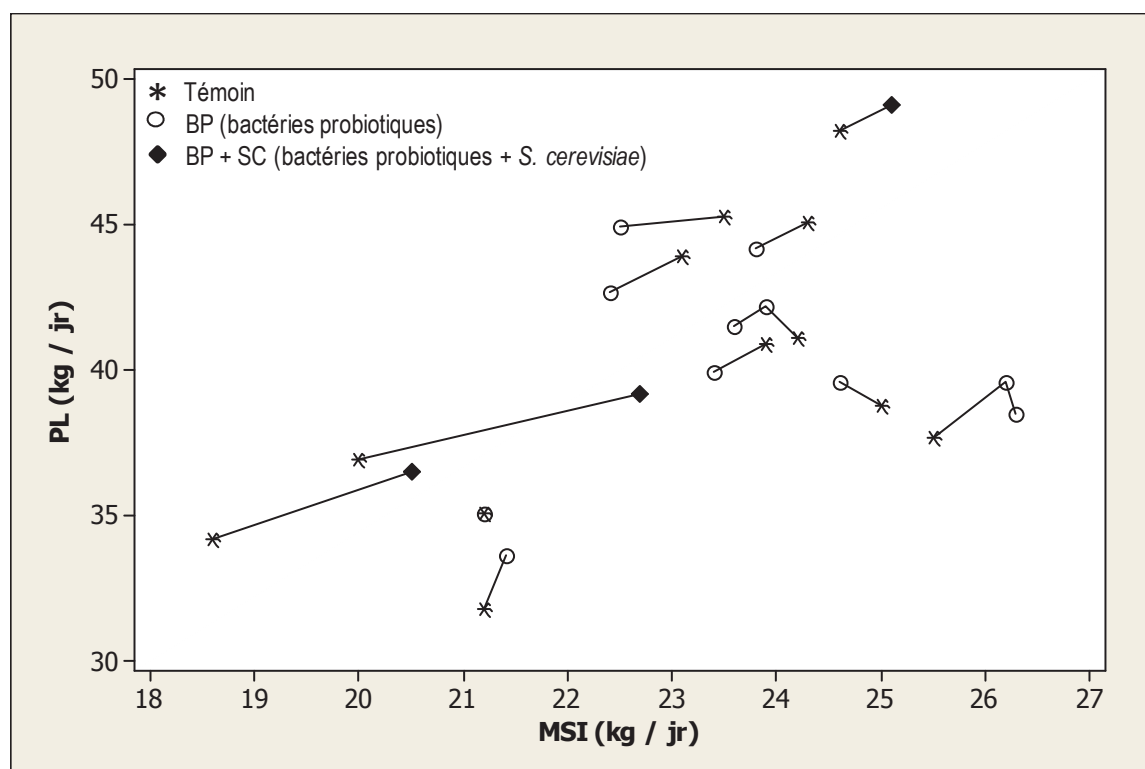
GRF = glucides rapidement fermentescibles; MSI = matière sèche ingérée; PL = production lait; TB = taux butyreux; TP = taux protéique; TL = taux de lactose; + = augmentation; - = diminution; VL = vache laitière; UFC = Unité formant Colonie; EF 212 = *E. faecium* souche 212; SC = Saccharomyces cerevisiae; PB = *Prevotella bryantii*; LP = *Lactobacillus plantarum*; LA = *Lactobacillus acidophilus*; PF = *Propionibacterium freudenreichii*; PF24 et PF169 = *P. freudenreichii* souche P24 et P169; P169 = *Propionibacterium jensenii*; LA 747, LA 45, LA BT1386 = *L. acidophilus* souches 747, 45 et BT1386; LC = *Lactobacillus casei*; LP = *Lactobacillus plantarum*; Me = *Megaspheara elsdoni*; les lettres a et b indiquent les résultats statistiquement significatifs (P < 0.1)

**Tableau 9. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées la levure *S. cerevisiae* sur l'ingestion, la production et la composition de lait chez la vache laitière.**

	PL (kg / jr)			MSI (kg / jr)		
	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N
BP	37,54	0,89 (± 1,45)	17	23,84	-0,27 (± 0,48)	11
BP + levure SC	33,26	2,36 (± 1,72)	5	21,07	1,70 (± 1,11)	3
	TB (%)			TP (%)		
	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N
BP	3,56	-0,04 (± 0,23)	17	2,99	0,02 (± 0,07)	13
BP + levure SC	4,01	-0,04 (± 0,33)	4	3,08	0,10 (± 0,10)	5
	TL (%)			Cellules (x 10 <sup>3</sup> / mL)		
	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N
BP	4,81	0,05 (± 0,13)	9	164	-69 (± 58)	7
BP + levure SC	4,61	0,11 (± 0,07)	2	181	57 (± 160)	2

BP = utilisation bactérie(s) probiotique(s) seule(s); BP + SC = association BP et *S. cerevisiae*; PL = production laitière; MSI = matière sèche ingérée; TB = taux butyreux; TP = taux protéique; TL = taux de lactose; cellules = nombre de cellules somatiques; Var = variation entre traitement et le témoin. Entre parenthèses figurent les écarts-types; N = nombre d'études incluses dans le dispositif.

**Tableau 10. Effet des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure *S. cerevisiae* sur les performances zootechniques des vaches laitières.**



**Figure 15. Relation entre production laitière (PL) et matière sèche ingérée (MSI) chez des vaches laitières supplémentées en bactéries probiotiques seules ou associées à la levure *S. cerevisiae*.**

Commentaire : Les données sont issues des publications suivantes : Block *et al.*, 2000 ; Chiquette *et al.*, 2008 ; Francisco *et al.*, 2002 ; Gomez-Basauri *et al.*, 2001 ; Hagg *et al.*, 2010a ; Hagg *et al.*, 2010b ; Nocek *et al.*, 2003 ; Nocek et Kautz, 2006 ; Raeth-Knight *et al.*, 2007 ; Ware *et al.*, 1988 ; Weiss *et al.*, 2008 ; West *et al.*, 2005.

*Synthèse bibliographique : Intérêts des bactéries probiotiques dans l'alimentation des ruminants en situation d'acidose*

Etude	Régime	% GRF	Distribution	% Amidon	% NDF	% ADF	% CP	Tampons / Antibiotiques	Nb Animaux	Traitement	Dose en UFC / jr	Poids (kg)	MSI (kg / jr)	GMQ (kg / jr)	Efficacité (GMQ / MSI)	
Swinney-Floyd et al. 1999	cracked wheat	90						non précisé	75	Control					0.61 <sup>a</sup>	0.122 <sup>a</sup>
										P-63	3 x 10 <sup>11</sup>			0.90 <sup>a</sup>	0.137 <sup>a</sup>	
										P-63 + LA 53545	10 <sup>11</sup> + 10 <sup>8</sup>			<b>1.06<sup>b</sup></b>	<b>0.222<sup>b</sup></b>	
Galyean et al. 2000	75% Steam flaked corn + 10% cottonseed (hulls + meal) + 4.29% molasses + 4% ground alfalfa hay	96				7.94	15.08	1% limestone + Ca (HPO4)2 + MgO + 0.008% rummesin + 0.003% tylan	240	Control		548.5 <sup>a</sup>	8.018	1.675 <sup>a</sup>	0.208	
										PF NP24 + LA NP45	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>6</sup>	<b>562.8<sup>b</sup></b>	8.281	<b>1.766<sup>b</sup></b>	0.213	
										PFNP 24 + LA NP45 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>4</sup> + 10 <sup>4</sup>	<b>563.5<sup>b</sup></b>	8.267	<b>1.762<sup>b</sup></b>	0.213	
										PF NP24 + LA NP45 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>6</sup> + 10 <sup>6</sup>	<b>554.3<sup>b</sup></b>	8.086	<b>1.716<sup>b</sup></b>	0.212	
Rust et al. 2000	cracked corn + rolled wheat + corn silage	90						article non disponible	320	Control		534 <sup>a</sup>	9.71	1.5 <sup>a</sup>	0.154 <sup>a</sup>	
										PF NP24 + LA NP45	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>6</sup>	<b>547<sup>b</sup></b>	8.86	<b>1.62<sup>b</sup></b>	<b>0.183<sup>b</sup></b>	
										PFNP 24 + LA NP45 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>6</sup> + 10 <sup>6</sup>	<b>544<sup>b</sup></b>	9.68	<b>1.59<sup>b</sup></b>	<b>0.164<sup>b</sup></b>	
										PF NP24 + LA NP45 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>8</sup> + 10 <sup>8</sup>	<b>543<sup>b</sup></b>	10.02	<b>1.57<sup>b</sup></b>	0.157 <sup>ab</sup>	
Kim et and Rust, 2002	17% corn silage + 78% High Moisture Corn + 5% protein supplement	83						1% Ca(CO3) + 0.1% Ca(HPO4)2 + 0.05% rumensin	112	Control		575	10.56	1.29	0.122	
										DH42	10 <sup>9</sup>	566	10.25	1.22	0.119	
Elam et al. 2003	76.57% Steam flaked corn + 4% alfalfa hay + 4% cottonseed hulls + 4% molasses + 4% cottonseed meal	96				7.59	13.55	1% limestone + Ca (HPO4)2 + MgO + rummesin + tytan	240	Control		598	8.54	1.56	1.183	
										PF NP24 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>9</sup>	603	8.75	1.58	1.181	
										PFNP 24 + LA NP45 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>6</sup> + 10 <sup>9</sup>	600	8.54	1.59	1.186	
										PF NP24 + LA NP45 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>6</sup> + 10 <sup>6</sup>	603	8.75	1.58	1.181	
Beauchemin et al. 2003	87% steam rolled barley + 9% barley silage + 0.86% ground barley + 0.97% canola meal	92	ad lib					1.85% CaCO3	8	Control		519 <sup>a</sup>	7.78	0.62	0.079	
										EF212	6 x 10 <sup>9</sup>	525 <sup>b</sup>	7.78	0.89	0.114	
										Control		552	7.95	0.67	0.084	
										EF212 + SC	6 x 10 <sup>9</sup> + 6 x 10 <sup>9</sup>	555	7.75	0.87	0.112	
Brashears et al. 2003	64.6% Steam flaked corn + 10% dry rolled corn + 5.2% cottonseed hulls + 4.8% cottonseed meal + 4.12% molasses + 5% gound alfalfa hay	95						1% limestone + Ca (HPO4)2 + MgO + 0.007% rummesin + 0.005% tytan	185	Control		579	9.32	1.59	0.170	
										LA NP51	10 <sup>9</sup>	576	9.22	1.58	0.172	
										LA NP35	10 <sup>9</sup>	582	9.46	1.66	0.175	
Peterson et al. 2007	55% High Moisture Corn + 35% wet corn gluten feed + 5% corn silage + 2% alfalfa hay + 2% supplement	93						composition supplement non décrite	448	Control		566	11.42	1.67	0.147	
										LA NP51	10 <sup>9</sup>	568	11.31	1.69	0.150	
Vasconcelos et al. 2007	76% steam flaked corn + 3.9% cottonseed hulls + 4.5% cottonseed meal + 4% molasses + 3.9% ground alfalfa hay + 2.5% supplement	96				8.8	12.6	1% limestone + Ca (HPO4)2 + MgO + 0.007% rummesin + 0.005% tytan	240	Control		596	8.84	1.62	0.183 <sup>a</sup>	
										PF NP24 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>7</sup>	599	8.81	1.66	<b>0.189<sup>b</sup></b>	
										PF NP24 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>8</sup>	595	8.72	1.61	<b>0.185<sup>b</sup></b>	
										PF NP24 + LA NP51	10 <sup>9</sup> + 10 <sup>9</sup>	601	8.77	1.65	<b>0.189<sup>b</sup></b>	
Lehloenya et al. 2008a	9.6% sorghum silage + 24.5% alfalfa + 47.9% grain mix + 7.35% whole cottonseed	56	ad lib			40.6	25.5	16.7	0.5% CaCO3 + 0.5% Na(CO3)2 + 0.25% MgO	12	Control		547			
											P169	6 x 10 <sup>11</sup>	527			
											P169 + SC	6 x 10 <sup>11</sup> + 56 g	530			
Van Koevering et al. 1994	73% rolled corn + 8% cotonseed hulls + 5.4% cane molasses + 13.3% supplement	100						1.5% CaCO3	16	Control			7.12			
										LA BT1389	6 x 10 <sup>8</sup>	408	7.62			
Van Koevering et al. 1994	41% rolled corn + 20% pelleted alfalfa hay + 25% contonseed hulls + 4% cane molasses + 9.9% supplement	80						0.83% CaCO3	12	Control			15.38 <sup>a</sup>			
										LA BT1389	1.1 x 10 <sup>9</sup>	544	<b>16.28<sup>b</sup></b>			

GRF = glucides rapidement fermentescibles; UFC = unité formant colonie; MSI = matière sèche ingérée; GMQ = gain moyen quotidien; Efficacité = efficacité alimentaire (gain : MSI); DH42 = *Propionibacterium acidopropionici* souche DH42  
 SC = *S. cerevisiae* ; LA 53545, LA 45, LA 51; P-63 = *Propionibacterium freudenreichii* souche P-63; LA = *Lactobacillus acidophilus* ; PF24 = *Propionibacterium freudenreichii* souche PF24; P169 = *Propionibacterium freudenreichii* souche P169;  
 NP747, NP750 = variétés de souches de *L. acidophilus*; les lettres a et b indiquent les résultats statistiquement significatifs (P < 0.1)

**Tableau 11. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure *S. cerevisiae* sur la croissance des bovins.**

		MSI (kg / jr)			GMQ (kg / jr)			efficacité (GMQ / MSI)		
		Témoin	Var	N	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N
Bovins en croissance	BP	10,09	0,47 (± 0,45)	3	0,61	0,33 (± 0,099)	3	0,122	0,057 (± 0,06)	2
	BP + levure SC	7,95	- 0,20	1	0,67	0,20	1			
Bovins à l'engrais	BP	9,12	- 0,012 (± 0,28)	16	1,57	0,040 (± 0,048)	16	0,40	0,005 (± 0,007)	16

BP = utilisation bactérie(s) probiotique(s) seule(s); BP + SC = association BP et *S. cerevisiae* ; PV = poids vif ; MSI = matière sèche ingérée ; GMQ = gain moyen quotidien ; Var = variation entre traitement et le témoin. Entre parenthèses figurent les écarts-types ; N = nombre d'études incluses dans le dispositif ; nd = non déterminé

**Tableau 12. Effet des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure *S. cerevisiae* sur l'ingestion et la croissance des bovins en croissance et à l'engrais.**

*Synthèse bibliographique : Intérêts des bactéries probiotiques dans l'alimentation des ruminants en situation d'acidose*

Etude	Régime	% Concentré	Distribution	% Amidon	% NDF	% ADF	% CP	Tampons	Animal	Nb Animaux	Traitement	Dose en UFC / jr	PV (kg)	pH moyen	AGV T (mM)	%C2	%C3	%C4	C2/C3	Lactate (mM)	NH <sub>3</sub> (mg/L)	
Ghorbani et al. 2002	87% steam rolled barley + 9% barley silage + 0.86% ground barley + 0.97% canola meal	91	ad lib		19.31	8.09	14.6	1.029% CaCO <sub>3</sub>		6	Témoin			5.72	97.22	54.89 <sup>a</sup>	25.72	13.02 <sup>a</sup>	2.13	nd	7.95 <sup>a</sup>	
										6	P15	10 <sup>9</sup>	5.69	98.58	54.71 <sup>a</sup>	24.93	<b>14.06<sup>b</sup></b>	<b>2.19</b>	nd	<b>9.44<sup>b</sup></b>		
										6	P15 + EF212	10 <sup>9</sup>	5.71	96.8	<b>55.94<sup>b</sup></b>	24.69	13.39 <sup>ab</sup>	2.26	nd	8.23 <sup>a</sup>		
Beauchemin et al. 2003	87% steam rolled barley + 7.9% barley silage + 1.52% canola meal	92	ad lib		22	10.2	12.5	1.85% CaCO <sub>3</sub>		8	Témoin			5.56	105.9	52.7	25.4 <sup>a</sup>	16.1 <sup>a</sup>	2.07	nd	6.38	
										8	EF212	6 x 10 <sup>9</sup>	<b>525<sup>b</sup></b>	108.4	48.9	<b>33.1<sup>b</sup></b>	<b>13.1<sup>b</sup></b>	<b>1.48</b>	nd	5.39		
										8	Témoin		552	5.68	109	51.6	27.6	15.4	1.87	nd	11.5	
Lehloeny et al. 2008a	9.6% sorghum silage + 24.5% alfalfa + 47.9% grain mix + 7.35% whole cottonseed	56	ad lib		40.6	25.5	16.7	0.5% CaCO <sub>3</sub> + 0.5% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0.25% MgO	Bouvillons	3	Témoin			5.47	6.37	112	66.9 <sup>a</sup>	17.8 <sup>a</sup>	10.6	3.76	0.26	143
										3	P169	6 x 10 <sup>11</sup>	527	6.25	114	<b>65.8<sup>b</sup></b>	<b>19.2<sup>b</sup></b>	10.7	3.43	0.14	140.8	
										3	P169 + SC	6 x 10 <sup>11</sup> + 56 g	530	6.35	116	<b>64.2<sup>b</sup></b>	<b>20.1<sup>b</sup></b>	10.7	3.19	0.06	136	
Van Koeveering et al. 1994	73% rolled corn + 8% cottonseed hulls + 5.4% cane molasses + 13.3% supplement	100	ad lib					1.5% CaCO <sub>3</sub>		16	Témoin		408	5.49						4.70 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	
											LA BT1389	6 x 10 <sup>8</sup>		5.60				37.6	<b>3.90<sup>b</sup></b>	<b>87<sup>b</sup></b>		
											Témoin		544	6.62				42.2		99		
Nocek et al. 2003	30% mixed haylage + 30% corn silage + 9.1% ground corn + 30% protein supplement	40	ad lib		35.6		16	0.9% limestone	VL multipares (transition)	13	Témoin				6.55 <sup>a</sup>							
										13	EF + SC	5 x 10 <sup>9</sup>			<b>6.66<sup>b</sup></b>							
											Témoin		9	6.12 <sup>a</sup>								
Nocek et al. 2002	3.3% corn silage + 16.7% haylage + 20.6% HMEC + 18.8% corn meal + 7.3% whole cottonseed + 3.8% chocolate mix + 18.8% grain mix	70			26.4	15.2	18.1	< 0.5% CaCO <sub>3</sub>		9	EF + LP + SC	10 <sup>5</sup>		6.24 <sup>a</sup>								
										9	EF + LP + SC	10 <sup>6</sup>		<b>5.99<sup>b</sup></b>								
										9	EF + LP + SC	10 <sup>7</sup>		6.02 <sup>ab</sup>								
Chiquette et al. 2008	20% grass silage + 20% corn silage + 41% barley grain + 8% soybean meal + 9% protein supplement	60			29.8		18.3	0.5% limestone		12	Témoin			5.84	98 <sup>a</sup>	58.98 <sup>a</sup>	26.84	10.71 <sup>a</sup>	2.20	1.40 <sup>a</sup>	152 <sup>a</sup>	
										12	PB 25A	2 x 10 <sup>11</sup>		5.79	<b>108.7<sup>b</sup></b>	<b>60.26<sup>b</sup></b>	24.19	<b>11.68<sup>b</sup></b>	<b>2.49</b>	<b>0.70<sup>b</sup></b>	<b>195<sup>b</sup></b>	
Chiquette 2009	70% de (25% grass silage + 25% corn silage + 30.2% corn grain + 7.1% protein supplement + 10% soybean meal) + 30% de (50%wheat+50%barley)	65	ad lib		22.9	32.4	15			4	Témoin			5.41 <sup>a</sup>	NS	62.7 <sup>a</sup>				1.35 <sup>a</sup>		
										4	EF + SC	2 g		<b>5.84<sup>b</sup></b>		<b>57.9<sup>b</sup></b>	(+)	(+)		<b>5.87<sup>b</sup></b>		
Weiss et al. 2008	35.5% corn silage + 18% alfalfa silage + 19.6% ground corn grain + 4.8% soybean roasted meal + 10% roasted soybean + 6.3% soybean hulls	46.5			31.1	31.4	16.6	0.79% limestone + 0.35% Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> + 0.08% MgO + 0.2% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	VL multipares (début lactation)	25	Témoin		660								NS	
										25	P169	6 x 10 <sup>11</sup>	643									
Hagg et al., 2010	31.9% lucerne hay + 7.9% eragrostis curvula hay + 35% ground maize meal + 3.9% molasses + 7.9% whole cottonseed + 10.2% soybean meal + 1.6% maize gluten 60	60	ad lib		28.2		25.1	0.79% Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		15	Témoin		634	5.85	119.30	62.11	28.33	7.80	2.19	0.31		
										15	Me NCIMB 41125	10 <sup>9</sup>	616	5.92	124.5	60.88	29.48	7.63	2.07	0.27		
Hagg et al., 2010	19.6% lucerne hay + 7.9% eragrostis curvula hay + 47.9% ground maize meal + 3.9% molasses + 7.5% whole cottonseed + 9.4% soybean meal + 2% maize gluten 60 + 0.27% urea	70	ad lib		23.8		25.9			15	Témoin		634	5.78	135	58.44	31.56	7.56	1.85	0.64		
										15	Me NCIMB 41125	10 <sup>9</sup>	616	5.74	128.5	57.98	32.61	6.54	1.78	0.48		
Stein et al. 2006	48,5% grain mix + 16,4% sorghum silage + 16,94% alfalfa + 6,53% grass hay + 4,07% whole cottonseed + 6,6% corn gluten feed + yeast	60	ad lib		25.1	38.7	17.1	0.94% CaCO <sub>3</sub> + 0.54% Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 0.27% MgO	VL multipares (début à fin lactation)	8	Témoin				6.86 <sup>a</sup>		66.7	20 <sup>a</sup>	12.7	3.33		
										6	P169	6 x 10 <sup>10</sup>		6.94 <sup>a</sup>		66.4	19.8 <sup>a</sup>	13.9	3.34			
										5	P169	6 x 10 <sup>11</sup>		<b>6.65<sup>b</sup></b>		64.4	<b>23.8<sup>b</sup></b>	12.3	2.70			
Raeth-Knight et al. 2007	47.9% corn silage + 3.3% corn grain + 35.9% protein mix + 12.9% alfalfa hay	39			24.1	28.8	15.6	< 0.5% MgO, Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> and Na(CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	VL multipares (milieu lactation)	18	Témoin			6.15	84.3	64.8	22.4	9.95	2.89	2.89	122.1	
										17	LA747 + PF24	10 <sup>9</sup> + 2 x 10 <sup>9</sup>		6.15	85.1	63.8	24.1	9.16	2.65	2.65	127.4	
										18	LA747 + PF24 + LA45	10 <sup>9</sup> + 2 x 10 <sup>9</sup> + 5 x 10 <sup>9</sup>		6.20	84.6	65.5	21.7	9.81	3.02	3.02	120.6	

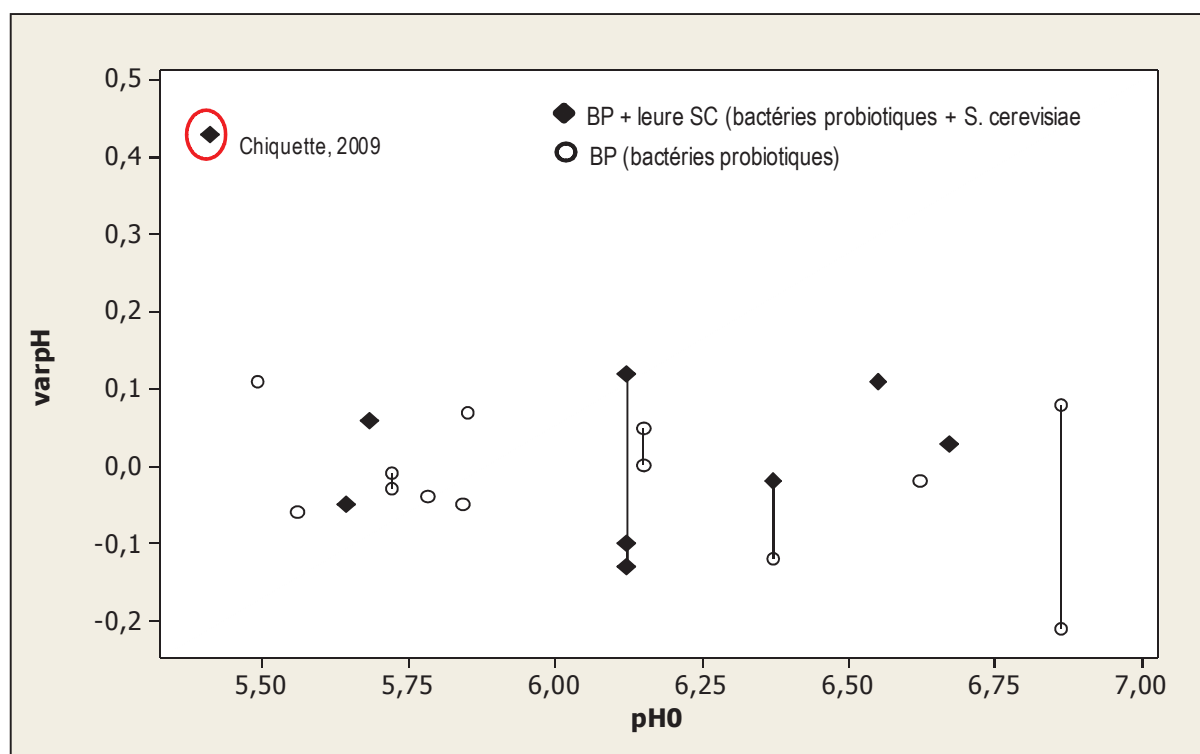
NS = non significatif; nd = non détecté; (+) ou (-) = tendance à augmenter ou diminuer; + ou - = augmente au baisse; VL = vache laitière; UFC = Unité formant Colonie; P15 = *Propionibacterium* souche P15; EF212 = *E. faecium* souche 212; SC = *Saccharomyces cerevisiae* PB = *Prevotella bryantii*; LP = *Lactobacillus plantarum*; LA = *Lactobacillus acidophilus*; PF = *Propionibacterium freudenreichii*; P169 = *Propionibacterium freudenreichii* souche 169; Me = *Megasphaera elsdenii*  
 les lettres a et b indiquent les résultats statistiquement significatifs (P < 0.1)

**Tableau 13. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure *S. cerevisiae* sur le pH et les fermentations ruminales.**

	pH			AGV totaux (mM)			Acétate (%)		
	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N
BP	6,07	-0,02 (± 0,09)	13	103	1,77 (± 4,59)	9	61,08	-0,67 (± 1,49)	11
BP + levure SC	6,05	0,07 (± 0,19)	7	110	1,95 (± 2,90)	2	60,40	-2,10 (± 3,04)	3
	Propionate (%)			Butyrate (%)			Acétate/Propionate		
	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N
BP	27,04	0,05 (± 3,52)	13	11,28	-0,17 (± 1,19)	11	2,63	-0,12 (± 0,30)	11
BP + levure SC	22,70	1,45 (± 1,20)	2	13,00	-0,70 (± 1,13)	2	2,81	-0,28 (± 0,40)	2
	Lactate (mM)			NH <sub>3</sub> (mg/L)					
	Témoin	Var	N	Témoin	Var	N			
BP	1,87	-0,28 (± 0,34)	7	81,20	8,04 (± 14,55)	9			
BP + levure SC	0,80	2,16 (± 3,34)	2	77,30	-3,90 (± 4,38)	2			

BP = utilisation bactérie(s) probiotique(s) seule(s); BP + SC = association BP et *S. cerevisiae* ; Var = variation entre traitement et le témoin. Entre parenthèses figurent les écarts-types ; N = nombre d'études incluses dans le dispositif.

**Tableau 14. Effets des bactéries probiotiques seules ou associées à la levure *S. cerevisiae* sur le pH et les fermentations ruminales.**



**Figure 16. Variation du pH ruminal (var pH) en fonction du pH initial (pH0) chez des bovins supplémentés en bactéries probiotiques seules ou associées à la levure *S. cerevisiae*.**



## **HYPOTHESE ET STRATEGIE**



Les données de la littérature permettent de distinguer aisément les situations d'acidoses latentes propioniques et butyriques et rapportent une prépondérance de la première situation dans les systèmes d'élevage intensifs. Lors de précédents travaux sur l'effet des levures sur l'acidose latente menés au sein de l'équipe DIMA, il a été proposé que l'action des levures puisse dépendre des orientations fermentaires ruminales (thèse L. Brossard, 2006). Concernant la stabilisation du pH ruminal *in vivo* par l'addition de bactéries probiotiques, l'analyse quantitative n'a montré aucun effet (cf. Chapitre 3). Pour ce qui est de l'utilisation spécifique de bactéries propioniques seules ou en association avec des bactéries lactiques, le constat est le même ; cependant, le nombre limité d'études (n=3) ne permet pas une conclusion définitive quant à ce type d'association. Afin de répondre à l'objectif fixé dans le cadre de ce travail de thèse, nous émettons l'hypothèse selon laquelle **l'efficacité et le mode d'action des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose latente dépend de la nature des fermentations ruminales**. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons développé une stratégie qui se décompose en trois étapes expérimentales :

- **Expérimentation 1** : développer un modèle d'étude (sur moutons à l'entretien) permettant d'induire et de maîtriser différentes orientations fermentaires dans le rumen;
- **Expérimentation 2** : utiliser le modèle précédemment développé pour étudier l'effet et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques pour réguler le microbiote et les fermentations ruminales ;
- **Expérimentation 3** : valider sur vache laitière en production l'efficacité et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques en conditions d'alimentation conventionnelles ;

L'originalité de notre approche par rapport aux données publiées, a été d'étudier conjointement l'effet des bactéries probiotiques sur les paramètres fermentaires et microbiens (structure et activité). Dans la suite du document, nous détaillerons chacune des expérimentations réalisées accompagnées des différentes formes de valorisation associées (publications, communications ; Tableau 15).

Materiels et Méthodes									
Experimentations	Objectifs	Animaux	Régimes	Additifs	Dispositif statistique	Facteurs de variation étudiés	Mesures effectuées	Techniques employées	Valorisations
Expérimentation 1 (Avril - Juillet 2008)	Developper un modèle d'acidose latente permettant d'induire et de maîtriser différentes orientations fermentaires dans le rumen	3 moutons Texel castrés et canulés du rumen	Adaptation: 80% foin + 20% concentré pendant 11 jours Challenge: 40% foin + 60% concentré introduit directement dans le rumen pendant 3 jours consécutifs	Aucun	carré Latin 3 x 3	Utilisation de 3 substrats se distinguant par la nature et la vitesse de dégradation de leur glucides ( <b>blé</b> , <b>maïs</b> et <b>pulpe de betterave</b> ) afin d'orienter les fermentations ruminales vers le <b>lactate</b> , le <b>propionate</b> et le <b>butyrate</b> , respectivement.	Paramètres fermentaires: cinétique de pH, concentrations en AGV et en lactate à différents temps: -1h et 1, 3, 5 et 6h après challenge intraruminal	Chromatographie en phase gazeuse (CPG) et spectrophotométrie	1 publication (JAS) et 4 communications (CS-URH, ISRP, JAS PHASE, J3R)
Expérimentation 2 (Novembre 2008 - Avril 2009)	Utiliser le modèle précédemment développé pour étudier l'effet et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques	12 moutons Texel castrés et canulés du rumen répartis dans <b>3 lots de 4 animaux</b>	Adaptation: 80% foin + 20% concentré pendant 3 semaines Challenge: 40% foin + 60% concentré introduit directement dans le rumen pendant 3 jours consécutifs	Placebo / <i>Propionibacterium</i> P63 seule / P63 + <i>Lb. plantarum</i> 115 / P63 + <i>Lb. rhamnosus</i> 32	carré Latin 4 x 4	Utilisation des mêmes substrats que ceux de l'expérimentation 1. Chaque lot de 4 animaux recevra un type de substrat (lot blé, lot maïs et lot pulpe de betterave) afin de tester l'effet des probiotiques sur chaque profil fermentaire	Paramètres fermentaires: cinétique de pH, concentrations en AGV, en lactate et en NH <sub>3</sub> . Paramètres microbiens: densités, composition et activités enzymatiques des populations amylolytiques et cellulolytiques, comptage des protozoaires à différents temps: -1h et 1, 3, 5 et 6h après challenge intraruminal	CPG, spectrophotométrie, qPCR, PCR-DGGE, sonification	1 publication (JAS) et 6 communications (CS-URH, RMPC, JED, INRA-Rowett, ISME, J3R)
Expérimentation 3 (Janvier - Avril 2010)	Valider sur vache laitière en production l'efficacité et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques en conditions d'alimentation conventionnelles	8 vaches en production canulées du rumen réparties dans <b>2 lots de 4 animaux</b>	<b>Lot 1:</b> 44% ensilage de maïs, 11% foin, 35.3% concentré amidon, 8.7% tourteau soja tanné. Ce régime riche en amidon est sensé orienter les fermentations vers le <b>propionate</b> <b>Lot 2:</b> 55% ensilage d'herbe, 12% pulpe de citrus, 20% pulpe de betterave, 8% tourteau soja tanné, 5% melasse de betterave. Ce régime riche en amidon est sensé orienter les fermentations vers le <b>butyrate</b>	Placebo / <i>Propionibacterium</i> P63 seule / P63 + <i>Lb. plantarum</i> 115 / P63 + <i>Lb. rhamnosus</i> 32	carré Latin 4 x 4	Au sein de chaque lot dont les régimes sont sensés orienter les fermentations vers le propionate (lot 1) et le butyrate (lot 2); nous étudierons l'effet des probiotiques sur les profils fermentaires et les performances animales	Paramètres fermentaires: cinétique de pH, concentrations en AGV, en lactate et en NH <sub>3</sub> . Paramètres microbiens: densités, composition et activités enzymatiques des populations amylolytiques et cellulolytiques, comptage des protozoaires à différents temps: -1h et 1, 3, 5 et 6h après challenge intraruminal	CPG, spectrophotométrie, qPCR, PCR-DGGE, sonification	brevet et publication (JDS ou BJN)

JAS = Journal of Animal Science; JDS = Journal of Dairy Science; BJN = British Journal of Nutrition; CS-URH = Conseil Scientifique de l'URH; ISRP = International Symposium on Ruminant Physiology; JED = Journées de l'Ecole Doctorale; RMPC = Rencontre des Microbiologistes du Pôle Clermontois; ISME = International Symposium on Microbial Ecology; J3R = Journées Rencontres Recherches Ruminants; Les durées mentionnées pour chacune des expérimentations n'incluent pas le temps d'analyse et de traitement des résultats

**Tableau 15. Récapitulatif des expérimentations réalisées**

## RESULTATS



## Expérimentation 1: Développement d'un modèle expérimental, chez le mouton non productif, pour l'étude de l'acidose ruminale latente.

Comme cela a déjà été présenté dans les chapitres précédents, l'acidose latente se caractérise entre autres par une instabilité et l'imprévisibilité des fermentations microbiennes qui s'orientent variablement vers le propionate, le butyrate ou les deux à la fois et ce aux dépens de l'acétate dont les proportions diminuent avec la chute du pH ruminal. Cette première expérimentation avait pour but de développer un modèle expérimental permettant d'induire deux situations d'acidoses latentes durant lesquelles les fermentations seraient orientées vers le propionate et le butyrate, et une situation d'acidose lactique en orientant les fermentations vers le lactate. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser des GRF se différenciant par la nature et la vitesse de dégradation de leurs glucides (Figure 17).

L'essai a été réalisé en carré latin 3x3 sur 3 moutons mâles castrés munis d'une canule du rumen. Chaque période a duré 14 jours avec une phase d'adaptation (11 jours) pendant laquelle les animaux ont été alimentés 2 fois par jour avec un régime non acidogène (80% foin + 20% blé), suivie d'une phase de **challenges acidogènes** pendant 3 jours consécutifs : **le repas du matin a été supprimé et remplacé par l'introduction directe et massive dans le rumen (challenge) GRF broyés (3 mm) afin d'augmenter leur pouvoir acidogène, à raison de 1.2% du poids vif de l'animal** (Figure 18). Trois types de GRF, se différenciant par la nature des glucides et leur vitesse de dégradation, ont été utilisés : le blé, le maïs et la pulpe de betterave (Tableau 16), sensés orienter les fermentations ruminales vers le lactate, le propionate et le butyrate, respectivement. Le pH ainsi que les concentrations en acides gras volatils et en lactate du liquide ruminal ont été mesurés avant chaque challenge, et 1, 3, 5 et 6h après.

Substrat	Type de glucide	Orientation fermentaire
Blé	Amidon rapidement dégradable	Lactate
Maïs	Amidon lentement dégradable	Propionate
Pulpe de betterave	Paroi rapidement dégradables	Butyrate

**Tableau 16.** Caractéristiques des GRF utilisés pour le développement du modèle d'acidose latente.

Nous avons réussi à induire des acidoses se caractérisant par des pH différents et des profils fermentaires contrastés en fonction des GRF distribués: **orientation butyrique instable dérivant vers une acidose lactique avec le blé**, **orientation butyrique stable avec le maïs**, et **orientation propionique stable avec la pulpe de betterave**. Les profils d'AGV obtenus avec le maïs (butyrique) et la pulpe (propionique) diffèrent de ceux attendus, ce qui suggère une modification des voies fermentaires microbiennes dans le rumen d'animaux en situation d'acidose provoquée par challenge.

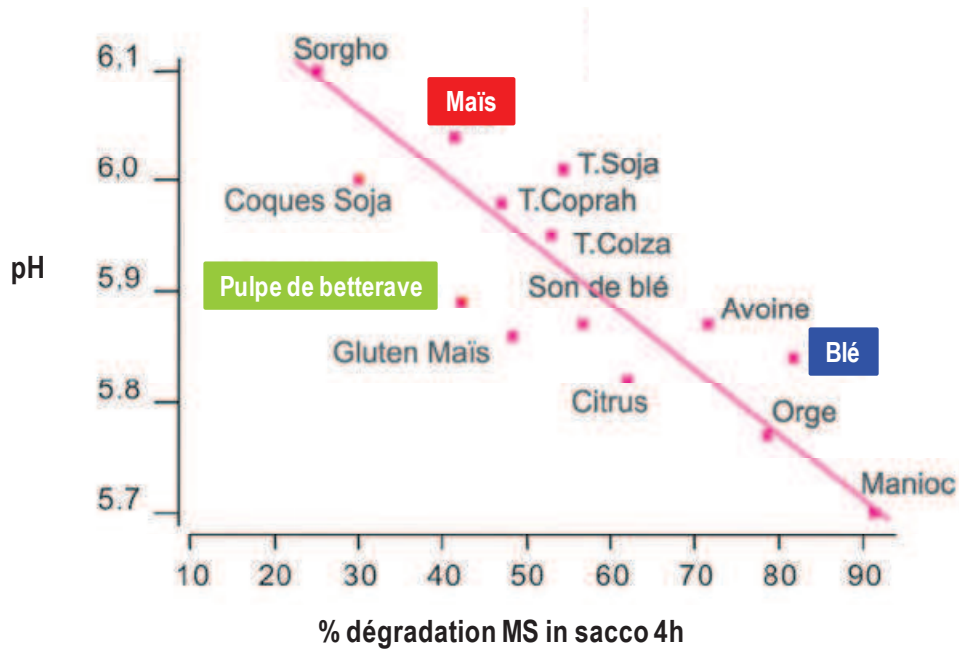


Figure 17. Vitesse de dégradation *in sacco* de la matière sèche pour les 3 substrats utilisés dans notre modèle d'induction de l'acidose latente (Sauvant *et al.*, 2006).



• carré latin 3x3

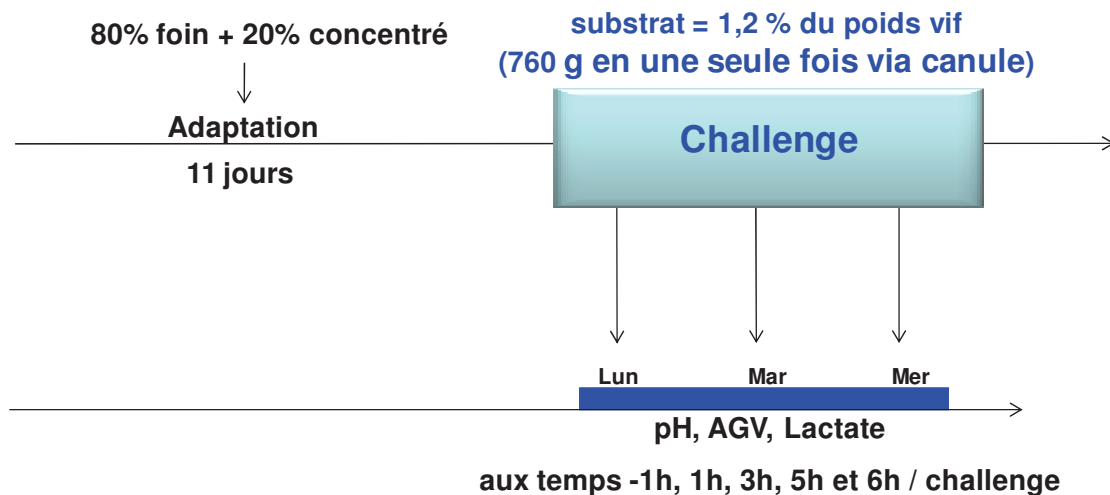


Figure 18. Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour le développement du modèle d'acidose latente.



1. Article n°1

**JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE**

*The Premier Journal and Leading Source of New Knowledge and Perspective in Animal Science*

**Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep**

A. Lettat, P. Nozière, M. Silberberg, D. P. Morgavi, C. Berger and C. Martin

*J Anim Sci* 2010.88:3041-3046.

doi: 10.2527/jas.2010-2926 originally published online May 21, 2010;

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at: <http://jas.fass.org/cgi/content/full/88/9/3041>



**American Society of Animal Science**

[www.asas.org](http://www.asas.org)



# Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep<sup>1</sup>

A. Lettat,\*† P. Nozière,\* M. Silberberg,\* D. P. Morgavi,\* C. Berger,‡ and C. Martin\*<sup>2</sup>

\*INRA, UR1213 Herbivores, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France; †Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain, France; and ‡Danisco France SAS, 20 rue Brunel, F-75017 Paris, France

**ABSTRACT:** A study was conducted to determine the feasibility to induce rumen acidosis with propionate, butyrate, or lactate as the major fermentation end products. Three rumen-cannulated Texel wethers were used in a 3 × 3 Latin square design. Each period consisted of 11 d of adaptation where wethers were daily fed at 90% of ad libitum intake a hay and wheat-based concentrate diet (4:1 ratio on a DM basis) in 2 equal portions followed by 3 d of acidosis induction. During the challenge, the morning feeding was replaced by an intraruminal supply of wheat (readily fermentable starch), corn (slowly fermentable starch), or beet pulp (easily digestible fiber), dosed at 1.2% of BW. Ruminal liquid samples were taken daily 1 h before (−1) and 1, 3, 5, and 6 h after intraruminal feed supply to measure pH, VFA, and lactic acid concentration. The differences between treatments accentuated throughout the 3-d challenge, being maximal and significant on d 3. Indeed, 6 h after the third day of the challenge, mean ruminal pH was less for wheat (4.85) than for corn (5.61;  $P = 0.008$ ) and beet pulp (6.09;  $P = 0.001$ ),

and total VFA tended to be less for wheat (48.7 mM) than for corn and beet pulp (84.7 mM on average;  $P = 0.08$ ). At the same time, the proportion of acetate was greater for wheat than for corn (75.5 and 62.2%, respectively;  $P = 0.005$ ) but did not differ from beet pulp challenge (69.0%). The proportion of propionate was greatest for beet pulp compared with corn and wheat (21.0, 17.3, and 12.1%, respectively;  $P = 0.03$ ), whereas the butyrate proportion was greatest for corn, intermediate for wheat, and least for beet pulp (16.3, 10.8, and 8.3%, respectively;  $P = 0.05$ ). Lactate concentration was greatest for wheat (45.5 mM) compared with corn and beet pulp (8.3 mM on average;  $P = 0.01$ ). Under our experimental conditions, ruminal lactic acidosis was successfully induced by wheat, whereas butyric and propionic subacute ruminal acidosis were respectively provoked by corn and beet pulp. We developed an original model that promoted differentiated fermentation pathways in the rumen of sheep. It will be used to study the ruminal microbiome changes involved in different acidosis situations.

**Key words:** feed challenge, fermentation pathway, ruminal acidosis, sheep

©2010 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2010. 88:3041–3046  
doi:10.2527/jas.2010-2926

## INTRODUCTION

Subacute ruminal acidosis (**SARA**) is a major problem in high-producing ruminants. It decreases feed efficiency and production and predisposes animals to disease (reviewed in Kleen et al., 2003). This is due to excessive consumption of readily fermentable carbohydrates (**RFC**) by the animal, which induces a reduction in ruminal pH (about 5.5 to 5) that affects the ruminal ecosystem (Kleen et al., 2003). In contrast with acute

acidosis in which microbial fermentations produce lactate as a major end product and ruminal pH decreases to less than 5, microbial fermentations during SARA are unpredictably oriented to propionate (propionic SARA) or butyrate (butyric SARA) at the expense of acetate (Martin et al., 2006). In their review, Kleen et al. (2003) reported that butyrate accumulation may be a cause for abomasal displacement, whereas propionate accumulation was associated with milk-fat depression. Moreover, increased propionate and butyrate in the rumen is believed to lead to parakeratosis of the ruminal epithelium (reviewed in Kleen et al., 2003). Because of the ruminal ecosystem instability during SARA, existing mechanistic modeling approaches failed to predict VFA profiles (Offner and Sauvant, 2004). Prediction and prevention of ruminal acidosis imply a better understanding of the microbial changes involved in the

<sup>1</sup>The authors thank Danisco SAS for their financial support and the skilled INRA personnel of the Herbivores Research Unit, especially S. Alcouffe, M. Fabre, and D. Roux, for the care of animals.

<sup>2</sup>Corresponding author: cecile.martin@clermont.inra.fr

Received February 19, 2010.

Accepted May 15, 2010.

**Table 1.** Chemical composition of the experimental feeds in basal diet and in challenges

Item	Basal diet <sup>1</sup>		Challenges <sup>2</sup>		
	Hay	Concentrate <sup>3</sup>	Wheat	Corn	Beet pulp
NDF	68.1	8.2	17.7	15.4	38.9
ADF	40.7	4.9	4.3	3.3	19.9
Starch	nd <sup>4</sup>	65.6	62.0	72.4	nd
CP	7.3	14.3	14.1	8.8	8.6

<sup>1</sup>Natural grassland hay:wheat-based concentrate (4:1 ratio on a DM basis).

<sup>2</sup>Challenges: 1.2% of BW of ground wheat, corn, or beet pulp was intraruminally dosed each morning of the challenge period.

<sup>3</sup>Concentrate = wheat-based concentrate with 3% molasses.

<sup>4</sup>nd = not detected.

different fermentation pathways. Thus, we aimed to develop an experimental model of ruminal acidosis in sheep in which the prevalence of lactate, propionate, or butyrate would be predictable and that can be used to study the changes in the rumen microbiota induced by each situation.

## MATERIALS AND METHODS

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](http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html) for details). The experiment was conducted at the animal experimental facilities at the Herbivores Research Unit of INRA (Saint-Genès Champanelle, France).

### Animals, Diets, and Treatments

Three 4-yr-old Texel wethers averaging  $63.4 \pm 5.4$  kg of BW at the start of the experiment were used. Animals were fitted with a 62-mm-bore polyamide-polyvinyl chloride ruminal cannula by an authorized veterinary surgeon under general anesthesia (Halothane, ICIU Pharmavétérinaire, Paris, France) in an aseptic environment. Wethers were housed in individual stalls ( $1.00 \times 1.50$  m) with individual feed-bunks and were randomly assigned to 3 dietary treatments in a  $3 \times 3$  Latin square design. Each period lasted 14 d with 11 d where sheep were fed 90% ad libitum in 2 equal portions at 0800 and 1600 h with a basal diet made of alfalfa hay and wheat-based concentrate (4:1 ratio on DM basis), and 3 d (**d1**, **d2**, and **d3**) of acidosis induction (challenge period) where animals were intraruminally dosed with rapidly fermentable carbohydrates.

During the 3 d of the challenge period (d1, d2, and d3), the morning feeding was replaced by an intraruminal supply of ground concentrate (3-mm screen) at 1.2% of BW. Three types of concentrates, differing by the nature and degradation rate of their carbohydrates, were compared: wheat (readily fermentable starch),

corn (slowly fermentable starch), or beet pulp (easily digestible fiber). At 1600 h sheep received 520 g of hay. Animals had free access to water and mineralized salt blocks. Intake of feed and water were recorded daily. The chemical composition of the feeds is indicated in Table 1.

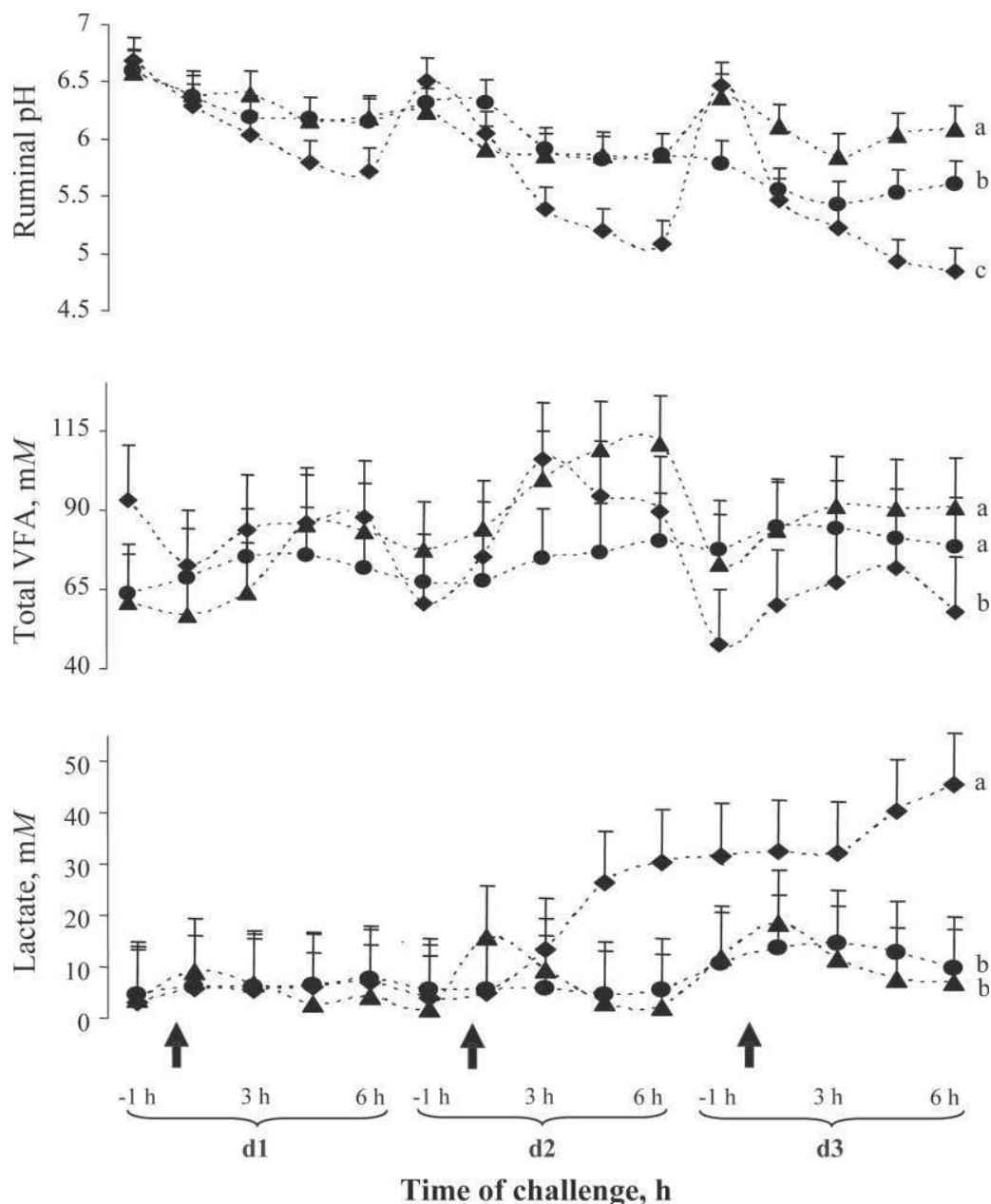
### Rumen Sample Collection and Fermentation Variable Measurements

At d1, d2, and d3, ruminal liquid samples (50 mL) were taken daily from the ventral sac of the rumen through the cannula using a suction pump attached to a rigid plastic tube 1 h before (−1) and 1, 3, 5, and 6 h after intraruminal feed dosing. The ruminal pH was immediately measured with a portable pH-meter (CG840, electrode Ag/AgCl, Schott Geräte, Hofheim, Germany); then ruminal fluid samples were rapidly strained through a polyester monofilament fabric (250- $\mu$ m mesh aperture) and the filtrate was used for VFA and lactic acid analysis.

For VFA, 0.8 mL of fresh rumen juice were mixed with 0.5 mL of a 0.5 N HCl solution containing 0.2% (wt/vol) metaphosphoric acid and 0.4% (wt/vol) crotonic acid, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis by gas chromatography on centrifuged samples (CP 9002 Gas Chromatography, Chrompack, Middelburg, Germany) using crotonic acid as an internal standard (Morgavi et al., 2003). For lactate, 2 mL of ruminal juice were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis by a colorimetric method on centrifuged samples (Enzyplus EZA 891+, D/L-Lactic Acid, Raisio Diagnostics, Rome, Italy) according to the manufacturer's instructions.

### Statistical Analysis

All data were analyzed in repeated time using the MIXED procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC), with SP(POW) as the covariance structure. Period (**P1**, **P2**, and **P3**), substrate (**Sub**, wheat vs. corn vs. beet pulp), challenge day (d1, d2, and d3), time (**T**, −1 vs. +1 vs. +3 vs. +5 vs. +6 h), and Sub  $\times$  day, Sub  $\times$  T, day  $\times$  T, Sub  $\times$  day  $\times$  T interactions were considered as fixed



**Figure 1.** Effect of feed challenges [d 1 to d 3 (d1 to d3), indicated by arrows] based on wheat (♦), corn (●), and beet pulp (▲) on ruminal pH, total VFA, and lactate concentrations during rumen-induced acidosis in sheep. The letters a, b, and c indicate significant differences between feed challenges at the end of the challenge period ( $P < 0.05$ ).  $n = 3$ ; bars = SEM.

effects and animal as random. Results are considered significant for  $P$ -value  $< 0.05$ , and trends were discussed at  $0.05 < P < 0.1$ .

## RESULTS

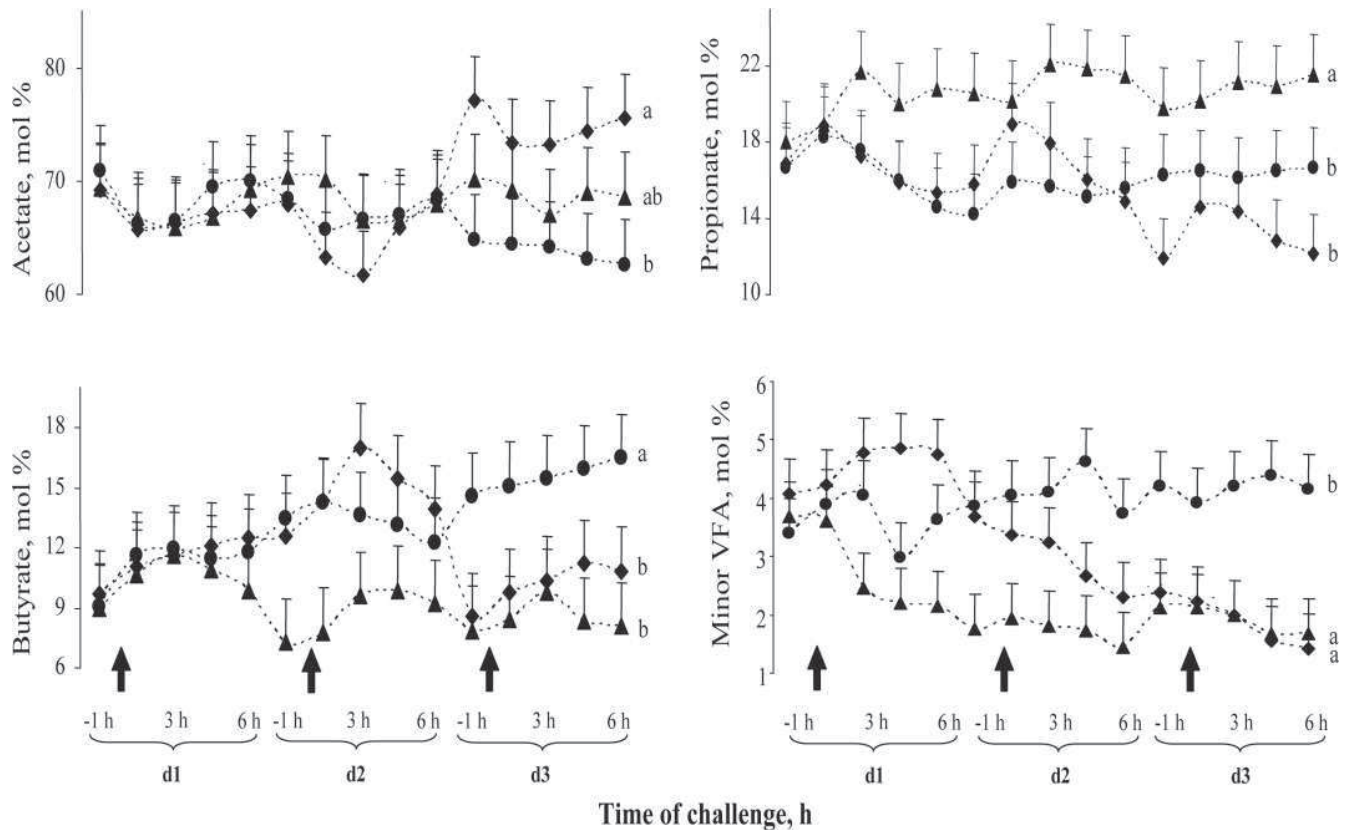
### Ruminal pH

The pH kinetic showed a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in ruminal pH between d1 and d3 of the challenge period, averaging 1.84, 0.98, and 0.49 pH units for wheat, corn, and beet pulp, respectively. At the end of d3, mean ruminal pH was less for wheat than for corn

( $P = 0.008$ ) and beet pulp ( $P = 0.001$ ) at 4.85, 5.61, and 6.09, respectively (Figure 1).

### VFA and Lactate

When comparing d1 at (-1 h) and the end of d3 (6 h), a marked decrease was observed for total VFA from 93.0 to 48.7 mM ( $P < 0.05$ ) for wheat, an increase for beet pulp (from 57.3 to 87.4 mM;  $P < 0.05$ ), whereas no significant change was observed for the corn challenge (Figure 1). At the end of d3, total VFA were less for wheat (48.7 mM) than for corn and beet pulp (84.7 mM on average;  $P = 0.08$ ).



**Figure 2.** Effect of feed challenges [d 1 to d 3 (d1 to d3), indicated by arrows] based on wheat (♦), corn (●), and beet pulp (▲) on molar proportions of acetate, propionate, butyrate, and minor VFA (iso-butyrate + iso-valerate + valerate + caproate) during rumen-induced acidosis in sheep. The letters a and b indicate significant differences between feed challenges at the end of the challenge period ( $P < 0.05$ ).  $n = 3$ ; bars = SEM.

Lactate concentration (Figure 1) for wheat increased more than 10-fold ( $P = 0.004$ ) throughout the 3-d challenge period, whereas the change was not significant ( $P > 0.1$ ) for corn and beet pulp. Indeed, at the end of d3, lactate concentration was greater for wheat (45.5 mM) than for corn and beet pulp (8.3 mM on average;  $P = 0.01$ ).

Throughout the challenge period, acetate proportion (Figure 2) tended to decrease for the corn challenge (from 70.4 to 62.2%;  $P = 0.07$ ), but no change was observed for the other 2 concentrates. The proportion of acetate was greater for wheat than for corn (75.5 and 62.2%, respectively;  $P = 0.005$ ) but not different from beet pulp challenge (69.0%) at the end of d3. Butyrate proportion increased from 8.9 to 16.3% for corn, whereas it was constant for wheat and beet pulp over the 3 d of challenge; butyrate proportion was greatest for corn, intermediate for wheat, and least for beet pulp at 16.3, 10.8, and 8.3, respectively ( $P = 0.05$ ) at the end of d3. Propionate proportion decreased over the 3 d of challenge from 16.9 to 12.1% ( $P < 0.05$ ) for wheat, tended to increase from 17.4 to 21.0% ( $P < 0.10$ ) for beet pulp, whereas no significant change was observed for the corn challenge; the final propionate proportion at the end of the challenge period was greatest for beet pulp than for corn and wheat at 21.0, 17.3, and 12.1%, respectively ( $P = 0.03$ ). Minor VFA proportions (sum

of iso-butyrate, iso-valerate, valerate, and caproate) markedly decreased between d1 before challenge induction and the end of d3 for wheat (from 4.2 to 1.5%;  $P < 0.05$ ) and beet pulp (from 3.8 to 1.8%;  $P < 0.05$ ), whereas they were constant for corn. At the end of d3, the proportions were greatest for corn than for wheat and beet pulp at 4.2, 1.5, and 1.8%, respectively ( $P = 0.004$ ).

## DISCUSSION

The definitions of SARA found in the literature are inconsistent. Subacute ruminal acidosis has been described as the mean daily ruminal pH between 6.25 and 5.5 (Sauvant et al. 1999), repeated bouts of depressed ruminal pH between 5.0 and 5.5 (Oetzel, 2000), as well as the duration of episodes where pH is less than a physiologically acceptable value (e.g., pH < 5.6 for more than 180 min/d; Khafipour et al., 2009). In contrast, there is more consensual definition of lactic acidosis that has been described as ruminal pH below 5.0 with increased lactate concentrations (Owens et al., 1998). Based on these definitions, pH data obtained in the experimental conditions in the current study showed that lactic acidosis was induced with wheat, whereas SARA was induced with corn and beet pulp.



A common feature of all fermentation variables studied was the differences between feeds accentuated throughout the 3 d of the challenge period, being maximal and significant at d3 of the challenge. This indicates that the ruminal ecosystem was relatively resistant to the perturbation induced by the sudden challenges. The large increase in lactate concentration and the decrease in ruminal pH induced by wheat in the present study were indicative of lactic ruminal acidosis. Several groups reported lactic acidosis induction by intraruminal supply of glucose (Hibbard et al., 1995), wheat (Muir et al., 1980), or corn as slurry (McLaughlin et al., 2009) with doses varying between 1.2 and 4% of BW. In these experiments where sheep and steers were used, lactate concentrations were greater and pH less than our results. This may be explained by the different experimental conditions used to induce lactic acidosis: nature (ground wheat vs. glucose or wheat and corn slurry) and quantity of RFC used for the challenge induction, and also by a potential buffer effect of the hay offered 7 h after each challenge induction in our study. Independently of these differences, our results and those of the literature suggest that lactic acidosis is easy to induce irrespective of the RFC type and animal model used if a large quantity of RFC is added into the rumen.

In contrast to lactic acidosis, which is characterized by low pH and increased lactate proportion, SARA seems to be an intermediate state where microbial fermentations are instable and unpredictably oriented to butyrate, propionate, or both at the expense of acetate (Martin et al., 2006). The butyric SARA induced in the present study has already been reported in normally fed sheep (40% hay + 60% wheat; Brossard et al., 2004), dairy cows (50% corn silage + 40% barley; Doreau et al., 2001), or steers (70% corn + 30% hay; Harmon et al., 1985) where the decrease in ruminal pH (between 5.5 and 5.8) was associated with an increase in butyrate proportion (from 13 to 22% of total VFA) and a decrease in lactate concentration (<5 mM). Brossard et al. (2004) suggested that the increase in ruminal protozoa concentration could play a central role in butyric SARA by limiting lactate accumulation and promoting butyrate production. In a meta-analysis study, Eugène et al. (2004) reported also that butyrate proportion decreased when protozoa were removed from the rumen.

The propionic SARA, consisting in an orientation of ruminal fermentations toward propionate, is the most often encountered in intensive feeding systems. The propionic SARA was usually induced in steers and dairy cows by increasing the RFC proportion in the diet (Kennelly et al., 1999; Hristov et al., 2001; Gozho et al., 2007) or by gradually replacing alfalfa hay by pellets (Khafipour et al., 2009). The propionic SARA we developed in the current study is in accordance with these studies where mean ruminal pH was between 5.8 and 6.2, propionate proportions and total VFA reached 35% and 110 mM on average, respectively, and lactate concentration remained <10 mM.

Martin et al. (2006) reported that during SARA (pH between 5 and 6), rumen fermentations were primarily oriented toward butyrate then toward propionate as the rumen pH decreased. This is in conflict with the present study where butyric SARA occurred at less pH compared with propionic SARA (pH 5.61 vs. 6.09). Moreover, in our study, butyric and propionic SARA were induced by corn and beet pulp, respectively. These results appear surprising because in normally fed animals, diets rich in beet pulp classically orient to butyrate (O'Mara et al., 1997; Voelker and Allen, 2003), whereas starch-rich diets lead to propionic fermentations (Goad et al., 1998; Hristov et al., 2001; Gozho et al., 2007). However, due to the absence of similar intraruminal challenge studies using corn and beet pulp in the literature, explanations are still lacking. Taken together, these results strongly suggest that the microbial fermentation pathways differ between normal feeding and intraruminal challenge.

We developed an original model that induces differentiated rumen fermentation pathways in sheep. The rumen pH and fermentation variables obtained with the wheat challenge were indicative of lactic acidosis, whereas butyric and propionic SARA was observed for corn and beet pulp challenges, respectively. This model will be used to study the ruminal microbial changes associated with these different types of acidosis.

## LITERATURE CITED

- Brossard, L., C. Martin, F. Chaucheyras-Durand, and B. Michalet-Doreau. 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:195–206.
- Doreau, M., A. Ollier, and B. Michalet-Doreau. 2001. An atypical case of ruminal fermentations leading to ketosis in early lactating cows. *Revue Méd. Vét.* 152:301–306.
- Eugène, M., H. Archimède, and D. Sauvant. 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 84:81–97.
- Goad, D. W., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234–241.
- Gozho, G. N., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2007. Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:856–866.
- Harmon, D. L., R. A. Britton, R. L. Prior, and R. A. Stock. 1985. Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70% concentrate diet ad libitum. *J. Anim. Sci.* 60:560–569.
- Hibbard, B., J. P. Peters, S. T. Chester, J. A. Robinson, S. F. Kotarski, W. J. Croom Jr., and W. M. Hagler Jr. 1995. The effect of slaframine on salivary output and subacute and acute acidosis in growing beef steers. *J. Anim. Sci.* 73:516–525.
- Hristov, A. N., M. Ivan, L. M. Rode, and T. A. McAllister. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79:515–524.
- Kennelly, J. J., B. Robinson, and G. R. Khorasani. 1999. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 82:2486–2496.

- Khafipour, E., D. O. Krause, and J. C. Plaizier. 2009. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *J. Dairy Sci.* 92:1712–1724.
- Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage, and J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50:406–414.
- Martin, C., L. Brossard, and M. Doreau. 2006. Mechanisms of appearance of ruminal acidosis and consequences on physiopathology and performances. *INRA Prod. Anim.* 19:93–108. (In French, with English abstract).
- McLaughlin, C. L., A. Thompson, K. Greenwood, J. Sherington, and C. Bruce. 2009. Effect of acarbose on acute acidosis. *J. Dairy Sci.* 92:2758–2766.
- Morgavi, D. P., H. Boudra, J. P. Jouany, and D. Graviou. 2003. Prevention of patulin toxicity on rumen microbial fermentation by SH-containing reducing agent. *J. Agric. Food Chem.* 51:6906–6910.
- Muir, L. A., E. L. Rickes, P. F. Duquette, and G. E. Smith. 1980. Control of wheat-induced lactic acidosis in sheep by thiopeptin and related antibiotics. *J. Anim. Sci.* 50:547–553.
- Oetzel, G. R. 2000. Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. Pages 46–53 in *Proc. 33rd Annu. Conf. Am. Assoc. Bovine Pract.*, Rapid City, SD.
- Offner, A., and D. Sauvant. 2004. Comparative evaluation of the Molly, CNCPS, and LES rumen models. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112:107–130.
- O'Mara, F. P., G. K. Stakelum, P. Dillon, J. J. Murphy, and M. Rath. 1997. Rumen fermentation and nutrient flows for cows fed grass and grass supplemented with molassed beet pulp pellets. *J. Dairy Sci.* 80:2466–2474.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76:275–286.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Components of ruminal acidosis and acidogenic effects of diets. *INRA Prod. Anim.* 12:49–60. (In French, with English abstract)
- Voelker, J. A., and M. S. Allen. 2003. Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn: 3. Effects on ruminal fermentation, pH, and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:3562–3570.



## Expérimentation 2: Utilisation du modèle d'acidose pour étudier l'effet et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques pour réguler le microbiote et les fermentations ruminales chez le mouton non productif.

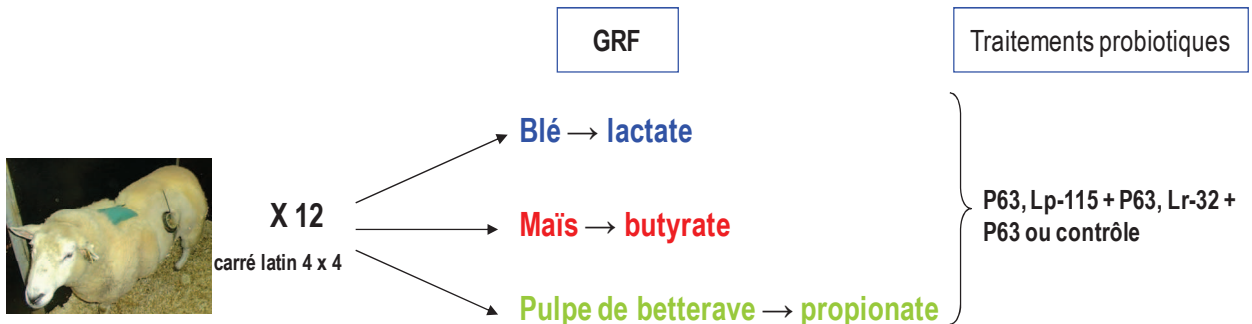
Lors de cette seconde expérimentation, notre objectif était d'étudier l'effet d'un apport de bactéries propioniques (*Propionibacterium* P63) utilisées seules ou en association avec des lactobacilles (*Lb. plantarum* Lp-115 et *Lb. rhamnosus* Lr-32) sur les paramètres fermentaires et microbiens du rumen mis en situation d'acidose provoquée et de comprendre le mode d'action des bactéries utilisées pour réguler les fermentations microbiennes. D'autre part, cet essai avait pour but de mettre en évidence les groupes microbiens associés à chaque orientation fermentaire, ce qui est actuellement méconnu pour l'acidose latente.

Pour ce faire nous avons utilisé le modèle d'acidose développé au cours de l'expérimentation 1. En plus de l'objectif initial, cette seconde expérimentation a également permis de valider le modèle d'acidose développé car avant d'entamer cette nouvelle étape, nous n'avions aucune certitude quant à la reproductibilité du modèle. Brièvement, 12 moutons castrés et canulés du rumen ont été répartis en 3 lots de 4 animaux chacun et alimentés avec un **régime d'adaptation constitué de 80% de foin + 20% de GRF pendant 3 semaines** suivies **d'une semaine de challenges acidogènes durant laquelle le repas du matin a été supprimé et remplacé par l'introduction directe dans le rumen de blé, maïs ou de pulpe de betterave broyés à la grille de 3 mm** (un substrat par lot à raison de 1.2% du poids vif de l'animal) pour orienter les fermentations microbiennes vers le lactate, butyrate et le propionate respectivement (Lettat *et al.*, 2010). Les animaux de chaque lot ont été supplémentés ou non en bactéries probiotiques ( $10^{11}$  UFC/animal/jour) selon un carré Latin  $4 \times 4$ . Les traitements étaient les suivants : T (placebo à base de lactose), P63, Lp-115 + P63 et Lr-32 + P63. Durant les 3 jours de challenge, des prélèvements de contenu ruminal ont été réalisés afin de déterminer les paramètres fermentaires (pH, AGV, lactate,  $\text{NH}_3$  et éthanol) et microbiens correspondant à la densité, la composition et l'activité des bactéries cellulolytiques et amylolytiques ainsi que le dénombrement des protozoaires (Figure 19).

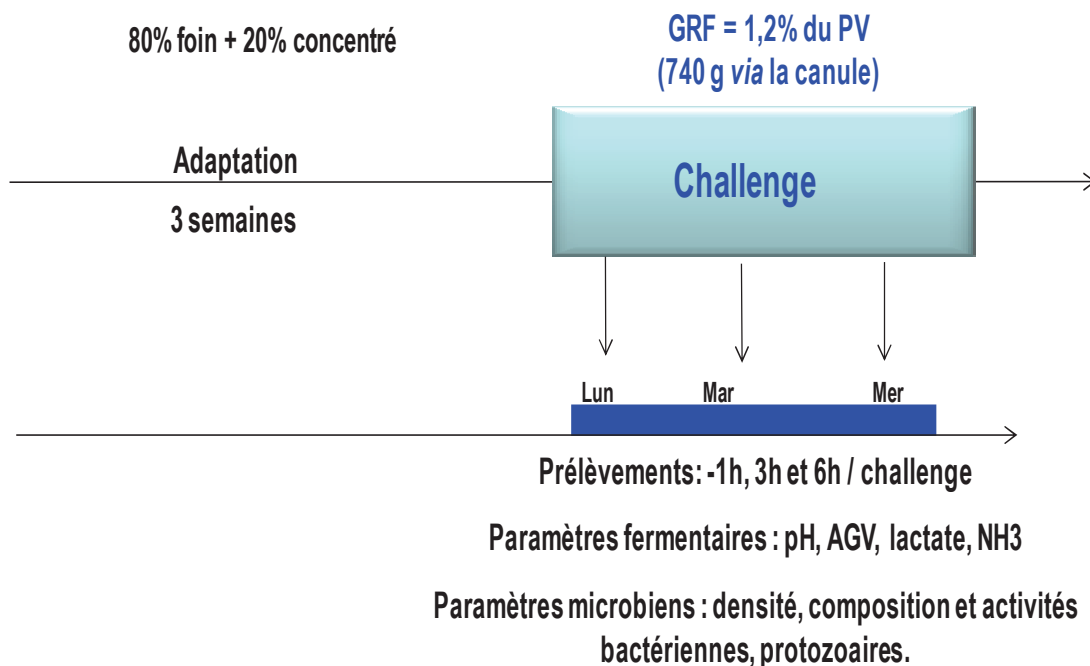
Au cours de cet essai, les 3 probiotiques ont été capables de limiter la chute du pH ruminal lors des situations d'acidose latente tandis qu'ils ont exacerbé la chute du pH lors de l'acidose lactique en stimulant la croissance des bactéries productrices de lactate. Avec l'acidose latente butyrique, cet effet sur le pH était relié à une diminution des AGV totaux et une réorientation des profils d'AGV vers l'acétate au détriment du propionate et du butyrate. De plus, les probiotiques utilisés ont réduit l'activité

### Approche expérimentale

**Objectifs :** Etudier l'effet d'une supplémentation en bactéries probiotiques sur l'écosystème ruminal lors de situations d'acidose induites par challenge. Peuvent-elles prévenir le risque d'acidose et comment?



P63 = *Propionibacterium* souche P63  
Lp-115 + P63 = *Lb. plantarum* souche 115 + P63  
Lr-32 + P63 = *Lb. rhamnosus* souche 32 + P63  
Contrôle = lactose  
Dose =  $10^{10}$  UFC/animal/jour



**Wash out :** A la fin de chaque période expérimentale, le rumen des moutons a été vidé et remplacé par du contenu provenant de 3 moutons supplémentaires alimentés avec le régime d'adaptation et non soumis à un stress acidogène.

Figure 19. Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour évaluer l'efficacité des bactéries probiotiques chez le mouton à l'entretien.

amylolytique et la proportion des bactéries productrices de lactate et amélioré l'activité fibrolytique sans modifier le nombre de bactéries cellulolytiques (c'est surtout vrai pour Lp-115 + P63). Concernant l'acidose latente propionique, les probiotiques n'ont pas modifié les profils fermentaires, mais la proportion de lactobacilles a diminué avec les probiotiques P63 et Lp-115 + P63. Ces résultats suggèrent que l'action des bactéries probiotiques varie en fonction des profils fermentaires ruminiaux chez le mouton à l'entretien.



## 1. Article n°2

Soumis à Journal of Animal Science

Running head: Bacterial direct-fed microbials minimize SARA risk in sheep

### Direct-fed microbials minimize subacute ruminal acidosis but not lactic acidosis in sheep<sup>18</sup>

A. Lettat\*§, P. Nozière\*, M. Silberberg\*, D. P. Morgavi\*, C. Berger# and C. Martin\*<sup>19</sup>

\*INRA, UR1213 Herbivores, Centre de Recherches de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France

§Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain, France

# Danisco France SAS, 20 rue Brunel, F-75017 Paris, France

**ABSTRACT** We investigated whether propionibacteria and/or lactobacilli direct-fed microbials (DFM) could modulate ruminal fermentation in sheep with acidosis. Twelve rumen-cannulated Texel wethers were allocated into 3 groups of 4 animals differing by the nature of the feed used to induce acidosis (wheat, corn or beet pulp). In each group wethers were randomly assigned to 4 treatments with or without DFM in a 4 × 4 Latin square design: 1) control treatment (C, lactose), 2) *Propionibacterium* P63 alone (P), 3) *Lactobacillus plantarum* 115 and P (Lp + P) and 4) *L. rhamnosus* 32 and P (Lr + P) at 10<sup>11</sup> CFU / day. Each experimental period consisted of 3 weeks of adaptation to a hay:wheat-based concentrate diet (4:1 ratio; DM basis) fed twice daily followed by a 3-day period of feed challenge to induce acidosis. During challenge, the morning feeding was replaced by an intraruminal supply of wheat,

<sup>18</sup> A. Lettat is the recipient of a CIFRE Danisco SAS research fellowship. The authors thank the skilled INRA personnel of the Herbivores Research Unit, especially D. Durand for performing animal surgery, S. Alcouffe, M. Fabre and D. Roux, for the care of animals, L. Genestoux and V. Chomilier for their aid in performing laboratory analysis. We also thank E.A. Galbraith and A.H. Smith (Danisco, Waukesha, WI) and B. Meunier (INRA Clermont Ferrand / Theix) for their help in DGGE analysis, as well as P. Mosoni (UR 454 Microbiologie, INRA Clermont Ferrand / Theix) and P. Horvath (Danisco, SAS France) for providing 16S rDNA standards.

<sup>19</sup> Corresponding author : cecile.martin@clermont.inra.fr

corn or beet pulp (1.2% BW) to induce lactic acidosis, butyric subacute ruminal acidosis (SARA) or propionic SARA, respectively. Ruminal content samples were taken daily on the challenge period before and after intraruminal feed supply for fermentation and microbiological parameters analyses.

For all parameters, considered, differences among treatments widened throughout the challenge and were significant at the end of the third day. In lactic acidosis, all DFM decreased ruminal pH compared to C with a more marked effect for P and Lr + P ( $P < 0.05$ ). This was associated with high lactate ( $P < 0.02$ ) and low total VFA concentrations ( $P < 0.01$ ). Lactic acid-producing bacteria (*Lactobacillus* spp. and *Streptococcus bovis*) increased markedly up to the point that lactobacilli became one predominant bacterial group representing up to 25% of total bacteria ( $P < 0.03$ ). In butyric SARA, Lp + P increased mean ruminal pH ( $P = 0.03$ ) with a concomitant decrease in total VFA ( $P = 0.009$ ). It has also increased xylanase activity ( $P = 0.01$ ) whereas it decreased amylase activity, *S. bovis* and *Prevotella* spp. proportions ( $P = 0.06$  and  $0.04$ , respectively). In propionic SARA, all DFMs increased mean ruminal pH with more pronounced effects for P and Lr + P ( $P = 0.02$ ). Fermentation and microbial characteristics were not affected, however, P and Lp + P tended to decrease Lactobacilli proportions ( $P < 0.1$ ). This study shows that DFM effectiveness depends on the acidosis type. The DFM tested minimized occurrence of SARA by limiting lactic acid-producing bacteria proliferation and by sustaining a diverse microbial community as shown by DGGE. Associations of lactic and propionic bacteria were more efficient than *Propionibacterium* alone.

**Key Words:** DFM, feed challenge, fermentation pathways, ruminal acidosis, SARA, sheep

## INTRODUCTION

Current feeding practices in high producing beef and dairy animals use highly fermentable diets to increase growth rates and milk production but they predispose animals to digestive disorders like ruminal acidosis. Field studies in the European Union and United States estimated that up to 11 to 19% of early and 18 to 26% of midlactation cows have subacute ruminal acidosis (SARA) (Enemark, 2008). Because it worsens the animal health and reduces performances (Kleen et al., 2003), SARA is the most important nutritional disorder for ruminants (Martin et al., 2006). Among the solutions tested to prevent SARA, the use of chemical buffers (Meschy et al., 2004) and direct-fed microbials (DFM) based on *Saccharomyces cerevisiae* (Chaucheyras-Durand et al., 2008 ; Desnoyers et al., 2009) was found to stabilize ruminal pH and to improve animal production and different modes of action depending on ruminal fermentations were proposed (Chaucheyras et al, 2008). Contrastingly, there is less information on the use of bacterial DFM. Theoretically, supplementation with lactate-producing bacteria or

combining them with lactate users should be beneficial in preventing SARA by decreasing lactate and increasing propionate in the rumen (Meissner et al., 2010; Nocek et al., 2003). But, positive effects of bacterial DFM on ruminal pH were only observed when associated with yeast (Chiquette, 2009 ; Nocek et al., 2003) and cannot be attributed to bacterial DFM. Moreover, the effectiveness of bacterial DFM to reduce SARA risk seems conditioned by several parameters such as diets, ruminal fermentations, DFM strains and doses. We hypothesize that the variability in the effectiveness of bacterial DFM depends on the different ruminal fermentation patterns. In the present work, we used our previously developed experimental model of ruminal acidosis in sheep affecting differentially fermentation pathways (Lettat et al., 2010) to determine whether providing *Lactobacillus* and/or *Propionibacterium* based DFM could prevent the onset of different types of ruminale acidosis.

## MATERIALS AND METHODS

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](http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html) for details). The experiment was approved by the Auvergne regional ethic committee for animal experimentation, approval number CE1-10.

### **Animals, diets and treatments**

Twelve 3-year old Texel wethers fitted with ruminal cannula and averaging  $60.7 \pm 3.3$  kg BW at the start of the experiment were used. Wethers were housed in individual stalls (1.00 × 1.50 m) with individual feed-bunks and allocated to 3 groups of 4 animals differing by the nature of feed (wheat, corn or beet pulp) used to induce acidosis. Wethers in each group were randomly assigned to four treatments in a 4 × 4 Latin square design. The treatments were: 1) control without DFM (C), 2) *Propionibacterium* P63 (P), 3) *Lactobacillus plantarum* strain 115 plus P (Lp + P) and 4) *Lb. rhamnosus* strain 32 plus P (Lr + P). The treatments were in gelatin capsules (2 g / d) that were introduced daily in the rumen through the cannula just before the morning feeding or challenge induction, at a dose of  $10^{11}$  CFU / animal. Wethers on treatment C received only carrier (lactose). The DFM were especially prepared for this study by Danisco SAS (Dangé St Romain, France).

Each period lasted approximately 1 month with 3 wk where wethers were fed at 90% of their ad libitum intake in two equal portions (0900 and 1600 h) with a basal diet made of alfalfa hay and wheat-based concentrate (4:1 ratio on DM basis). The 3-wk period was followed by 3 d of acidosis induction

**Table 1:** Chemical composition of the experimental feeds in basal diet and in challenges (g/100 g DM).

	Basal diet <sup>1</sup>		Challenges <sup>2</sup>		
	Hay	Concentrate <sup>3</sup>	Wheat	Corn	Beet pulp
NDF	68.1	8.2	17.7	15.4	38.9
ADF	40.7	4.9	4.3	3.3	19.9
Starch	nd <sup>4</sup>	65.6	62.0	72.4	nd
CP	7.3	14.3	14.1	8.8	8.6

<sup>1</sup> Natural grassland hay:wheat-based concentrate (4:1 ratio on DM basis).

<sup>2</sup> Challenges: 1.2% BW of ground wheat, corn or beet pulp was intraruminally dosed each morning of the challenge period.

<sup>3</sup> Concentrate: wheat based concentrate with 3% molasse.

<sup>4</sup> nd: not detected.



(challenge period) where animals were intraruminally dosed with rapidly fermentable carbohydrates (Lettat et al., 2010). During the 3-d of the challenge period, the morning feeding was replaced by an intraruminal supply of ground concentrate (3-mm screen) representing 1.2% of BW. Three types of concentrates, differing by the nature and degradation rate of their carbohydrates, were used: wheat (readily fermentable starch), corn (slowly fermentable starch) or beet pulp (easily digestible fibers). At 1600 h sheep received 520 g of hay. Animals had free access to water and mineralized salts blocks. The chemical composition of the feeds is indicated in Table 1.

To minimize the carryover from period-to-period, on the last day of period 1, 2 and 3, the rumen of each wether was manually half-emptied and replaced by a rumen contents isolated from 3 additional sheep that were fed the same basal diet.

### ***Rumen sample collection and treatments before analysis***

During the 3 d of each challenge period, ruminal content samples (200 g) were taken from the ventral sac of the rumen through the cannula, one hour before, 3 and 6 h after intraruminal feed dosing. The ruminal pH was immediately measured with a portable pH-meter (CG840, electrode Ag/AgCl, Schott Geräte, Hofheim, Germany). The samples were then treated for fermentation and microbial parameters measurements as follows: 100 g of ruminal content were strained through a polyester monofilament fabric (250 µm mesh aperture) and the filtrate was used for analysis of VFA, lactic acid, ammonia and protozoa counting. For VFA, 0.8 mL of fresh rumen fluid was mixed with 0.5 mL of a 0.5 N HCl solution containing 0.2% (w/v) metaphosphoric acid and 0.4% (w/v) crotonic acid. For NH<sub>3</sub>-N, 5 mL of ruminal filtrate were mixed with 0.5 mL of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. The filtrates were stored at -20 °C until analysis. For protozoa, 3 ml of the fresh filtrate was mixed with 3 ml of methyl green, formalin and saline solution (MFS) and preserved from light until counting. On d1 and d3 at -1 h and 3 h after intraruminal dosing, 30 g of ruminal content were immediately taken to the laboratory for enzymes extraction from the solid-adherent microbial community (SAM) under anaerobic conditions. At the same time, 10 g of ruminal content were homogenized in ice using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde Switzerland) at speed 5, for two 1 min cycles with 1 min rest between cycles. Subsequently 2 aliquots of 1.5 g were stored at -80 °C until DNA extraction for bacterial qPCR and PCR-DGGE analysis. For each sampling time, the ruminal contents were dried at 103 °C during 24 h for DM determination.

## Measurements

### Ruminal fermentation

Volatile fatty acids and lactate concentrations were respectively determined by gas chromatography (CP 9002 Gas Chromatography, Chrompack, Middelburg, Germany) and an enzymatic method (Enzyplus EZA 891+, D/L-Lactic Acid, Raisio Diagnostics, Rome, Italy) as described in Lettat et al. (2010). For NH<sub>3</sub>-N, 5 mL of ruminal filtrate were mixed with 0.5 mL of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and stored at -20 °C until analysis. Thawed samples were centrifuged at 10,000 g for 10 min and NH<sub>3</sub>-N concentration was determined in the supernatant using the Berthelot reaction (Park et al., 2009). The reaction was carried out in duplicate in 96-well plates using Infinity M200 spectrophotometer (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

**Protozoa counting** Protozoa were enumerated in a Dolfuss cell (Elvetec Services, Clermont-Ferrand, France) according to the method of Jouany and Senaud (1983).

**Polysaccharidase activities of solid-associated microorganisms** Polysaccharidase activities involved in the degradation of plant cell wall (EC 3.2.1.4 - cellulase and EC 3.2.1.8 - endo-1,4-beta-xylanase xylanase) and starch (EC 3.2.1.1 -  $\alpha$ -amylase) were determined from the solid-associated microorganisms (SAM) as already described (Martin et Michalet-Doreau, 1995). Briefly, 30 g of solid phase were washed with 350 mL anaerobic MES buffer (2-(N-morpholino) ethane sulphonic acid; pH 6.5, 39 °C) to remove the non-associated and loosely-associated microbial communities, and then recovered by filtration (100  $\mu$ m). A sample (5 g) of washed digesta containing the SAM was cut to under anaerobic environment then suspended in 25 mL of anaerobic MES buffer and stored at -80 °C pending enzyme extraction. SAM fraction was disrupted by defrosting and ultrasonic disintegration (four 30-s periods with 30-s intervals at 4 °C; Branson 250 D 200W, Elvetec services, Clermont-Ferrand, France). The enzymes were recovered by centrifugation (15 000 g, 15 min, 4 °C), and the supernatant was stored in capped tubes at -80 °C before assay. Polysaccharidase activities were determined by assaying the amount of reducing sugars released from purified substrates (birchwood xylan, carboxymethyl cellulose and potato starch) after 1 h at 39 °C. Briefly, the reducing sugars were converted into colored product using PAHBAH (4-hydroxybenzhydrazide) in the presence of bismuth and quantified spectrophotometrically at 410 nm (Lever, 1977). The protein content of the enzyme preparations was determined according to Pierce and Suelter (Pierce et Suelter, 1977) using bovine serum albumin as standard in 96 well plates using Infinity M200 spectrophotometer (Tecan Austria

GmbH, Grödig, Austria). Enzyme activities were expressed as  $\mu\text{mol}$  of reducing sugar released per mg protein per hour.

**Bacterial quantification by qPCR** The DNA extraction was performed using the Fast DNA Spin Kit and purification was done with the Gene Clean turbo Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer instructions. Briefly, 250 mg of frozen milled ruminal contents were weighed into the provided sterile tube containing silica beads and lysis buffer. Lysis of bacteria was performed using a Precellys 24 apparatus (Bertin Technology, France). The yield and the purity of the extracted nucleic acids were assessed by optical density measurement with a Nanoquant Infinite M200 apparatus (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) using a dedicated quantification plate. Absorbance intensity at 260 nm was used to assess the concentration of nucleic acids in 2  $\mu\text{L}$  of sample, while absorbance ratios 260/280 and 260/230 were used to check sample purity (protein and salts contamination, respectively). Quantitative PCR (qPCR) was carried out using AB StepOne Plus System (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). Detection was based on SYBR green chemistry. Total and selected bacteria were quantified by targeting the *rrs* gene (Table 2). The reaction mix contained 1 $\times$  SYBR Premix Ex Taq (Lonza Verviers SPRL, Verviers, Belgium), 0.5  $\mu\text{M}$  of each forward and reverse primer and 2  $\mu\text{L}$  of genomic DNA at a concentration of 40 ng /  $\mu\text{L}$ . Each reaction was run in triplicate in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  in 96-well plates (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). Amplification programs consisted of one cycle of 95 °C (10 seconds) and 40 cycles of denaturation at 95 °C (15 sec) and annealing at 60 °C (30 sec) for total bacteria, *Prevotella* genus, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*. For *Streptococcus bovis* the annealing temperature was 63.9 °C (30 sec), while the amplification of *Lactobacillus* consisted of one cycle of 95 °C (10 minutes) and 40 cycles of denaturation at 95 °C (30 sec) and annealing at 60 °C (1 min). An absolute quantification was made for all bacteria using specific 16S rDNA standards from *R. flavefaciens* c94 (ATCC 19208), *R. albus* 7(ATCC 27210), *F. succinogenes* S85 (ATCC 19169), *S. bovis* (DSM 20480), *P. bryantii* B14 (DSM 11371), and *Lb. acidophilus*. Results of enumeration of each species are expressed as % of total bacteria / g DM of rumen content

### **PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis**

The V3 region of the bacterial *rrs* gene was amplified in PCR using primers Eub340F (Jones et Lennon, 2009 ; Kim *et al.*, 2009) and HDA2R (Walter et al., 2000). The Eub340F primer was modified for broader bacterial coverage and was tested with pure culture microorganisms to be sure that it worked with HDA2R to produce a single PCR product (Galbraith et al., unpublished data).

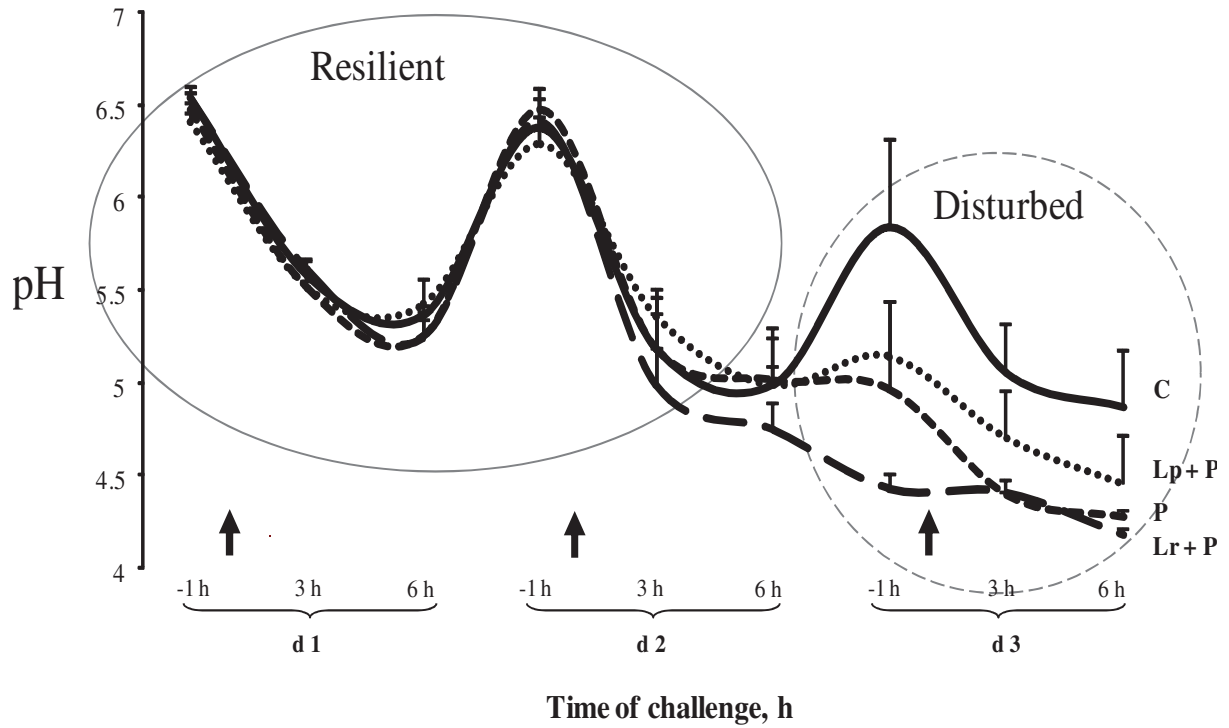
**Table 2:** 16S rDNA based primers used for qPCR quantification and PCR-DGGE.

Target organism	Primer set	Primer sequences 5' - 3'	Used for	Source of primer
All bacteria	520 F 799 R2	AGC AGC CGC GGT AAT CAG GGT ATC TAA TCC TGT T		Edwards et al., 2008
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	FibSuc3F FibSuc3R	GCG GGT AGC AAA CAG GAT TAG A CCC CCG GAC ACC CAG TAT		
<i>Ruminococcus albus</i>	RumAlb3F RumAlb3R	TGT TAA CAG AGG GAA GCA AAG CA TGC AGC CTA CAA TCC GAA CTA A		
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	RumFla3F RumFla3R	TGG CGG ACG GGT GAG TAA TTA CCA TCC GTT TCC AGA AGC T	qPCR	Stevenson and Weimer, 2007
<i>Genus Prevotella</i>	PrevGen4F PrevGen4R	GGT TCT GAG AGG AAG GTC CCC TCC TGC ACG CTA CTT GGC TG		
<i>Streptococcus bovis</i>	StrBov2F StrBov2R	TTC CTA GAG ATA GGA AGT TTC TTC GG ATG ATG GCA ACT AAC AAT AGG GGT		
<i>Genus Lactobacillus</i>	Lacto 05F Lacto 04R	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A CGC CAC TGG TGT TCY TCC ATA TA		Furet et al., 2009
All bacteria	<b>GC+</b> Eub340F HDA2R	<b>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG</b> <b>GCG GGG GCA CGG GGG G</b> TCC TAC GGG AGG CAG CAG GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	PCR-DGGE	Walter et al., 2000; Kim et al., 2009; Jones and Lennon, 2009)

These PCR products were sequenced to make sure they matched the target sequence from known microorganisms (E. Galbraith, unpublished data). For DGGE, a 40 bp GC clamp was added to the 5' end of the forward primer Eub340F (Table 2). Each reaction of 50  $\mu$ L final volume contained 2.5 units/ $\mu$ L of Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 $\times$  PCR Buffer, 200  $\mu$ M dNTP mix, 2  $\mu$ L of genomic DNA at a concentration of 40 ng /  $\mu$ L, and 0.5  $\mu$ M of each primer. PCR was performed using the GeneAmp PCR System 2700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA). We used the PCR program described by Smith and Mackie (Smith et Mackie, 2004) with the following modification: 20 touchdown cycles were used instead of 10, and the annealing temperature was decreased 0.5  $^{\circ}$ C every cycle (instead of 1  $^{\circ}$ C) from 65 to 55  $^{\circ}$ C. PCR amplification products were analyzed on a 1% E-gel 96 agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA). Amplicons' size and concentration were estimated using E-gel Low Range Quantitative DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA) and Syngene Bioimaging System and GeneSnap software (Syngene, Frederick, MD).

The DGGE gels were cast using the DCode universal mutation detection system (BioRad, Hercules, CA) as described by Walter et al. (2000). Briefly, polyacrylamide gels (8%) were prepared and run using 0.5X TAE buffer diluted. A gradient maker was used (CBS Scientific Co., Del Mar, CA) to prepare gels that contained a 30 to 60% gradient of urea and formamide increasing in the direction of electrophoresis. A 100% denaturing solution contained 40% (vol/vol) formamide and 7.0 M urea. The electrophoresis was conducted with a constant voltage of 130 V at 55  $^{\circ}$ C for about 4 h. Gels were stained with ethidium bromide solution (0.5  $\mu$ g / mL, 10 min), and washed (0.5X TAE buffer, 10 min) and gel images were acquired using Syngene Bioimaging System and GeneSnap software (Syngene, Frederick, MD). The GelCompar II v5.10 software (Applied Maths, Belgium) was used to analyze the DGGE gels. The polyacrylamide gel wells were loaded with 10  $\mu$ L of PCR product and 10  $\mu$ L of 2X loading dye (0.05% Bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol and 70% glycerol). Within each Latin square, the samples of all animals were pooled by treatment after the PCR amplification, and then loaded on the gel to assess global community diversity. To normalize the differences between gels, the same standard was used for each gel. The percentage of similarity between gels' standards was 96%.

The 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 standard and the bands were quantified after a local background subtraction. A tolerance in the band position of 1% was applied. The cluster analysis was based on Dice's correlation index and the clustering was done with the unweighted pair-group method using arithmetic averages (UPGMA).



**Figure 1:** Effect of rumen lactic acidosis (indicated by arrows) induced by wheat on ruminal pH in sheep. This example shows that differences among treatments accentuated throughout the three days challenge (d1 to d3), being maximal and significant on d3. Bars = SEM.

### **Statistical procedure**

All data were analyzed in repeated time using the MIXED procedure of SAS, with SP(POW) as covariance structure. Within each Latin square, the period (1 to 4), treatment (C vs. P, vs. Lp + P, vs. Lr + P), challenge day (d1 vs. d3), time (-1 vs. + 3 vs. + 6 h for ruminal fermentations and -1 vs. + 3 h for microbiological parameters), and treatment × day, treatment × time, day × time, treatment × day × time interactions were considered as fixed effect, and animal as random. Results were considered significant for  $P$ -value  $< 0.05$  and trends were discussed at  $0.05 < P < 0.1$ .

## **RESULTS AND DISCUSSION**

In the present study, lactic acidosis was induced with wheat (Table 3), whereas butyric and propionic SARA were induced with corn (Table 4) and beet pulp (Table 5), respectively. These results are similar to those of our previous study (Lettat et al., 2010) in which we developed an experimental model where the prevalence of lactic, propionic or butyric acidosis could be predictable. Indeed, this model appears to be repeatable and effective for studying the changes in the rumen microbiota induced by each acidotic condition. Independently of the feed used to induce acidosis, we observed that the differences among treatments accentuated throughout the three days of challenge, being maximal and significant on the third day (Figure 1). As no effect of DFM treatment was observed on d1 and d2 only data of d3 will be presented and discussed below.

### **Lactic acidosis**

Lactic acidosis is a rare and accidental pathology in which the ruminal ecosystem is completely disturbed. In our experiment, the mean and minimum ruminal pH were low (5.25 and 4.87 respectively), concentration of lactic acid reached 35 mM and that of total VFA 94 mM for C animals (Table 3). These values are classically observed in lactic acidosis (reviewed by Martin et al., 2006). All DFM decreased ruminal pH compared to C, particularly for Lr + P that reduced mean and minimum pH by 0.9 and 0.7 pH units, respectively. This pH diminution was caused by an increase in lactate concentration that reached more than 60 mM for the 3 DFM treatments ( $P < 0.01$ ) whereas the total VFA concentrations were less than 35 mM for P and Lr + P ( $P < 0.01$ ) suggesting a decrease in microbial fermentative activity. Furthermore, P and Lr + P drastically decreased propionate and butyrate proportions ( $P < 0.01$ ), at the benefit of acetate ( $P < 0.01$ ), as well as  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration ( $P < 0.05$ ).

Lactic acid-producing bacteria (*Lactobacillus spp.* and *S. bovis*) increased markedly up to the point that *Lactobacillus spp.* became a predominant bacterial group (from 1.7% with C up to 25% of total



**Table 3:** Effects of bacterial direct-fed microbials (DFM) supplementation on ruminal fermentation parameters (d3, + 6 h), polysaccharidase activities and microbial composition (d3, + 3 h) during feed-induced lactic acidosis in sheep.

	C	DFM <sup>1</sup>			SEM	P value (DFM vs. C) <sup>2</sup>		
		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P
Ruminal pH								
Mean	5.25	4.55	4.76	4.33	0.15	0.001	0.02	0.0001
Minimum	4.87	4.28	4.45	4.17	0.19	0.03	0.12	0.01
VFA, mM	93.6	33.9	76.7	33.5	14.4	0.006	0.32	0.0005
Acetate, mol %	72.6	87.0	78.1	92.5	4.10	0.01	0.34	0.0009
Propionate, mol %	12.2	6.63	10.6	3.82	2.49	0.10	0.63	0.02
Butyrate, mol %	12.8	5.79	10.2	3.52	1.94	0.01	0.33	0.0008
Minor VFA <sup>3</sup> , mol %	2.33	0.56	1.11	0.14	0.40	0.001	0.02	0.0001
Lactate, mM	33.8	71.1	64.9	79.6	9.28	0.005	0.02	0.0006
NH <sub>3</sub> -N, mM	6.53	3.58	4.25	2.44	1.16	0.03	0.09	0.003
<i>Polysaccharidase activities<sup>4</sup></i>								
Amylase	15.3	21.2	20.4	21.0	2.90	0.14	0.19	0.15
Cellulase	0.43	0.09	0.08	0.17	0.17	0.15	0.14	0.27
Xylanase	0.47	0.01	nd <sup>5</sup>	nd	0.84	0.70	0.69	0.69
<i>Microbial composition</i>								
Total bacteria × 10 <sup>12</sup> (16S copies / g DM)	5.52	4.02	4.63	2.16	0.72	0.13	0.37	0.003
% <i>F. succinogenes</i>	1.98	0.51	0.41	0.45	0.40	0.02	0.01	0.01
% <i>R. albus</i>	0.04	0.02	0.01	< 0.01	0.01	0.17	0.09	0.05
% <i>R. flavefaciens</i>	0.03	0.04	< 0.01	< 0.01	0.01	0.56	0.31	0.26
% <i>S. bovis</i>	0.08	4.45	0.26	3.75	1.39	0.03	0.92	0.07
% <i>Lactobacillus</i> spp.	1.74	20.1	22.3	25.7	5.69	0.03	0.02	0.007
% <i>Prevotella</i> spp.	29.6	22.8	21.2	19.4	3.71	0.20	0.10	0.06
Protozoa × 10 <sup>5</sup> / mL	2.95	0.89	1.59	1.40	0.51	0.008	0.16	0.01

<sup>1</sup> DFM: direct-fed microbials. <sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control sheep (C). <sup>3</sup> Minor VFA: sum of iso-butyrate, iso-valerate, valerate and caproate. <sup>4</sup> polysaccharidase activities were expressed as μmol of reducing sugar / mg protein / h. Amylase, cellulase and xylanase activities were determined with starch, cellulose and hemicellulose, respectively. <sup>5</sup> nd: Not detected.



bacteria with DFM treatments;  $P < 0.05$ ). It could be argued that the increase is due to the addition of exogenous lactobacilli. However, wethers that received only *Propionibacterium* P63 exhibited similar proportions of *Lactobacillus* spp. than those supplemented with a combination of *Propionibacterium* and *Lactobacillus* ( $P = 0.4$ ). Therefore, it seems that the lactobacilli quantified were indeed autochthonous symbionts and that P63 may improve the growth of this population. Cellulolytic bacteria (*F. succinogenes*) decreased (from 2% to 0.4 % of total bacteria;  $P < 0.01$ ) with all DFM treatments whereas *Prevotella* spp. was unaffected (23 % on average for all DFM treatments). In addition protozoa ( $P < 0.1$ ) and total *rrs* bacterial copies ( $P < 0.05$ ) were decreased for wethers supplemented with P and Lr + P.

DGGE analysis of the ruminal microbiota showed that d1 and d3 clustered in two groups with 73.7 and 65.3% similarity. On d3, DGGE profiles from wethers challenged with wheat clustered together (87.5% similarity). The number of bands, interpreted as an index of richness was higher on d3 after challenge than on d1 before challenge induction; 35 vs. 22 bands on average, respectively. This result appears somewhat surprising because lactic acidosis is thought to induce a less diverse bacterial community because of the huge increase in lactobacilli as revealed using qPCR. A band only present at d3 for wethers supplemented with P has been detected, it could be interesting to identify it and explain why it is only present in this sample (Figure 2).

In our experimental conditions, DFM used were not effective to alleviate the onset of rumen lactic acidosis in challenged sheep. Instead, supplementation of DFM had a worsening, catalytic effect on lactic acidosis by boosting changes in fermentation parameters (decrease in pH, increase in lactate concentration) and by inducing an increase in lactate-producing bacteria that are important for the development of this pathological condition (Lal et al., 1992; Martin et al., 2006). As a consequence, biochemical indicators of the microbial ecosystem's resilience were more affected in DFM supplemented sheep (Table 3, Figure 1). This was more marked for P and Lr + P than for Lp + P, and the explanation for this could be the proportion of *S. bovis* which was higher in animals treated with P ( $P = 0.03$ ) and Lr + P ( $P = 0.07$ ) compared to those supplemented with Lp + P ( $P = 0.92$ ). Thus, *S. bovis* could be considered as a worsening factor rather than an initial cause of the chained events resulting in lactic acidosis in ruminants (Nagaraja et Titgemeyer, 2007). In conclusion, bacterial DFM, as the type tested

**Table 4:** Effects of bacterial direct-fed microbials (DFM) supplementation on ruminal fermentation parameters (d3, + 6 h), polysaccharidase activities and microbial composition (d3, + 3 h) during feed-induced butyric subacute acidosis (SARA) in sheep.

	DFM <sup>1</sup>				SEM	P value (DFM vs. C) <sup>2</sup>		
	C	P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P
Ruminal pH								
Mean	5.49	5.61	5.74	5.65	0.08	0.30	0.03	0.18
Minimum	5.17	5.28	5.63	5.46	0.12	0.50	0.007	0.09
VFA, mM	107	85.7	81.6	94.4	7.79	0.03	0.009	0.19
Acetate, mol %	63.2	67.4	68.7	66.9	1.75	0.08	0.03	0.13
Propionate, mol %	17.0	14.2	14.5	15.5	1.09	0.07	0.19	0.31
Butyrate, mol %	16.9	14.7	12.1	13.5	1.41	0.26	0.02	0.09
Minor VFA <sup>3</sup> , mol %	2.88	3.68	4.29	4.09	0.44	0.20	0.02	0.05
Lactate, mM	3.40	3.78	3.22	3.49	0.86	0.71	0.87	0.92
NH <sub>3</sub> -N, mM	0.74	0.73	0.71	1.15	0.98	0.99	0.98	0.76
<i>Polysaccharidase activities<sup>4</sup></i>								
Amylase	7.06	4.20	1.06	3.81	1.37	0.14	0.003	0.09
Cellulase	0.05	0.20	0.32	0.17	0.28	0.70	0.50	0.75
Xylanase	0.03	0.20	1.95	0.42	0.53	0.82	0.01	0.61
<i>Microbial composition</i>								
Total bacteria × 10 <sup>12</sup> (16S copies / g DM)	3.54	3.83	2.54	2.83	0.86	0.80	0.38	0.53
% <i>F. succinogenes</i>	0.82	1.06	1.30	1.36	0.362	0.64	0.37	0.31
% <i>R. albus</i>	< 0.01	0.01	0.01	0.01	0.007	0.67	0.50	0.56
% <i>R. flavefaciens</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.005	0.68	0.69	0.91
% <i>S. bovis</i>	0.49	0.11	0.02	0.04	0.168	0.12	0.06	0.07
% <i>Lactobacillus</i> spp.	0.15	0.04	0.09	0.07	0.041	0.06	0.26	0.16
% <i>Prevotella</i> spp.	29.0	26.9	25.1	25.2	1.26	0.24	0.04	0.04
Protozoa × 10 <sup>5</sup> / mL	2.22	2.48	1.77	2.99	0.37	0.59	0.35	0.12

<sup>1</sup> DFM: direct-fed microbials. <sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control sheep (C). <sup>3</sup> Minor VFA: sum of iso-butyrate, iso-valerate, valerate and caproate. <sup>4</sup> polysaccharidase activities were expressed as  $\mu\text{mol}$  of reducing sugar / mg protein / h. Amylase, cellulase and xylanase activities were determined with starch, cellulose and hemicellulose, respectively.

in this work cannot be used as a therapeutic treatment of lactic acidosis in ruminants. Good management practices continue to be the best way to avoid this rare and accidental digestive disorder.

**Butyric and propionic SARA** In C wethers, butyric acidosis induced by corn challenge was characterized by a mean ruminal pH of 5.49, total VFA concentration of 107 mM with 17% of butyrate and a low concentration of lactic acid (3.4 mM; Table 4). In contrast, wethers that received Lp + P and Lr + P maintained higher minimum pH compared to C (5.63, and 5.46;  $P = 0.007$  and  $P = 0.09$ , respectively), but only Lp + P had higher mean ruminal pH (+ 0.25 pH units,  $P = 0.03$ ). The rise in pH was associated with a decrease in total VFA concentration for Lp + P ( $P = 0.009$ ). The proportion of the amylolytic bacteria *S. bovis* and *Prevotella spp.* also decreased with Lp + P ( $P = 0.06$  and 0.04, respectively), as well as amylase activity ( $P = 0.003$ ). Moreover, Lp + P sustained higher xylanase activity ( $P = 0.01$ ) compared to the other treatments but without changes in the cellulolytic bacterial profile. This improvement of the cellulolysis may be related to the increase in acetate proportion observed with this DFM supplement ( $P = 0.03$ ).

Concerning propionic SARA, it was characterized in C wethers by a mean ruminal pH of 5.67, total VFA concentration of 114 mM with 22.5% of propionate and lactic acid concentration that did not exceed 3 mM (Table 5). Mean ruminal pH increased for all DFM supplemented wethers (+ 0.29 pH units on average), but only P and Lr + P had higher minimum (+ 0.28 pH units on average). No effect was observed on enzyme activities. For amylase activity, this could be explained by the fact that beet pulp does not contain starch, and that the development of amylase activity requires starch availability (Nozière et Michalet-Doreau, 1997). Only *Lactobacillus spp.* proportion tended to be reduced with Lp + P and P supplemented animals ( $P < 0.1$ ). Even if the propionic SARA is the most encountered form of acidosis in practice (Lettat et al., 2010), unfortunately, the advantageous effect of DFM on pH is difficult to explain because it was not accompanied with changes in the fermentation and microbial parameters we observed in this study. DGGE analysis at d3 for butyric and propionic SARA showed that supplemented wethers clustered together with 83.2 and 86.4% similarity, respectively. Moreover, the number of bands was higher at d3 (26 vs. 18 and 27 vs. 22 bands on average for butyric and propionic SARA respectively) as well as for supplemented wethers compared to control ones (31 vs. 21 and 31 vs. 23 bands on average for butyric and propionic SARA respectively).

Among the few studies published on the use of bacterial DFM, only two (Ghorbani et al., 2002 ; Raeth-Knight et al., 2007) tested the effects of a DFM based on a combination of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains on ruminal fermentations during SARA. Ghorbani et al. (2002) evaluated the

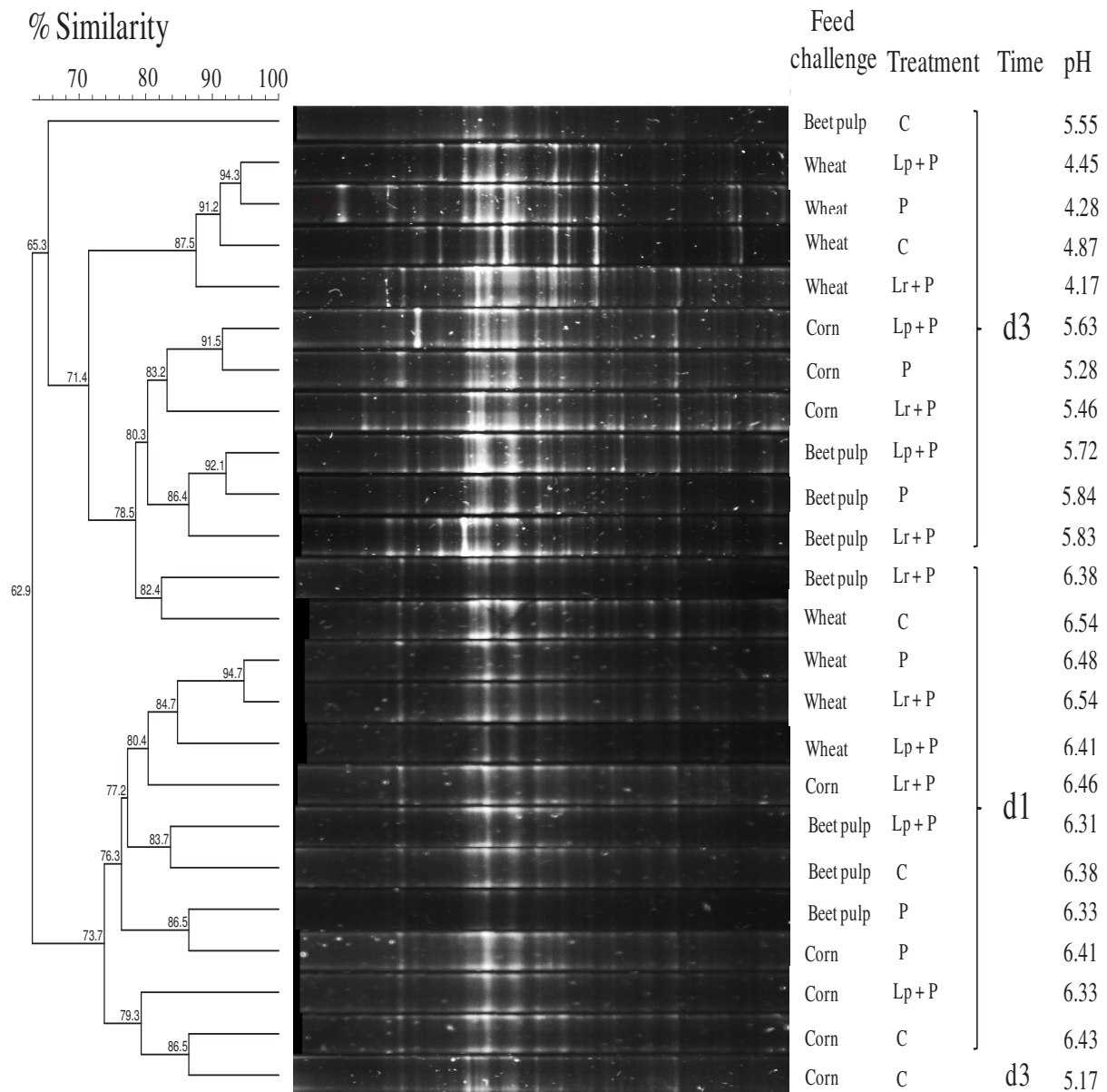
**Table 5:** Effects of bacterial direct-fed microbials (DFM) supplementation on ruminal fermentation parameters (d3, + 6 h), polysaccharidase activities and microbial composition (d3, + 3 h) during feed-induced propionic subacute acidosis (SARA) in sheep.

	C	DFM <sup>1</sup>			SEM	P value (DFM vs. C) <sup>2</sup>		
		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P
Ruminal pH								
Mean	5.67	5.94	5.87	5.93	0.08	0.02	0.08	0.02
Minimum	5.55	5.84	5.72	5.83	0.11	0.05	0.27	0.06
VFA, mM	114	112	104	100	6.66	0.89	0.33	0.16
Acetate, mol %	67.4	68.6	68.4	67.8	1.15	0.46	0.55	0.79
Propionate, mol %	22.5	21.5	21.9	22.3	0.83	0.38	0.61	0.88
Butyrate, mol %	8.52	8.40	8.18	8.34	0.49	0.86	0.85	0.77
Minor VFA <sup>3</sup> , mol %	1.50	1.48	1.52	1.46	0.26	0.94	0.96	0.91
Lactate, mM	2.71	2.01	1.52	2.01	1.46	0.73	0.56	0.73
NH <sub>3</sub> -N, mM	0.55	0.51	0.57	0.57	0.74	0.97	0.99	0.98
<i>Polysaccharidase activities<sup>4</sup></i>								
Amylase	0.29	0.30	0.32	0.24	0.22	0.97	0.92	0.88
Cellulase	0.36	0.29	0.49	0.11	0.19	0.81	0.65	0.37
Xylanase	0.53	0.29	0.38	0.96	0.82	0.82	0.89	0.68
<i>Microbial composition</i>								
Total bacteria × 10 <sup>12</sup> (16S copies / g DM)	3.29	3.74	2.30	2.54	0.56	0.58	0.23	0.35
% <i>F. succinogenes</i>	1.22	1.33	1.56	1.88	0.296	0.79	0.43	0.13
% <i>R. albus</i>	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.01	0.005	0.92	0.73	0.95
% <i>R. flavefaciens</i>	0.02	0.02	0.02	0.01	0.006	0.88	0.97	0.83
% <i>S. bovis</i>	0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.005	0.40	0.64	0.49
% <i>Lactobacillus</i> spp.	0.09	0.01	< 0.01	0.07	0.036	0.10	0.09	0.67
% <i>Prevotella</i> spp.	49.4	44.3	42.6	47.0	4.50	0.43	0.29	0.71
Protozoa × 10 <sup>5</sup> / mL	1.54	1.94	1.98	1.76	0.25	0.27	0.26	0.55

<sup>1</sup> DFM: direct-fed microbials. <sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control sheep (C). <sup>3</sup> Minor VFA: sum of iso-butyrate, iso-valerate, valerate and caproate. <sup>4</sup> Polysaccharidase activities were expressed as μmol of reducing sugar / mg protein / h. Amylase, cellulase and xylanase activities were determined with starch, cellulose and hemicellulose, respectively.

effect of *P. acidopropionici* P15 alone (P15;  $10^9$  cfu / d) or associated to *E. faecium* 212 (PE;  $10^9 + 10^9$  cfu / d) in steers fed a 90% steam-rolled barley based diet. Although no effect was observed on ruminal pH (5.72, 5.69 and 5.71 for control, P15 and PE respectively) the authors found that P15 supplementation increased butyrate proportion and protozoa population with a concomitant reduction in amylolytic bacteria and *S. bovis* numbers, while only PE increased acetate proportion. Raeth-Knight et al. (2007) tested *P. freudenreichii* PF24 associated with *Lb. acidophilus* 747 ( $10^9 + 2 \times 10^9$  cfu / d) or *Lb. acidophilus* 747 and *Lb. acidophilus* 45 ( $10^9 + 2 \times 10^9 + 5 \times 10^8$  cfu / d) in midlactation Holstein dairy cows fed a 41% concentrate based diet and did not report any effect on ruminal fermentation and pH which was approximately 6.15 for control and DFM supplemented cows. According to our present hypothesis that DFM become effective when the ruminal ecosystem unstable, it seems that the conditions were not acidotic enough in the Raeth-Knight et al. study while the effects reported by Ghorbani et al. may indicate a decrease in acidosis risk even if the bacterial DFM did not induce changes in ruminal pH (Ghorbani et al., 2002). Moreover, beneficial effects on ruminal pH were only observed for DFM that associate bacteria and yeast (Chiquette, 2009 ; Nocek et al., 2003) and never for bacteria alone (Beauchemin et al., 2003 ; Chiquette et al., 2008 ; Ghorbani et al., 2002 ; Raeth-Knight et al., 2007 ; Stein et al., 2006). Thus, the beneficial effects on pH reported by Nocek et al. (2003) and Chiquette, 2009 were probably not specific to the bacteria used, and may be attributed to *S. cerevisiae*, a DFM known to stabilize ruminal pH (reviewed by Chaucheyras-Durand et al., 2008; Desnoyers et al., 2009). To our knowledge, the present report is the first to show a specific positive effect of bacterial DFM on ruminal pH. The mode of action of these DFM, consisting in lactic and propionic acid producing bacteria, cannot be clearly associated to quantitative characteristics of the rumen microbial ecosystem such as bacterial communities and total bacteria and protozoal numbers. Instead, they seem to contribute at maintaining the balance of the feed-challenged rumen microbiota by limiting lactate producing bacteria proliferation as observed more particularly in butyric SARA.

In conclusion, we show for the first time that bacterial DFM based on *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains are effective to stabilize ruminal pH and therefore may prevent SARA risk, but cannot be used as a preventive strategy against lactic acidosis. Our results also suggest that DFM effectiveness is conditioned by ruminal fermentations and are effective when the ruminal ecosystem is instable. Concerning their mode of action, we hypothesize that a higher ruminal pH could be induced by a well-balanced and more diverse microbiota as well as by a cellulolytic activity improvement and a limited lactic acid producing bacteria proliferation. The combination of lactobacilli and propionibacteria seems to be more efficient than *Propionibacterium* P63 used alone. This might be due to a synergic effect between strains.



**Figure 2:** DGGE profiles of PCR-amplified *rrs* gene fragments of bacterial communities from the rumen of sheep, supplemented or not with direct-fed microbials, before (d1) and after (d3) lactic acidosis, butyric or propionic SARA induction by wheat, corn and beet pulp respectively. The cluster analysis was based on Dice's correlation index and the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA). Each sample is a pool of 4 animals (from the 4-periods Latin square) within the same treatment. A single band only present for P63 supplemented animals at d3 is indicated by an arrow.



## LITERATURE CITED

- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavi, G. R. Ghorbani, W. Kautz, and J. A. Z Leedle. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1628-1640.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5-26.
- Chiquette, J. 2009. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:278-291.
- Chiquette, J., M. J. Allison, and M. A. Rasmussen. 2008. *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. *J. Dairy Sci.* 91:3536-3543.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620-1632.
- Enemark, J. M. D. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal* 176:32-43.
- Fromin, N., J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno, R. Rossi. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ. Microbiol.* 4:634-643.
- Furet, J. P., O. Firmesse, M. Gourmelon, C. Bridonneau, J. Tap, S. Mondot, J. Doré, and G. Corthier. 2009. Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68:351-362.
- Ghorbani, G. R., D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin, and J. A. Leedle. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80:1977-1985.
- Jones, S., and J. Lennon. 2009. Evidence for limited microbial transfer of methane in a planktonic food web. *Aquat. Microb. Ecol.* 58:45-53.
- Jouany, J. P., and J. Senaud. 1983. Influence des ciliés du rumen sur l'utilisation digestive de différents régimes riches en glucides solubles et sur les produits terminaux formés dans le rumen. II. - Régimes contenant de l'inuline, du saccharose et du lactose. (Text in French with English abstract). *Reprod. Nutr. Develop.* 23:607-623.
- Kim, Y. G., T. H. Lee, T. J. Park, H. S. Park, and S. H. Lee. 2009. Identification of dominant microbial community in aerophilic biofilm reactors by fluorescence in situ hybridization and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Korean J. Chem. Eng.* 26:685-690.
- Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage, and J. P. T. M. Noordhuizen. 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. *J. Vet. Med. A* 50:406-414.
- Lal, S.B., S. K. Dwivedi., M. C. Sharma, and D. Swarup. 1992. Biopathological studies in experimentally induced ruminal acidosis in goat. *Indian J. Anim. Sci.* 62:200-204.
- Lettat, A., P. Nozière, M. Silberberg, D. P. Morgavi, C. Berger, and C. Martin. 2010. Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *J. Anim. Sci.* 88:3041-3046.
- Lever, M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Anal. Bioche.* 81:21-27.

- Martin, C., L. Brossard, and M. Doreau. 2006. Mechanisms of appearance of ruminal acidosis and consequences on physiopathology and performances. (In French, with English abstract). INRA Prod. Anim. 19:93-108.
- Martin, C., and B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. J. Sci. Food Agric. 67:407-413.
- Meschy, F., D. Bravo, and D. Sauvant. 2004. Meta-analysis of responses of lactating cows to buffer supplementation. (In French, with English abstract). INRA Prod. Anim. 17:11-18.
- Meissner, H. H., P. H. Henning, C. H. Horn, K. J. Leeuw, F. M. Hagg, and G. Fouché. 2010. Ruminal acidosis: A review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. S. Afr. J. Anim. Sci. 40:79-100.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. J. Dairy Sci. 90:E17-E38.
- Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, and E. Block. 2003. Direct-Fed Microbial Supplementation on the Performance of Dairy Cattle During the Transition Period. J. Dairy Sci. 86:331-335.
- Nozière, P., and B. Michalet-Doreau. 1997. Effects of Amount and Availability of Starch on Amylolytic Activity of Ruminal Solid-Associated Microorganisms. J. Sci. Food Agric. 73:471-476.
- Park G., H. Oh, and S. Ahn. 2009. Improvement of the Ammonia Analysis by the Phenate Method in Water and Wastewater. Bull. Korean Chem. Soc. 30:2032-2038.
- Pierce, J., and C. H. Suelter. 1977. An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. Anal. Biochem. 81:478-480.
- Raeth-Knight, M. L., J. G. Linn, and H. G. Jung. 2007. Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. J. Dairy Sci. 90:1802-1809.
- Smith, A. H., and R. I. Mackie. 2004. Effect of condensed tannins on bacterial diversity and metabolic activity in the rat gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. 70:1104-1115.
- Stein, D. R., D. T. Allen, E. B. Perry, J. C. Bruner, K. W. Gates, T. G. Rehberger, K. Mertz, D. Jones, and L. J. Spicer. 2006. Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. J. Dairy Sci. 89:111-125.
- Stevenson, D. M., and P. J. Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 75:165-174.
- Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, D. M. Loach, K. Munro, and T. Alatossava. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Appl. Environ. Microbiol. 66:297-303.



### Expérimentation 3: Valider sur vache laitière en production l'efficacité et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques en conditions d'alimentation conventionnelle.

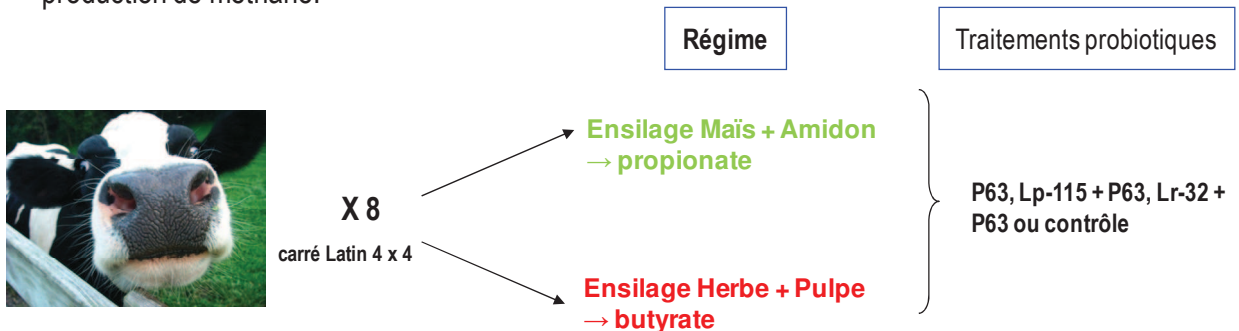
Cette dernière expérimentation avait pour but d'étudier chez la vache laitière (après le pic de lactation) en situation d'acidose réelle, l'effet des bactéries probiotiques testées lors de l'expérimentation précédente. La revue de la littérature existant sur l'effet des probiotiques en situation d'acidose latente a montré un nombre de publications limité et souvent incomplet car les auteurs ont rarement étudié conjointement les effets sur les paramètres ruminiaux (fermentations, microbiote) et les performances animales. Devant le faible nombre de données reliant quantitativement l'effet de l'acidose latente sur les paramètres fermentaires et les performances zootechniques (ingestion, production et composition du lait), l'originalité de notre étude réside dans le fait qu'elle prend en compte simultanément ces deux paramètres.

Devant les résultats encourageants obtenus sur moutons mis dans des situations d'acidose par des challenges intraruminaux, l'enjeu de ce nouvel essai était de réussir à induire un état d'acidose avec des fermentations contrastées chez des vaches laitières alimentées de façon conventionnelle mais sans pour autant détériorer leur état de santé car l'expérimentation devait durer 4 mois. Huit vaches (6 multipares + 2 primipares) en lactation ont été réparties en 2 lots de 4 animaux chacun se différenciant par la nature de la ration acidogène distribuée (ensilage de maïs + concentré à base de céréales (**EMA**) vs. ensilage d'herbe + concentré à base de pulpe (**EHP**)), afin d'induire des fermentations ruminales contrastées (propionate vs. butyrate). Les animaux de chaque lot ont été supplémentés ou non en bactéries probiotiques ( $10^{10}$  UFC/animal/jour) selon un carré Latin  $4 \times 4$ . Les traitements étaient les suivants : T (placebo à base de lactose), P63, Lp-115 + P63 et Lr-32 + P63. Sur chaque période expérimentale de 4 semaines, la semaine 3 a servi à l'étude des performances zootechniques (ingestion, digestion, production et composition du lait), tandis que l'étude des paramètres fermentaires et microbiens du rumen a été réalisée en semaine 4 (Figure 20). Enfin, sachant que la méthanogenèse dépend des orientations fermentaires ruminales (OF) et que les BP sont potentiellement capables de moduler ces OF, il nous a semblé pertinent de profiter de la mise en place de cet essai pour étudier également l'effet des BP sur la quantité de méthane produite par les vaches laitières en utilisant la technique du gaz traceur SF6 (semaine 3).

L'orientation propionique a été observée avec le régime EMA et les 3 probiotiques ont prévenu la chute du pH (+ 0,24 unité pH en moyenne) avec une diminution du lactate et une augmentation de la

**Approche expérimentale**

**Objectifs** : Etudier l'effet de bactéries probiotiques sur l'écosystème ruminal (pH + fermentations + microbes), les performances zootechniques (ingestion, digestion, production et composition du lait) et la production de méthane.



P63 = *Propionibacterium* souche P63  
 Lp-115 + P63 = *Lb. plantarum* souche 115 + P63  
 Lr-32 + P63 = *Lb. rhamnosus* souche 32 + P63  
 Contrôle = lactose  
 Dose =  $10^{10}$  UFC/animal/jour  
 Régime = 55% fourrage + 45% concentré

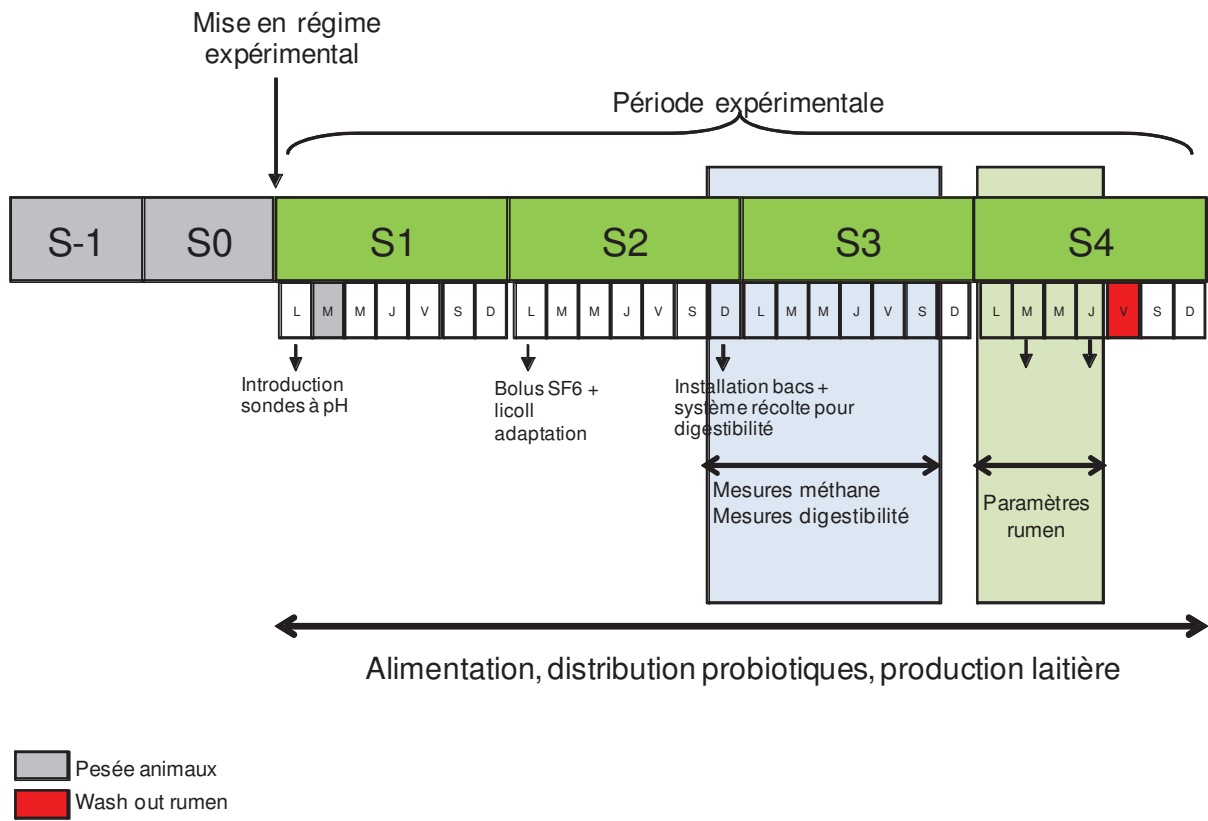


Figure 20. Représentation schématique de l'approche expérimentale utilisée pour évaluer l'efficacité des bactéries probiotiques chez la vache laitière.

propionogénèse et/ou de la densité bactérienne, deux voies permettant de réduire le dihydrogène susceptible d'être transformé en protons. Avec le régime EHP, les fermentations ont été orientées vers l'acétate et le butyrate ; les associations Lp-115 + P63 et Lr-32 + P63 ont amélioré la digestibilité de la ration (matière organique et parois) en stimulant notamment l'activité de la communauté fibrolytique. De plus le traitement Lr-32 + P63 a réduit la production de méthane de 25% environ. L'utilisation des bactéries probiotiques chez la vache laitière semble intéressante pour sécuriser ou améliorer la digestion des rations acidogènes. Ces résultats ont permis de valider l'hypothèse selon laquelle l'action des bactéries probiotiques dépend des orientations fermentaires dans le rumen chez la vache laitière en production.



## 1. Article n°3

La version présentée dans ce manuscrit n'est pas définitive; elle devra être revue et complétée et ne sera publiée qu'après dépôt du brevet qui est actuellement en cours d'instruction.

### Feeding propionibacteria and lactobacilli based direct-fed microbials to dairy cows to prevent subclinical ruminal acidosis: effects on rumen characteristics, diet digestibility, performances and methane output<sup>20</sup>

A. Lettat\*§, C. Martin \*, Y. Rochette\*, L. Genestoux\*, M. Silberberg\*, D. P. Morgavi\*, C. Berger# and P. Nozière \*<sup>21</sup>

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

§Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain, France

# Danisco France SAS, 20 rue Brunel, F-75017 Paris, France

**ABSTRACT** We investigated whether bacterial direct-fed microbials (**DFMs**) could minimize subacute ruminal acidosis (**SARA**) risk and improve feed utilization in dairy cows. Eight ruminally cannulated dairy cows were allocated in 2 groups and fed either a high or a low starch diet (**HSD** vs. **LSD**) in a 55:45 forage-to-concentrate ratio to induce SARA situations with contrasted ruminal fermentation patterns. On each diet, cows were randomly assigned to the following treatments in a 4 × 4 Latin square design: 1) control (C, lactose), 2) *Propionibacterium* P63 (P), 3) *Lactobacillus plantarum* strain 115 plus P (Lp + P) and 4) *Lb. rhamnosus* strain 32 plus P (Lr + P) at 10<sup>10</sup> CFU / day. During each 1 month period, we measured intake, milk yield and composition, digestibility and methane production (using the sulfur hexafluoride tracer technique) on wk 3 and ruminal fermentation (pH, VFA, lactate, NH<sub>3</sub>) and microbial parameters (microbial activity and composition by qPCR, protozoa) on wk 4. Relative to propionic SARA induced with the HSD, all DFMs raised ruminal pH with a simultaneous decrease in lactate

<sup>20</sup> A. Lettat is the recipient of a CIFRE Danisco SAS research fellowship. The authors thank the skilled INRA personnel of the Herbivores Research Unit. We are also grateful to P. Mosoni and F. Chaucheyras-Durand (UR 454 Microbiologie, INRA Clermont Ferrand / Theix) and P. Horvath (Danisco, SAS France) for providing the 16S rDNA standards used here.

<sup>21</sup> Corresponding author : pierre.noziere@clermont.inra.fr

concentrations and a decline in the acetate:propionate ratio for P and Lr + P ( $P = 0.03$  and  $P = 0.08$ , respectively). The 3 DFMs decreased or tended to decrease the methanogen *Archaea* population whereas total bacteria ( $P = 0.1$ ) and *R. albus* ( $P = 0.04$ ) were raised by Lp + P and Lr + P respectively. Animal performances were not affected but P tended to increase hemicellulose digestibility (+ 6.7%;  $P = 0.08$ ). On the LSD used to induce butyric SARA, DFMs did not alter ruminal fermentation parameters. In the same time, P tended to increase total bacteria ( $P = 0.06$ ), whereas Lp + P increased amylase and cellulase activities ( $P = 0.05$ ) and tended to increase xylanase activity ( $P = 0.09$ ). Without adverse effects on intake and milk production, DM, OM and hemicellulose digestibilities were enhanced by 2.46, 2.15 and 9.31% respectively ( $P = 0.04$ ; 0.02 and 0.07) in cows supplemented with Lp + P, whereas supplementation with Lr + P increased NDF and ADF digestibilities ( $P < 0.05$ ) and decreased methane emissions by 25% ( $P < 0.05$ ). By preventing pH decline in cows fed the HSD and improving feed digestibility and methane output reduction in cows fed the LSD, this study shows that DFMs effectiveness is conditioned by ruminal fermentation patterns.

**Key Words:** dairy cow, DFM, SARA, digestion, methane, fermentation patterns

## INTRODUCTION

The use of bacterial DFMs to prevent SARA in ruminants has not received much attention and contrasted effects were obtained on animal performances. In dairy cows, feeding *P. freudenreichii* strains (P169 or PF24) increased milk production only when used in conjunction with *S. cerevisiae* (de Ondarza et Seymour, 2008 ; Lehloenyha *et al.*, 2008b ; Stein *et al.*, 2006) but never when used alone or with lactobacilli (Francisco *et al.*, 2002 ; Raeth-Knight *et al.*, 2007 ; Weiss *et al.*, 2008). Thus, milk production improvement cannot be attributed to the bacterium fed since such effect was already reported for *S. cerevisiae* (Chaucheyras-Durand et Durand, 2010 ; Desnoyers *et al.*, 2009). Relative to ruminal fermentation modulation, Raeth-Knight *et al.* (2007) did not report any effect on ruminal fermentations and pH when PF24 was used in association with two *Lb. acidophilus* strains (LA45 or LA747). Weiss *et al.* (2008) observed a decrease in acetate with an increase in propionate and butyrate proportions when P169 was fed to early lactation dairy cows, but pH was not monitored in that study. Because microbial fermentations during SARA are unstable and unpredictably oriented toward propionate and butyrate, we have recently developed an acidosis model in which propionic and butyric SARA situations were efficiently induced in wethers (Lettat *et al.*, 2010). Using this model, Lettat *et al.* (2011) showed that feeding wethers with *Lactobacillus* and *Propionibacterium*-based DFMs could be useful to prevent SARA thanks to their ability to modulate ruminal fermentations and maintain a higher pH in supplemented wethers. Moreover, they showed that DFMs effectiveness was conditioned by

ruminal fermentation patterns (Lettat *et al.*, 2011). To validate the previous results, we conducted an original study where we monitored the effects of *Propionibacterium* and *Lactobacillus*-based DFMs on ruminal fermentation and microbial parameters, nutrient digestibility, animal performances, and methane emissions of early lactation Holstein dairy cows fed with two diets used in practice.

## MATERIALS AND METHODS

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](http://www2.vet-lyon.fr/ens/expa/acc_regl.html) for details). The experiment was approved by the Auvergne regional ethic committee for animal experimentation, approval number CE20-09.

### **Animals, diets and experimental procedure**

Eight lactating Holstein cows (2 primi- and 6 multiparous) fitted with ruminal cannulas were allocated to 2 groups of 4 animals differing by the nature of their diet (high starch diet (**HSD**) vs. low starch diet (**LSD**); Table 1) in order to induce two subacute ruminal acidosis situations with propionate and butyrate as the main fermentation end products. At the initiation of the experiment, DIM averaged  $76 \pm 19$  and  $67 \pm 22$  d (mean  $\pm$  SD), BW was  $587 \pm 20$  and  $596 \pm 43$  kg and milk production was  $27 \pm 3$  and  $28 \pm 6$  kg /d for the cows on the HSD and LSD, respectively. Cows in each group were randomly assigned to four treatments in a  $4 \times 4$  Latin square design. The treatments were 1) control without DFM (C), 2) *Propionibacterium* P63 (P), 3) *Lactobacillus plantarum* strain 115 plus P (Lp + P) and 4) *Lb. rhamnosus* strain 32 plus P (Lr + P). To ensure an entire consumption of the DFM, the 4 treatments were mixed with a small portion of concentrate (sampled from their diet) and offered before the morning feeding. Cows on the DFM treatments received  $10^{10}$  CFU / d of each strain whereas control cows received only carrier (lactose). The DFM were especially prepared for this study by Danisco SAS (Dangé St Romain, France). To minimize the carryover from period-to-period, on the last day of period 1, 2 and 3, the rumen of each cow was manually emptied and the ruminal contents were placed into the rumen of the next cow within the square that was to receive that treatment. Thus, each cow started the period with ruminal contents corresponding to the same treatment it was fed (Beauchemin *et al.*, 2003).

Diets were formulated at the beginning of the experiment from milk yield to meet the requirements for maintenance and milk production of the cow (INRA, 1989) and were readjusted each experimental period assuming a monthly decrease in milk production of 10%. Moreover, the diets were free of

antibiotics, chemical buffers and yeast to avoid any interfering with DFM effect. Concentrates were top-dressed on the silages to favor acidosis induction by its rapid ingestion. Each experimental period lasted 1 month, and the 2 last weeks were used for animal performances (wk 3) and ruminal parameters measurements (wk 4).

### **Lactation study during wk 3**

**Intake and feed analysis** To calculate DMI, feed intakes and orts were recorded weekly on five consecutive days throughout the entire experiment. DM content was measured at 103 °C for 24h twice weekly for silages and hay, and once a week for concentrates. During wk 3 of each experimental period, daily samples of each ingredient (exception made for urea, cane molasses and CMV that were only sampled on the first period and for which the composition was thought to be stable over time) were taken and stored at 4 °C for concentrates and hay, and at -20 °C for corn and grass silage pending chemical composition determination. At the end of the experiment, dried (60°C for 48h) silages and hay samples, as well as pooled concentrate samples were ground to pass through 1-mm screen then analyzed for OM, NDF, ADF, starch, nitrogen, GE and ether extract. Moreover, fresh samples of concentrate and forages were freeze-dried and ground (1 mm) for fatty acids analysis. All the feedstuff analyses were performed as previously reported (Martin et al., 2008). OM by ashing at 550°C for 6 h (AOAC, 1990), nitrogen content of feed was analyzed by the Kjeldahl procedure.). 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) and AOAC procedure (1997) was used for ether extract analysis. The GE content was determined using an adiabatic bomb calorimeter (IKA C200, Bioritech, Guyancourt, France).

**Milk yield and composition** Cows were milked twice daily (0730 and 1500h) throughout the entire experiment and milk was analyzed twice a wk (non-consecutive days) for fat, protein, lactose and somatic cell counts (**SCC**) using standard procedure (AOAC, 1997).

**Diet Digestibility** During wk 3, feces and urine were collected on 6 consecutive days were used for total tract digestibility determination. Each day, feces were collected, weighed and mixed. 1% aliquot was used for DM determination at 103°C for 24h, and 0.5% aliquot was collected and pooled within a Latin square by treatment. At the end of the experiment pooled samples were dried (60°C for 72h) then ground (1-mm screen) then analyzed for OM, NDF, ADF, starch as described previously.



**Methane emissions** They were determined during the same period of digestibility measurement by using the sulfur hexafluoride (SF<sub>6</sub>) tracer technique (Johnson et al., 2007) as previously described (Martin et al., 2008). Permeation rate of SF<sub>6</sub> from the tubes was 1.503 ± 0.145 mg/d. At wk-2 of each experimental period (1 wk before gas analysis), each cow was intraruminally dosed with a calibrated permeation tube. Representative breath samples from each animal were sampled in pre-evacuated (91.2 kPa) yoke-shaped polyvinyl chloride collection devices (~2.5 L) by means of capillary and Teflon tubing fitted to a halter. The collection devices were changed every 24 h before the morning feeding. Background concentrations of SF<sub>6</sub> and CH<sub>4</sub> were also measured in ambient air samples collected every day in the shed during the same 6-d breath sampling period. The devices containing the samples were immediately transported to the laboratory and over-pressured with nitrogen gas prior to SF<sub>6</sub> and CH<sub>4</sub> analyses by gas chromatography. Daily CH<sub>4</sub> production from each animal was calculated according to Martin et al. (2008), using the known permeation rate of SF<sub>6</sub> and the concentrations (above the background) of SF<sub>6</sub> and CH<sub>4</sub> in the breath samples:

$$CH_4 (g / d) = SF_6 \text{ permeation rate } (g / d) \times [CH_4] / [SF_6]$$

For gas analysis in breath and ambient air, we used a gas chromatograph (CP-9003, Varian-Chrompack, Les Ulis, France) fitted with an electron capture detector (Autosystem XL, Perkin Elmer Instruments, Courtaboeuf, France) and equipped with a Molecular Sieve 0.5-nm column (3 m x 3.2 mm i.d.; Interchim, Montluçon, France) maintained at 50 °C for SF<sub>6</sub>, or fitted with a flame ionization detector and equipped with a Porapak N 80–100 mesh column (3 m x 3.2 mm i.d.; Alltech France SARL, Templemars, France) maintained at 40 °C for CH<sub>4</sub>. The flow rate of the carrier gas was 30 mL.min<sup>-1</sup> of N<sub>2</sub> for the SF<sub>6</sub> and 40 mL.min<sup>-1</sup> of Helium for the CH<sub>4</sub>. Chromatographic analyses were performed after calibration with standard gases (Air Liquide, Mitry-Mory, France) for SF<sub>6</sub> (55 and 195 µg/g) and CH<sub>4</sub> (100 µg/g).

#### **Rumen fermentation study during wk 4**

**Rumen sample collection and treatments before analysis** During the last wk of each experimental period (wk 4), ruminal content samples (200 g) were taken from the ventral sac of the rumen through the cannula, before and 3 h after the morning feeding. The ruminal pH was immediately measured with a portable pH-meter (CG840, electrode Ag/AgCl, Schott Geräte, Hofheim, Germany). The samples were then treated for fermentation and microbial parameters measurements as follows: 30 g of ruminal content were immediately taken to the laboratory for enzymes extraction from the solid-adherent microbial community (SAM) under anaerobic conditions. An aliquot of 10 g of ruminal content was homogenized in ice using a Polytron grinding mill (Kinematica GmbH, Steinhofhalde Switzerland) at

speed 5, for two 1 min cycles with 1 min rest between cycles. Subsequently 2 aliquots of 1.5 g were stored at -80 °C until DNA extraction for bacterial quantification using qPCR. For ruminal fermentation characteristics, 100 g of ruminal content were strained through a polyester monofilament fabric (250 µm mesh aperture) and the filtrate was used for analysis of VFA, lactic acid, ammonia and protozoa counting. For VFA, aliquot of 0.8 mL of fresh rumen juice was mixed with 0.5 mL of a 0.5 N HCl solution containing 0.2% (w/v) metaphosphoric acid and 0.4% (w/v) crotonic acid. For NH<sub>3</sub>-N, 5 mL of ruminal filtrate were mixed with 0.5 mL of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. The filtrates were stored at -20 °C until analysis. For protozoa, 3 ml of the fresh filtrate was mixed with 3 ml of methyl green, formalin and saline solution (MFS) and preserved from light until counting. For each sampling time, the ruminal contents were dried at 103 °C during 24 h for DM determination.

### **Measurements**

**Ruminal fermentations** volatile fatty acids and lactate concentrations were respectively determined by gas chromatography (CP 9002 Gas Chromatography, Chrompack, Middelburg, Germany) and an enzymatic method (Enzyplus EZA 891+, D/L-Lactic Acid, Raisio Diagnostics, Rome, Italy) as described in Lettat et al. (2010). For NH<sub>3</sub>-N, 5 mL of ruminal filtrate were mixed with 0.5 mL of 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and stored at -20 °C until analysis. Thawed samples were centrifuged at 10,000 g for 10 min and NH<sub>3</sub>-N concentration was determined in the supernatant using the Berthelot reaction (Park et al., 2009). The reaction was carried out in duplicate in 96-well plates using Infinity M200 spectrophotometer (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria).

**Protozoa counting** Protozoa were enumerated in a Dolfuss cell (Elvetec Services, Clermont-Ferrand, France) according to the method of Jouany and Senaud (1983).

**Polysaccharidase activities of solid-associated microorganisms** Polysaccharidase activities involved in the degradation of plant cell wall (EC 3.2.1.4 - cellulase and EC 3.2.1.8 - endo-1,4-beta-xylanase xylanase) and starch (EC 3.2.1.1 - α-amylase) were determined from the solid-associated microorganisms (SAM) as already described (Lettat et al., 2010 ; Martin et Michalet-Doreau, 1995). Briefly, 30 g of solid phase were washed with 350 mL anaerobic MES buffer (pH 6.5, 39 °C) to remove the non-associated and loosely-associated microbial communities, and then recovered by filtration (100 µm). A sample (5 g) of washed digesta containing the SAM was cut to under anaerobic environment then suspended in 25 mL of anaerobic MES buffer and stored at -80 °C pending enzyme extraction. SAM fraction was disrupted by defrosting and ultrasonic disintegration (four 30-s periods with 30-s

intervals at 4 °C; Sonicator S-400, Misonix Inc., Farmingdale, NY, USA). The enzymes were recovered by centrifugation (15 000 g, 15 min, 4 °C), and the supernatant was stored in capped tubes at -80 °C before assay. Polysaccharidase activities were determined by assaying the amount of reducing sugars released from purified substrates (birchwood xylan, carboxymethyl cellulose and potato starch) after 1 h at 39 °C. Briefly, the reducing sugars were converted into colored product using PAHBAH (4-hydroxybenzhydrazide) in the presence of bismuth and quantified spectrophotometrically at 410 nm (Lever, 1977). The protein content of the enzyme preparations was determined according to Pierce and Suelter (Pierce et Suelter, 1977) using bovine serum albumin as standard in 96 well plates using Infinity M200 spectrophotometer (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Enzyme activities were expressed as  $\mu\text{mol}$  of reducing sugar released per mg protein per hour.

**Bacterial quantification by qPCR** The DNA extraction was performed using the Fast DNA Spin Kit and purification was done with the Gene Clean turbo Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer instructions. Briefly, 250 mg of frozen milled ruminal contents were weighed into the provided sterile tube containing silica beads and lysis buffer. Lysis of bacteria was performed using a Precellys 24 apparatus (Bertin Technology, France). The yield and the purity of the extracted nucleic acids were assessed by optical density measurement with a Nanoquant Infinite M200 apparatus (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) using a dedicated quantification plate. Absorbance intensity at 260 nm was used to assess the concentration of nucleic acids in 2  $\mu\text{L}$  of sample, while absorbance ratios 260/280 and 260/230 were used to check sample purity (protein and salts contamination, respectively). Quantitative PCR (qPCR) was carried out using AB StepOne Plus System (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). Detection was based on SYBR green chemistry. The reaction mix contained 1 $\times$  SYBR Premix Ex Taq (Lonza Verviers SPRL, Verviers, Belgium), 0.5  $\mu\text{M}$  of each forward and reverse primer and 2  $\mu\text{L}$  of genomic DNA at a concentration of 40 ng /  $\mu\text{L}$ . Each reaction was run in triplicate in a final volume of 20  $\mu\text{L}$  in 96-well plates (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France). During this study, we quantified total bacteria, *Prevotella* genus, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus* genus, *Megasphaera elsdenii* and methanogen *Archaea* using specific primers that target the *rrs* genes for which sequences and amplification programs are summarized in Tables 2 and 3. For this study we chose to realize an absolute quantification using specific 16S rDNA standards from *R. flavefaciens* c94 (ATCC 19208), *R. albus* 7(ATCC 27210), *F. succinogenes* S85 (ATCC 19169), *S. bovis* (DSM 20480), *P. bryantii* B14 (DSM 11371), *M. elsdenii* (DSMZ 20460), *Lb. acidophilus* and *Methanobrevibacter smithii* (DSM 861). Results of enumeration of each species are expressed as % of total bacteria / g DM of rumen content.

### **Statistical procedure**

All data were analyzed in repeated time using the MIXED procedure of SAS with SP(POW) as covariance structure. Within each Latin square, the period (1 to 4), treatment (C vs. P, vs. Lp + P, vs. Lr + P), time (-1 vs. + 3h; only for rumen characteristics), and treatment × time interactions were considered as fixed effect, and animal as random. Results were considered significant for  $P$ -value < 0.05 and trends were discussed at  $0.05 < P < 0.1$ . As no effect of DFM treatment was observed before feeding (-1 h) only data after feeding (+ 3 h) will be presented and discussed below.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

We aimed to induce two SARA situations in dairy cows using diets that differ in the amount and rate of degradation of their carbohydrates. The HSD was used to induce a propionic SARA whereas butyric SARA was expected using the LSD. Accordingly to our hypothesis that DFMs mode of action to prevent SARA depends on the ruminal fermentation patterns, we compared their effectiveness to regulate ruminal fermentations under the two situations induced. Because SARA definitions reported in the literature are inconsistent (Lettat et al., 2010), we choose the definition proposed by Sauvant et al. (1999) which considers a mean ruminal pH of 6.25 as SARA threshold because it corresponds to a meantime of 4 h where pH is between 5.6 and 6.25 (Sauvant et al., 1999). Thus, according to this definition SARA has been successfully induced using the two diets (mean pH of 5.73 and 5.94 for the HSD and LSD, respectively).

### **The rumen fermentation study**

DFMs effects on ruminal fermentations and microbial parameters are presented on Table 4 and 5. With the HSD diet used to induce propionic SARA situation, DFMs increased both minimum and mean ruminal pH by + 0.24 and + 0.41 pH units on average, respectively. This advantageous effect on pH was associated with a concomitant reduction in lactate concentrations (Table 4). No effect was observed on total VFA but cows that received P and Lr + P favored propionate production at the expense of acetate and/or butyrate as shown by the acetate:propionate ratios that reached 1.55 and 1.69 ( $P < 0.05$ ), respectively. For cows supplemented with Lp + P, ruminal fermentations were similar to the two other treatment but changes were not significant ( $P > 0.1$ ). Supplementing cows with the 3 DFMs decreased or tended to decrease methanogens community. No other effect was observed on the microbial communities except an increase in *R. albus* proportion and trends in total bacteria in cows supplemented with Lr + P and Lp + P, respectively. In cows fed the LSD, ruminal fermentation parameters were not affected by DFMs supplementation except a decline in lactate concentration for cows treated with P ( $P = 0.04$ ). This same treatment tended to increase total bacteria ( $P = 0.06$ ). Lp +P

increased amylase and cellulase activities ( $P = 0.05$ ) and tended to improve xylanase activity ( $P < 0.1$ ). Whilst not wishing to be bound by any theory we think that DFMs did not alter ruminal pH and fermentations because the ruminal environment was not acidotic enough as it was the case with the cows fed the HSD diet.

There is very limited dairy cow research reporting the effect of bacterial DFM supplementation on ruminal fermentations and especially for SARA prevention. Moreover, when bacterial DFMs were used, the experimental conditions (including physiological state of animals, diets, DFMs strains and doses) varied strongly among studies which make results evaluation somewhat knotty. Relative to the use of propionibacteria and lactobacilli based DFMs, Raeth-Knight et al. (2007) did not observe any effect on ruminal fermentations and pH after supplementing midlactation Holstein dairy cows with *P. freudenreichii* (PF24) in conjunction with one or two *Lb. acidophilus* strains (LA747 and LA45). Weiss et al. (2008) reported an increase in propionate and butyrate proportions and a decrease in acetate after supplementing early lactation cows with *P. freudenreichii* P169, unfortunately, ruminal pH was not monitored. When bacteria and yeast were used in association, Chiquette et al. (2009) reported a decrease in acetate and an increase in propionate and butyrate proportions with a 0.43 pH units increase (from 5.41 to 5.84) in early lactation cows fed both *E. faecium* and *S. cerevisiae* (Chiquette, 2009). Along with our study, this study is the second that reports a specific DFM effect on bovine because the diets used do not contain chemical buffers as it's generally the case, and especially in two studies reported by Nocek (Nocek et al., 2002 ; Nocek et al., 2003) where the use of lactic acid producing bacteria (*E. faecium* and *Lb. plantarum*) in conjunction with *S. cerevisiae* raised ruminal pH. Relative to microbiological parameters, the present study is the first to report beneficial effects on enzymatic activities and bacteria involved in starch and fiber degradation. Finally, by contrast with the previous studies where prevention of ruminal pH decline was obtained using yeast and bacteria (Chiquette, 2009 ; Nocek et al., 2002 ; Nocek et al., 2003), the beneficial effect we observed for propionic SARA, which is the most often encountered in intensive feeding systems (Lettat et al., 2010), is unique because it's specific of bacterial DFM.

### **The animal performances study**

*Intake and milk production* Supplementing dairy cows fed either the HSD or the LSD with *Propionibacterium* P63 alone or combined with *Lb. plantarum* 115 or *Lb. rhamnosus* 32 had no effect on intake, milk yield and composition (Table 6). The lack of effect on DMI is not surprising because the rare data reporting the use of propionibacteria alone (Francisco et al., 2002 ; Weiss et al., 2008) or in association with lactobacilli strains (Raeth-Knight et al., 2007; West et al., 2005) did not improve DMI.

This is also true for DFMs made by lactobacilli strains alone (Gomez-Basauri *et al.*, 2001 ; Ware *et al.*, 1988) or combined with *S. cerevisiae* (Block *et al.*, 2000 ; Nocek *et al.*, 2003) as well for others DFM preparations using *M. elsdenii* (Hagg *et al.*, 2010). Only one study reported a 2.7 kg increase in DMI when *E. faecium* and *S. cerevisiae* preparation was fed to dairy cows (Nocek et Kautz, 2006). Moreover, this lack of effect is not specific to dairy cows because similar response was obtained with feedlot cattle fed propionibacteria (Kim and Rust 2002; Lehloenya *et al.*, 2008a), lactobacilli (Beauchemin *et al.*, 2003 ; Brashears *et al.*, 2003 ; Peterson *et al.*, 2007) or a combination of both (Elam *et al.*, 2003 ; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Milk yield response to DFM supplementation is more contrasted and seems to be conditioned by the DFM strains used. Indeed, better effects were obtained when using lactobacilli strains alone (Gomez-Basauri *et al.*, 2001 ; Jaquette *et al.*, 1988 ; Ware *et al.*, 1988), or combined with *S. cerevisiae* (Block *et al.*, 2000 ; Komari *et al.*, 1999 ; Nocek et Kautz, 2006 ; Nocek *et al.*, 2003), or when the *S. cerevisiae* is associated with propionibacteria strains (de Ondarza et Seymour, 2008 ; Lehloenya *et al.*, 2008b ; Stein *et al.*, 2006). Thus, our results are consistent with those already published (Francisco *et al.*, 2002 ; Raeth-Knight *et al.*, 2007 ; Weiss *et al.*, 2008) reporting no improvement in milk production for dairy cows supplemented with propionibacteria alone or both propionibacteria and lactobacilli strains. Only West *et al.* (2005) reported a milk increase in cows supplemented with *P. freudenreichii* plus *Lb. acidophilus*; however, this work has not been published in scientific peer-reviewed journals. Even if propionate proportions were increased in our study for cows fed the HSD and supplemented with P and Lr + P, milk yield was not changed by the treatment indicating that mechanism by which DFMs may increase milk production is still unclear. Stein *et al.* (2006) reported an increase in milk yield in cows supplemented with *P. freudenreichii* P169 which was attributed to the increase in ruminal propionate that should increase blood glucose concentration *via* gluconeogenesis and subsequently increase milk lactose (Brockman, 1990 ; de Ondarza et Seymour, 2008 ; Stein *et al.*, 2006). However, milk increase observed in de Ondarza *et al.* (2008) and Stein *et al.* (2006) studies cannot be attributed to the bacterial DFM P169 because the TMR used contained live yeast for which milk and DMI improvement have already been reported (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008 ; Desnoyers *et al.*, 2009). Concerning milk composition, animal responses to DFM supplementation have been inconsistent, but any beneficial effect was observed for DFMs made of propionibacteria alone (Francisco *et al.*, 2002 ; Weiss *et al.*, 2008) or a combination of propionibacteria and lactobacilli (Raeth-Knight *et al.*, 2007; West *et al.*, 2005). Similarly to the Francisco *et al.* (2002) and Raeth-Knight *et al.* (2007) studies, our study may not have been carried out over a period long enough (1 month) to observe the advantageous effects that



occurred with P169 in Stein et al. (2006) where cows were supplemented for 32 weeks (from -2 to 30 wk postpartum).

**Diet digestibility** Total tract digestibility of DM, OM, NDF, ADF, hemicellulose and starch are presented in Table 7. On the HSD, cows supplemented with P tended to increase hemicellulose digestion (+ 6.71%,  $P = 0.08$ ). By contrast, DFMs effects were more pronounced on the LSD when the propionibacteria and lactobacilli combinations were fed. Indeed, Lp + P supplement improved DM and OM digestion by 2.46 and 2.15% ( $P < 0.05$ ) respectively, and tended to increase hemicellulose digestion by 9.31% ( $P = 0.07$ ). NDF and ADF digestibilities were also improved by 6.00 and 4.31% ( $P < 0.05$ ) respectively in cows fed Lr + P. These beneficial effects on digestibility, especially with the LSD, could be related to the increase in total bacteria, as well as to the enzymatic activities improvement, especially for cows supplemented with Lp + P. Nocek and Kautz (2006) reported an improvement in ruminal digestibility of DM from forage for cows supplemented with both *E. faecium* and *S. cerevisiae*; however, this effect cannot be specifically attributed to the lactic-acid producing bacteria used. In steers fed a 91% concentrate diet, supplementation with *Propionibacterium* P15 alone or in association with *E. faecium* EF 212 had no direct effect on digestibility measured as in situ disappearance of DM at 24 h (Ghorbani et al., 2002). In the same feeding conditions, Beauchemin et al. (2003) observed that supplementing steers with *E. faecium* tended to increase OM total tract digestibility and to decrease NDF digestibility in the intestine. When *E. faecium* was used in conjunction with *S. cerevisiae* ruminal digestion of ADF was impaired (Beauchemin et al., 2003).

**Methane production** Because methane represents a fed energy waste for the animal and an increasing concern of the role of livestock on climate change, various nutritional attempts, as increasing starch proportion in the diet, supplementing with lipids and plant extracts are promising strategies to reduce its production (Beauchemin et McGinn, 2005 ; Martin et al., 2010 ; Martin et al., 2008). In this study, we used DFMs that constitute a potentially effective approach for methane mitigation thanks to their ability to alter ruminal fermentation patterns. Daily methane emissions are presented in Table 8. Loss of GE intake as eructed methane averaged 4.1 and 5.9% for cows fed the HSD and LSD by producing 207 and 288 g/d of CH<sub>4</sub>, respectively. This difference in methane emission among the two diets is in agreement with the fact that high starch diets produce less methane (Beauchemin et McGinn, 2005 ; Martin et al., 2010 ; Martin et al., 2008). Cows fed the HSD produced similar amounts of methane for all treatments; except for those supplemented with Lp + P that produced approximately 20% less methane compared to control cows but this was not statistically significant ( $P > 0.1$ ). On the LSD, cows supplemented with Lr + P depressed methane production by 25% on average ( $P < 0.05$ ) whatever the

expression units used. Because ruminal fermentation and microbial parameters as well as intake and milk production remained similar among treatments, we cannot easily explain how Lr + P depressed methane production. However, this effect could be related to the fiber digestibility improvement observed for this same treatment. Morgavi et al. (2010) reported that methane production is directly related to the number of protozoa, but no clear relationship was established between methanogenesis and methanogen *Archaea* numbers (Morgavi et al., 2010). In this study, *Archaea* and protozoa numbers were similar among treatments; thus, methane output reduction may not be due to hydrogen availability but to reduction in *Archaea* activity as it was recently observed in our laboratory (Popova *et al.*, 2011) by quantifying the functional *mcrA* gene expression using reverse transcriptase qPCR (RT-qPCR). So far, there is limited *in vivo* research dealing with the effect of DFMs on methanogenesis. Relative to yeast, 2 studies reported contrasted results. Indeed, while *S. cerevisiae* addition did not affect methane production in sheep (Mathieu et al., 1996), supplementing sheep with *Trichosporon sericeum* decreased methane output (L/d) by 10% with a concomitant decrease in DMI (Mwenya et al., 2004) which may account for the difference. In this same study, methane production was also decreased by approximately 10% in sheep supplemented with  $\beta$ 1-4 galacto-oligosaccharide (a prebiotic), whereas the bacterial DFM *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* was ineffective (Mwenya et al., 2004). Our study is the first to demonstrate efficient methane mitigation in ruminant without negative effects on ruminal fermentations and animal performances using bacterial DFMs. However, mechanisms by which *Lb. rhamnosus* 32 plus *Propionibacterium* P63 act remain to be elucidated.

In conclusion, our study shows that propionibacteria and lactobacilli-based DFMs effectiveness in dairy cows is conditioned by ruminal fermentation patterns. During propionic SARA, the three DFMs mitigated pH decline by increasing propionate production that reduces the hydrogen available for protons formation. Moreover, an improvement in the ruminal buffering capacity may have accounted for that. By contrast, in cows fed the LSD, using both P63 and the two lactobacilli strains was more effective than P63 alone. Indeed, supplementing cows with Lp + P increased fiber digestibility which can be related to fibrolytic enzymes activities improvement, whereas Lr + P increased fiber digestibility and reduced methane production. Based on these original results, the DFMs evaluated in this work could be useful to prevent SARA or mitigate methane outputs in dairy cows. However, precise mode of action determination as well as field studies involving higher animal number must be achieved before their recommendation.



## LITERATURE CITED

- AFNOR. 1985. Aliments des animaux. Méthodes d'analyses françaises et communautaires. Dosage de l'amidon. Pages 123–125 in Méthode polarimétrique. 2nd ed. Assoc. Fr. Normalisation, Paris, France.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 14th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis. 16th ed. Assoc. Off. Anal. Chem, Gaithersburg, MD.
- Beauchemin, K. A., and S. M. McGinn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim Sci.* 83: 653-661.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavi, G. R. Ghorbani, W. Kautz, and J. A. Leedle. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 1628-1640.
- Bekele, A. Z., S. Koike, and Y. Kobayashi. 2010. Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 305: 49-57.
- Block, E., J. E. Nocek, W. P. Kautz, and J. A. Z. Leedle. 2000. Direct fed microbial and anionic salt supplementation to dairy cows fed 21 days pre- to 70 days postpartum. *J. Anim. Sci.* 78(Suppl. 1):304.
- Brashears, M. M., M. L. Galyean, G. H. Loneragan, J. E. Mann, and K. Killinger-Mann. 2003. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J. Food Prot.* 66: 748-754.
- Brockman, R. P. 1990. Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. *Br. J. Nutr.* 64: 95-101.
- Chaucheyras-Durand, F., and H. Durand. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.* 1: 3-9.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145: 5-26.
- Chiquette, J. 2009. Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153: 278-291.
- de Ondarza, M. B., and W. M. Seymour. 2008. Case study: Effect of propionibacteria supplementation on yield of milk and milk components of dairy cows. *Professional Animal Scientist.* 24: 254-259.
- Desnoyers, M., S. Giger-Reverdin, G. Bertin, C. Duvaux-Ponter, and D. Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92: 1620-1632.
- Elam, N. A., J. F. Gleghorn, J. D. Rivera, M. L. Galyean, P. J. Defoor, M. M. Brashears et al. 2003. Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and

- Propionibacterium freudenreichii on performance, carcass, and intestinal characteristics, and Escherichia coli strain O157 shedding of finishing beef steers. J. Anim Sci. 81: 2686-2698.
- Francisco, C. C., C. S. Chamberlain, D. N. Waldner, R. P. Wettemann, and L. J. Spicer. 2002. Propionibacteria fed to dairy cows: effects on energy balance, plasma metabolites and hormones, and reproduction. J. Dairy Sci. 85: 1738-1751.
- Ghorbani, G. R., D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin, and J. A. Leedle. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. J. Anim. Sci. 80: 1977-1985.
- Gomez-Basauri, J., M. B. de Ondarza, and J. Siciliano-Jones. 2001. Intake and milk production of dairy cows fed lactic acid bacteria and mannanoligosaccharide. J. Dairy Sci. 84(Suppl. 1):283.
- INRA. 1989. Ruminant Nutrition: Recommended Allowances and Feed Tables, INRA Editions, Paris, France.
- Jaquette, R.D., R. J. Dennis, J. A. Coalson, D. R. Ware, E. T. Manfredi, and P. L. Read. 1988. Effect of feeding viable Lactobacillus acidophilus (BT1386) on performance of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 71(Suppl. 1):219.
- Johnson, K. A., H. H. Westberg, J. J. Michal, and M. W. Cossalman. 2007. The SF6 tracer technique: Methane measurement from ruminants. In: H. P. S. Makkar and P. E. Vercoe (eds.) Measuring Methane Production From Ruminants. p 33-67. Springer Netherlands.
- Jouany, J.-P., and J. Senaud. 1983. Influence des ciliés du rumen sur l'utilisation digestive de différents régimes riches en glucides solubles et sur les produits terminaux formés dans le rumen. II. — Régimes contenant de l'inuline, du saccharose et du lactose. Reprod. Nutr. Dev.. 23:607-623.
- Komari, R. K., Y. K. L. Reddy, J. Suresh, and D. N. Raj. 1999. Effect of feeding yeast culture (Saccharomyces cerevisiae) and Lactobacillus acidophilus on production performance of crossbred dairy cows. J. Dairy Sci. 82(Suppl. 1):128.
- Lehloenya, K. V., D. R. Stein, D. T. Allen, G. E. Selk, D. A. Jones, M. M. Aleman et al. 2008. Effects of feeding yeast and propionibacteria to dairy cows on milk yield and components, and reproduction. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 92: 190-202.
- Lettat, A., P. Noziere, M. Silberberg, D. P. Morgavi, C. Berger, and C. Martin. 2010. Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. J. Anim. Sci. 88: 3041-3046.
- Lettat, A., P. Noziere, M. Silberberg, D. P. Morgavi, C. Berger, and C. Martin. 2011. Direct-fed microbials minimize subacute ruminal acidosis but not lactic acidosis in sheep. J. Anim. Sci. (submitted).
- Lever, M. 1977. Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. Anal. Biochem. 81: 21-27.

- Martin, C., and B. Michalet-Doreau. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67: 407-413.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4: 351-365.
- Martin, C., J. Rouel, J. P. Jouany, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J. Anim. Sci.* 86: 2642-2650.
- Mathieu, F., J. Jouany, J. Sénaud, J. Bohatier, G. Bertin, and M. Mercier. 1996. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Dev.* 36: 271-287.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.* 4: 1024-1036.
- Mosoni, P., C. Martin, E. Forano, and D. P. Morgavi. 2011. 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. *J. Anim. Sci.* (in press).
- Mwenya, B., B. Santoso, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, I. Arai, and J. Takahashi. 2004. Effects of including [beta]1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115: 313-326.
- Nocek, J. E., and W. P. Kautz. 2006. Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 260-266.
- Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, and J. G. Allman. 2002. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85: 429-433.
- Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, and E. Block. 2003. Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. *J. Dairy Sci.* 86: 331-335.
- Park, G., H. Oh, and S. Ahn. 2009. Improvement of the ammonia analysis by the phenate method in water and wastewater. *Bull. Korean Chem. Soc.* 30: 2032-2038.
- Peterson, R. E., T. J. Klopfenstein, G. E. Erickson, J. Folmer, S. Hinkley, R. A. Moxley et al. 2007. Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. *J. Food Prot.* 70: 287-291.
- Pierce, J., and C. H. Suelter. 1977. An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Anal. Biochem.* 81: 478-480.

- Popova, M., C. Martin, M. Eugène, M. M. Mialon, M. Doreau, and D. P. Morgavi. 2011. Diet composition influences methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.*: in press.
- Raeth-Knight, M. L., J. G. Linn, and H. G. Jung. 2007. Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 1802-1809.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Components of ruminal acidosis and acidogenic effects of diets. *INRA Prod. Anim.* 12: 49-60.
- Stein, D. R., D. T. Allen, E. B. Perry, J. C. Bruner, K. W. Gates, T. G. Rehberger et al. 2006. Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 89: 111-125.
- Stevenson, D. M., and P. J. Weimer. 2007. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 165-174.
- 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. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Vasconcelos, J. T., N. A. Elam, M. M. Brashears, and M. L. Galyean. 2007. Effects of increasing dose of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (Strain NP 51) combined with a single dose of *Propionibacterium freudenreichii* (Strain NP 24) on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. *J. Anim. Sci.*: jas.2007-0526.
- Ware, D. R., P. L. Read, and E. T. Manfredi. 1988. Lactation performance of two large dairy herds fed *Lactobacillus acidophilus* strain BT138 in a switchback experiment. *J. Dairy Sci.* 71(Suppl. 1):219.
- Weiss, W. P., D. J. Wyatt, and T. R. McKelvey. 2008. Effect of feeding propionibacteria on milk production by early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 646-652.
- West, J. W., J. K. Bernard, G.H. Cross, and D.S. Trammell. 2005. Effects of Live Bacterial Inoculants on Performance of Lactating Dairy Cows. [http://www.bovamine.com/publications/Georgia\\_Final\\_report.pdf](http://www.bovamine.com/publications/Georgia_Final_report.pdf).

**Table 1:** Ingredients and chemical composition of the experimental diets

	High Starch Diet (HSD)	Low Starch Diet (LSD)
Ingredients, % DM		
Corn silage	44	.1
Grass silage	-	55
Hay	11	-
Grain mix <sup>2</sup>	35.3	-
Soybean meal	8.7	8
Urea	1	-
Citrus pulp	-	12
Dehydrated beet pulp	-	20
Molasses, beet	-	5
Mineral-vitamin premix (kg / d) <sup>3</sup>	0.25	0.25
Chemical composition <sup>4</sup>		
FUL / kg DM <sup>5</sup>	0.99	0.96
PDIE, g/kg DM <sup>6</sup>	109	106
OM, % of DM	90.28	88.74
CP, % of DM	14.84	13.53
NDF, % of DM	36.41	36.95
ADF, % of DM	22.02	27.35
Starch, % of DM	38.17	2.23
Ether extract, % of DM	2.21	2.66
GE, MJ/kg of DM	16.85	16.93

<sup>1</sup>Ingredient not included.

<sup>2</sup>Composition: barley (14%), wheat (11%) and corn (9%) agglomerated with 1% cane molasses.

<sup>3</sup>Composition (g/kg): P, 2.5; Ca, 20; Mg, 4.5; Na, 3.5 (Galaphos Midi Duo GR, CCPA, Aurillac, France).

<sup>4</sup>Chemical analysis was performed on 4 samples per period for silages and hay but on pooled samples for concentrates.

<sup>5</sup>Feed Unit for Lactation (INRA, 1989).

<sup>6</sup>Protein digested in the small intestine supplied by rumen-undegraded dietary protein and by microbial protein from rumen-fermented OM (INRA, 1989).

**Table 2:** 16S rDNA based primers used for qPCR quantification of bacteria and *Archaea*

Target organism	Primer set	Primer sequences 5' - 3'	Source
All bacteria	520 F 799 R2	AGC AGC CGC GGT AAT CAG GGT ATC TAA TCC TGT T	Edwards et al., 2008
<i>F. succinogenes</i>	FibSuc3F FibSuc3R	GCG GGT AGC AAA CAG GAT TAG A CCC CCG GAC ACC CAG TAT	
<i>R. albus</i>	RumAlb3F RumAlb3R	TGT TAA CAG AGG GAA GCA AAG CA TGC AGC CTA CAA TCC GAA CTA A	
<i>R. flavefaciens</i>	RumFla3F RumFla3R	TGG CGG ACG GGT GAG TAA TTA CCA TCC GTT TCC AGA AGC T	Stevenson and Weimer, 2007
Genus <i>Prevotella</i>	PrevGen4F PrevGen4R	GGT TCT GAG AGG AAG GTC CCC TCC TGC ACG CTA CTT GGC TG	
<i>S. bovis</i>	StrBov2F StrBov2R	TTC CTA GAG ATA GGA AGT TTC TTC GG ATG ATG GCA ACT AAC AAT AGG GGT	
<i>M. elsdenii</i>	MegEls1F MegEls1R	GAC CGA AAC TGC GAT GCT AGA CGC CTC AGC GTC AGT TGT C	Khafipour et al., 2009
Genus <i>Lactobacillus</i>	Lacto 05F Lacto 04R	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A CGC CAC TGG TGT TCY TCC ATA TA	Furet et al., 2009
Methanogen <i>Archaea</i>	1174F 1406-1389R	GAG GAA GGA GTG GAC GAC GGTA ACG GGC GGT GTG TGC AAG	Mosoni et al., 2011; Ohene-Adjei et al., 2007

**Table 3:** Summary of the qPCR programs used for bacteria and *Archaea* quantification

Target	Initial heating	40 cycles		
		Denaturation	Annealing / Elongation	Dissociation curve
All bacteria				
<i>F. succinogenes</i>				
<i>R. albus</i>			60 °C, 30 sec	
<i>R. flavefaciens</i>		95 °C, 15 sec		temperature increased by
Genus <i>Prevotella</i>	95 °C, 10 sec			+ 0.3 °C / min from 60 to
<i>S. bovis</i>			63.9 °C, 30 sec	95 °C
<i>M. elsdenii</i>		95 °C, 10 sec	64.9 °C, 15 sec than 72 °C, 15 sec	
Methanogen <i>Archaea</i>		96 °C, 15 sec	63 °C, 15 sec than 72 °C, 30 sec	
Genus <i>Lactobacillus</i>	96 °C, 10 min	97 °C, 30 sec	60 °C, 1 min	

**Table 4:** Effects of DFMs supplementation on the ruminal fermentation characteristics in dairy cows fed two different acidotic diets

	High Starch Diet (HSD)									Low Starch Diet (LSD)							
	C	DFMs <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup> (DFMs vs. C)			C	DFMs			SEM	P-value (DFMs vs. C)			
		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P	
<i>Ruminal fermentation characteristics</i>																	
Ruminal pH																	
Mean	5.73	5.96	6.01	5.93	0.07	0.02	0.004	0.03	5.94	5.94	6.04	6.08	0.08	0.98	0.36	0.20	
Minimum	5.34	5.73	5.85	5.67	0.12	0.03	0.01	0.06	5.73	5.77	5.83	5.87	0.12	0.78	0.51	0.35	
Total VFA, mM	141.4	145.4	135.9	150.9	0.46	0.68	0.57	0.34	144.2	148.4	146.6	137.6	5.63	0.6	0.76	0.4	
Acetate, %	56.63	51.91	53.99	51.83	1.83	0.06	0.27	0.05	62.05	62.1	61.91	62.35	0.79	0.96	0.9	0.79	
Propionate, %	26.03	33.76	29.39	31.61	2.46	0.02	0.29	0.08	17.99	18.21	18.69	17.78	0.35	0.66	0.17	0.69	
Butyrate, %	12.19	9.18	11.45	11.54	1.19	0.07	0.65	0.69	15.06	14.65	14.57	15	0.56	0.59	0.52	0.94	
Minor VFA <sup>3</sup> , %	5.16	5.15	5.17	5.03	0.38	0.99	0.99	0.81	4.91	5.05	4.83	4.87	0.28	0.73	0.84	0.92	
A:P ratio	2.33	1.55	2.06	1.69	0.29	0.03	0.44	0.08	3.46	3.43	3.33	3.53	0.1	0.83	0.36	0.66	
Lactate, mM	3.68	1.15	2.24	1.76	0.55	0.01	0.07	0.02	1.96	0.80	1.37	2.08	0.37	0.04	0.26	0.81	
NH <sub>3</sub> -N, mM	16.15	9.49	11.61	8.9	3.55	0.2	0.38	0.17	10.99	10.15	8.9	8.45	2.04	0.77	0.48	0.39	
Ethanol, mM	4.49	3.92	4.83	5.41	7.49	0.38	0.61	0.17	4.14	4.29	4.15	5.52	0.63	0.87	0.99	0.14	

<sup>1</sup> DFMs: direct-fed microbials.

<sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control cows (C).

<sup>3</sup> Minor VFA: sum of iso-butyrate, iso-valerate, valerate and caproate.



**Table 5:** Effects of DFMs supplementation on enzyme activities and microbial composition in dairy cows fed two different acidotic diets

	High Starch Diet (HSD)									Low Starch Diet (LSD)							
	C	DFMs <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup> (DFM vs. C)			C	DFMs			SEM	P-value (DFMs vs. C)			
		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P					
<i>Specific polysaccharidase activities<sup>3</sup>, μmol of reducing sugar / mg protein / hour</i>																	
Amylase	28.8	35.72	26.26	44.08	14.92	0.74	0.90	0.46	0.56	0.61	3.55	1.38	1.01	0.97	0.05	0.57	
Xylanase	14.94	5.45	6.13	16.39	5.72	0.25	0.29	0.86	9.18	7.85	22.7	6.49	6.09	0.86	0.09	0.73	
Cellulase	0.4	0.52	0.79	1.53	1.19	0.94	0.80	0.46	1.06	1.31	6.04	1.45	1.83	0.92	0.05	0.87	
<i>Rumen bacteria, rrs copies / g DM of rumen content</i>																	
Total bacteria, log <sub>10</sub>	12.49	12.65	12.69	12.55	0.08	0.18	0.10	0.61	12.3	12.42	12.38	12.35	0.04	0.06	0.17	0.40	
<i>R. albus</i> , % <sup>4</sup>	0.34	0.77	0.98	1.41	0.34	0.33	0.17	0.04	0.11	0.27	0.23	0.21	0.07	0.15	0.26	0.37	
<i>R. flavefaciens</i> , %	0.43	0.50	0.39	0.42	0.18	0.79	0.88	0.99	0.23	0.13	0.27	0.32	0.06	0.31	0.70	0.38	
<i>F. succinogenes</i> , %	1.10	0.90	1.02	1.15	0.18	0.46	0.76	0.86	0.72	0.88	0.74	0.70	0.15	0.47	0.94	0.89	
<i>S. bovis</i> , %	0.002	0.001	0.002	0.001	0.0009	0.56	0.84	0.56	0.0008	0.0007	0.0002	0.0003	0.0003	0.93	0.27	0.33	
<i>Lactobacillus spp.</i> , %	0.12	0.23	0.19	0.17	0.06	0.13	0.28	0.50	0.028	0.032	0.046	0.034	0.01	0.79	0.25	0.67	
<i>Prevotella spp.</i> , %	43.95	51.08	47.74	49.73	4.33	0.14	0.40	0.22	37.36	34.69	43.15	41.24	3.64	0.60	0.28	0.45	
<i>M. elsdenii</i> , %	0.47	0.93	0.38	1.46	0.50	0.53	0.91	0.21	0.26	0.11	0.52	0.21	0.18	0.57	0.33	0.87	
Archaea, %	1.05	0.64	0.71	0.78	0.15	0.03	0.06	0.10	0.82	0.82	0.65	0.67	0.12	0.99	0.28	0.36	
<i>Rumen protozoa, 10<sup>4</sup> / mL of rumen fluid</i>																	
Protozoa <sup>5</sup>	7.69	0.43	6.60	0.84	4.96	0.23	0.85	0.25	20.51	25.75	21.06	21.32	2.6	0.17	0.88	0.82	

<sup>1</sup> DFMs: direct-fed microbials.

<sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control cows (C).

<sup>3</sup> Amylase, cellulase and xylanase activities were determined with starch, cellulose and hemicellulose, respectively.

<sup>4</sup> Bacteria species and *Archaea* expressed as proportion of total bacteria

<sup>5</sup> Protozoa: sum of small (< 100 μm) and big (> 100 μm) *Entodinium*, *Isotricha* and *Dasytricha*.

**Table 6:** Effects of DFMs supplementation on intake and milk production and composition in dairy cows fed two different acidotic diets

	High Starch Diet (HSD)									Low Starch Diet (LSD)							
	C	DFMs <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup> (DFM vs. C)			C	DFMs			SEM	P-value (DFMs vs. C)			
		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P					
Intake, kg / d																	
DM	18.53	19.19	18.29	19.6	0.99	0.59	0.84	0.38	18.81	18.02	18.58	18.31	1.25	0.46	0.83	0.62	
OM	17.30	17.93	17.06	18.32	1.00	0.59	0.83	0.38	16.10	15.41	15.86	15.64	1.07	0.45	0.79	0.60	
ADF	3.77	3.92	3.69	3.97	0.21	0.55	0.77	0.43	4.84	4.62	4.77	4.70	0.33	0.44	0.82	0.61	
NDF	6.26	6.51	6.14	6.61	0.35	0.56	0.78	0.42	6.55	6.26	6.46	6.37	0.44	0.44	0.81	0.62	
Hemicellulose	2.49	2.59	2.45	2.63	0.14	0.57	0.79	0.41	1.711	1.64	1.68	1.67	0.11	0.45	0.79	0.64	
Starch intake	7.14	7.30	7.25	7.68	0.35	0.67	0.77	0.18	0.32	0.25	0.30	0.29	0.05	0.34	0.73	0.59	
GE intake, MJ/d	295	306	291	312	16.26	0.58	0.81	0.39	300	287	296	292	20.30	0.45	0.80	0.61	
Milk production, kg / d																	
Milk yield	25.03	25.66	24.20	26.36	1.71	0.67	0.58	0.37	23.63	22.64	22.66	23.15	1.38	0.18	0.19	0.47	
4% FCM <sup>3</sup>	24.42	24.10	23.66	25.37	2.17	0.86	0.68	0.59	22.58	23.58	22.71	23.39	1.61	0.41	0.91	0.49	
Milk composition, g / kg																	
Fat yield	38.24	37.70	36.47	37.41	3.44	0.91	0.73	0.87	37.20	43.6	39.97	40.62	2.85	0.16	0.52	0.43	
Protein yield	31.39	31.69	31.64	29.24	1.27	0.86	0.88	0.24	27.35	29.26	29.42	28.82	1.43	0.38	0.34	0.49	
Lactose yield	51.60	52.01	51.42	51.81	0.76	0.6	0.82	0.78	51.74	51.8	52.17	52.71	0.58	0.93	0.53	0.18	
SCC <sup>4</sup> x 10 <sup>3</sup> / mL	317	605	142	57	255	0.42	0.62	0.46	183	85	397	47	163	0.68	0.39	0.58	

<sup>1</sup> DFMs: direct-fed microbials.

<sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control cows (C).

<sup>3</sup> FCM = Fact corrected Milk

<sup>4</sup>SCC = Somatic Cell Count

**Table 7 :** Effects of DFMs supplementation on total tract digestibility of DM, OM, fibers and starch in dairy cows fed two different acidotic diets

	High Starch Diet (HSD)								Low Starch Diet (LSD)							
	C	DFMs <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup> (DFM vs. C)			C	DFMs			SEM	P-value (DFMs vs. C)		
		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P				
DM, %	69.79	70.91	69.31	69.86	0.71	0.28	0.63	0.93	67.48	67.86	69.94	68.30	0.93	0.70	0.04	0.40
OM, %	72.208	73.28	71.81	72.18	0.72	0.26	0.67	0.99	72.20	72.4	74.35	72.88	0.71	0.77	0.02	0.34
ADF, %	46.34	47.94	46.58	44.15	2.39	0.65	0.94	0.54	48.45	51.43	49.1	54.45	3.40	0.38	0.84	0.01
NDF, %	43.81	47.46	42.79	41.76	1.76	0.19	0.70	0.44	46.08	46.94	48.79	50.39	2.19	0.60	0.11	0.02
Hemicellulose, %	40.01	46.72	37.04	38.14	2.29	0.08	0.40	0.59	39.22	33.61	48.53	38.96	2.99	0.23	0.07	0.95
Starch, %	98.18	98.01	98.35	98.32	0.39	0.62	0.62	0.69	100	88.45	84.45	86.41	21.10	0.20	0.17	0.18

<sup>1</sup> DFMs: direct-fed microbials.

<sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control cows (C).

**Table 8 :** Effects of DFMs supplementation on methane emissions in dairy cows fed two different acidotic diets.

	High Starch Diet (HSD)									Low Starch Diet (LSD)							
	C	DFMs <sup>1</sup>			SEM	P-value <sup>2</sup> (DFMs vs. C)			C	DFMs			SEM	P-value (DFMs vs. C)			
		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P		P	Lp + P	Lr + P					
CH <sub>4</sub> , g/d	206.64	227.36	157.60	236.26	37.05	0.61	0.25	0.46	315.27	302.08	301.54	236.28	22.17	0.57	0.56	0.01	
CH <sub>4</sub> , g/kg DMI	11.05	11.99	8.69	12.15	1.63	0.60	0.21	0.53	17.03	17.13	16.05	13.04	1.21	0.95	0.51	0.03	
CH <sub>4</sub> , g/kg OM intake	11.83	12.84	9.32	13.00	1.75	0.60	0.22	0.53	19.91	20.04	18.80	15.26	1.42	0.94	0.52	0.03	
CH <sub>4</sub> , g/kg NDF intake	32.69	35.56	25.90	36.09	4.83	0.59	0.23	0.51	48.95	49.32	46.19	37.55	3.47	0.93	0.51	0.03	
CH <sub>4</sub> , g/kg ADF intake	54.36	59.19	43.13	60.06	7.80	0.59	0.23	0.51	66.31	66.83	62.57	51.07	4.65	0.93	0.51	0.03	
CH <sub>4</sub> , g/kg of digested DM	16.76	17.68	13.14	18.36	2.44	0.72	0.19	0.53	26.90	26.60	24.27	20.36	2.04	0.90	0.30	0.03	
CH <sub>4</sub> , g/kg of digested OM	16.40	17.54	12.99	18.04	2.40	0.66	0.21	0.51	27.73	27.66	25.34	21.10	2.03	0.98	0.34	0.03	
CH <sub>4</sub> , g/kg of digested NDF	75.36	76.77	61.47	89.30	11.41	0.91	0.31	0.30	109.96	103.65	96.92	76.60	9.38	0.48	0.17	0.01	
CH <sub>4</sub> , g/kg of digested ADF	117.91	128.59	95.47	143.04	19.39	0.66	0.36	0.30	141.73	129.04	131.20	96.28	11.68	0.19	0.26	0.001	
CH <sub>4</sub> , g/kg of milk	8.26	8.75	6.49	9.04	1.10	0.69	0.19	0.52	13.61	13.63	13.24	10.26	1.16	0.98	0.69	0.01	
CH <sub>4</sub> , g/kg of 4% FCM <sup>3</sup>	8.45	9.35	6.75	9.53	1.19	0.59	0.33	0.52	14.20	13.00	13.44	10.13	1.23	0.21	0.41	0.003	
CH <sub>4</sub> , % of GE intake	4.14	4.49	3.27	4.55	0.61	0.60	0.22	0.53	6.37	6.42	6.01	4.89	0.45	0.93	0.52	0.03	

<sup>1</sup> DFMs: direct-fed microbials.

<sup>2</sup> Effect of each DFM vs. control cows (C).

<sup>3</sup> FCM = Fat corrected milk

## DISCUSSION GENERALE



En situation d'acidose ruminale, la diminution du pH s'accompagne d'une modification de la structure de l'écosystème se traduisant par une réorientation des fermentations ruminales vers le propionate et/ou le butyrate au dépend de l'acétate pour l'acidose latente et vers le lactate pour l'acidose lactique. Cette instabilité dans les fermentations pourrait être responsable des effets variables voire contradictoires des probiotiques utilisés pour prévenir cette pathologie. **Notre hypothèse est que l'efficacité des probiotiques est conditionnée par les orientations fermentaires ruminales.** Pour tester cette hypothèse nous avons développé un modèle expérimental d'induction des acidoses latente et lactique qui a permis d'associer aux dérives fermentaires une modification de la structure de l'écosystème microbien. Par la suite, l'effet modulateur (sur les microbes et les fermentations) des bactéries probiotiques a été étudié pour évaluer leur efficacité à prévenir l'acidose chez le mouton non productif et le bovin laitier en production. Nos travaux ont donné lieu à des résultats originaux qui seront discutés dans la suite du manuscrit.

## 1. Développement et validation du modèle d'acidose latente chez le mouton non productif

### 1.1. Un modèle reproductible

Parce qu'il est difficile de maîtriser des orientations fermentaires en condition d'alimentation conventionnelle, nous avons décidé de provoquer des états d'acidose par des **challenges acidogènes**. Ce procédé consiste à introduire, directement dans le rumen et sans transition alimentaire, des quantités importantes de GRF (**1,2% du PV**) se différenciant par la nature et la vitesse de dégradation de leurs glucides afin d'induire rapidement un état d'acidose se caractérisant par des pH différents et des fermentations contrastées.

#### → Développement du modèle : **Article 1**

L'expérimentation 1, qui a permis le développement du modèle d'induction de l'acidose, a été réalisée en carré Latin 3 x 3 sur 3 moutons mâles castrés munis d'une canule du rumen. Après une phase d'adaptation de 11 jours sur un régime non acidogène (80% foin + 20% blé), **l'acidose a été induite par une succession de challenges acidogènes (3 jours consécutifs) par l'introduction directe et massive dans le rumen de blé (amidon rapide), maïs (amidon lent) ou pulpe de betterave (fibres rapides) broyés (3 mm) afin d'augmenter leur pouvoir acidogène, afin d'orienter les fermentations ruminales vers le lactate, le propionate et le butyrate, respectivement.** Le statut acidotique des animaux a été évalué sur la base du pH et des fermentations ruminales. Si l'acidose lactique est clairement définie par un pH bas (pH < 5) du fait de la production de lactate (aux

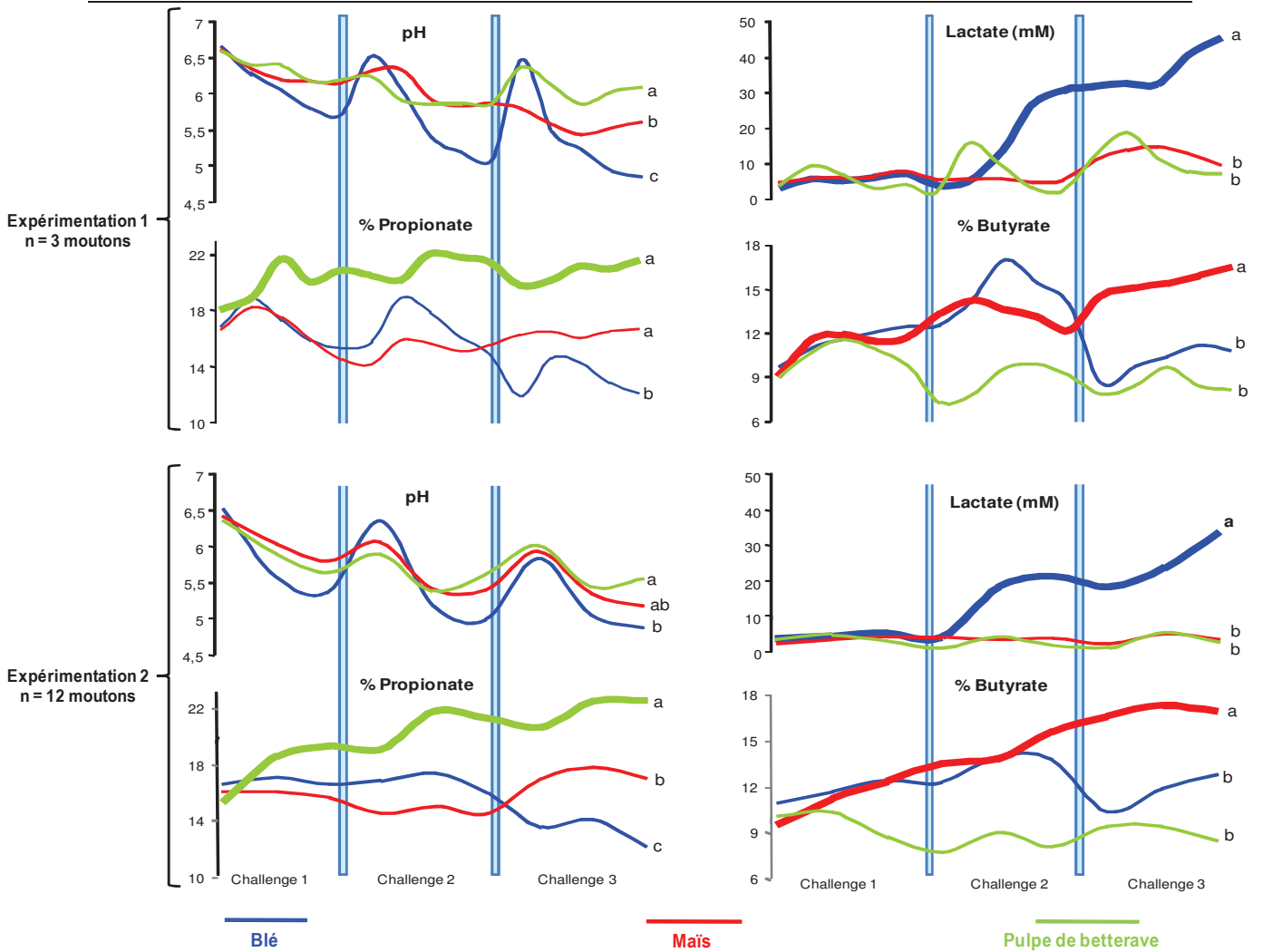


Figure 21. Validation du modèle d'induction de l'acidose chez le mouton à l'entretien sur la base des paramètres fermentaires.

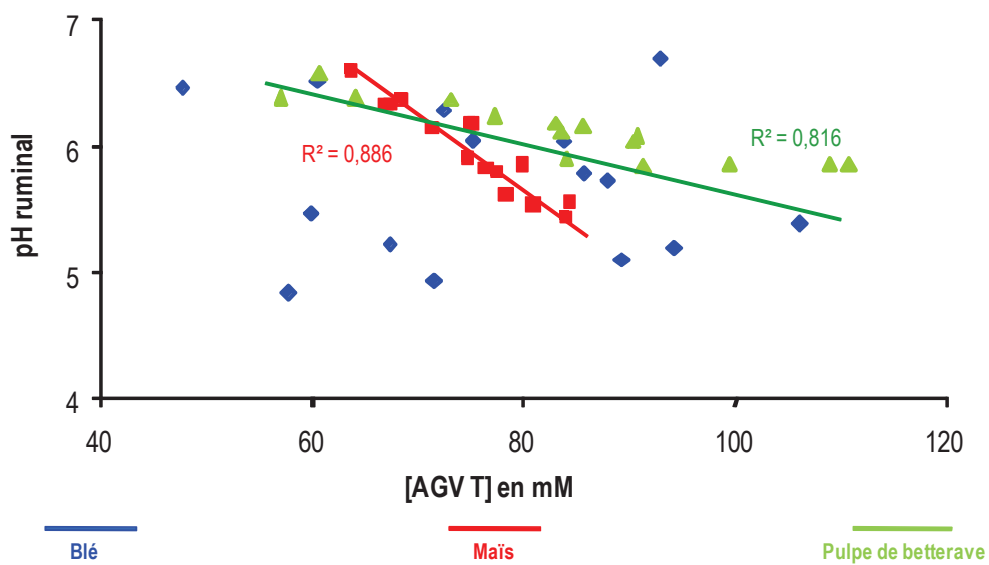


Figure 22. Relation entre pH ruminal et [AGV] sur les 3 challenges (Expérimentation 1, n = 3 moutons). Chaque point représente un temps de prélèvement (moyenne de 3 animaux des 3 périodes du carré Latin).



dépens des AGV), il n'y a actuellement pas de consensus sur la définition (du point de vue pH) de l'acidose latente et encore moins sur la valeur de pH seuil à partir de laquelle la santé et/ou les productions animales sont affectées (Plaizier *et al.*, 2008). Parce qu'aucune des définitions proposées n'est « plus juste » que les autres et que la durée pendant laquelle le pH est inférieur à 6 est fortement corrélée au pH moyen (Dragomir *et al.*, 2008 ; Sauvant *et al.*, 1999), nous avons choisi la définition de Sauvant *et al.* (1999), **qui ont proposé un pH moyen de 6,25 (équivalent à 4 h sous pH = 6) comme seuil de détermination de l'acidose latente (Savant *et al.*, 1999)**. Cette expérimentation a permis d'induire 3 états d'acidose se caractérisant par des pH et des fermentations contrastées et stables (Figure 21):

Acidose lactique avec le blé : pH = 4,85 ; [lactate] = 36,38 mM.

Acidose latente butyrique avec le maïs : pH = 5,58 ; butyrate = 15,3 mol/100 mol AGV totaux

Acidose latente propionique avec la pulpe de betterave : pH = 6,09 ; Propionate = 20,1 mol/100 mol AGV totaux

#### → Validation du modèle : Article 2

Au cours de l'expérimentation 2, douze (12) moutons ont été répartis en 3 lots avec lesquels l'acidose lactique et les acidoses latentes propionique et butyrique ont été induites dans les conditions de l'expérimentation 1, à l'exception de la phase d'adaptation qui a duré 3 semaines. Nous avons profité de cet essai pour valider notre modèle d'acidose en utilisant les données de pH et de paramètres fermentaires provenant des animaux témoins (non supplémentés en bactéries probiotiques) de chacun des lots. **Les paramètres fermentaires comprenant le pH, les proportions de propionate et butyrate dans les AGV totaux, ainsi que les concentrations en lactate provenant des cinétiques réalisées pour les deux expérimentations ont été comparés et les résultats montrent des profils fermentaires très similaires** (Figure 21). Comme il est communément admis, nos résultats confirment que la chute du pH lors de l'acidose lactique (aigue) est due à l'accumulation du lactate tandis que l'augmentation de la concentration en AGV totaux est responsable des acidoses latentes propionique et butyrique (Figure 22).

#### 1.2. Résistance et résilience de l'écosystème ruminal

Si on utilise le pH ruminal comme « **indicateur de l'état de santé de l'écosystème ruminal** », on constate qu'il possède une très bonne **résistance**<sup>22</sup> et **résilience**<sup>23</sup> face aux perturbations

<sup>22</sup> Résistance : inertie d'un écosystème à une perturbation importante.

<sup>23</sup> Résilience : capacité d'un écosystème à retrouver un fonctionnement et un développement normal après avoir subi une perturbation importante. C'est un très bon indicateur de la santé et de l'intégrité d'un écosystème.

nutritionnelles, ce qui est en accord avec l'essai de Silberberg *et al.* (2008) au cours duquel des moutons ont été soumis à une succession de 3 stress acidogènes de 5 jours chacun (40% foin + 60% blé pendant) séparés d'une période de repos de 21 jours (80% foin + 20% blé). Dans notre essai, en plus du type de GRF utilisé, le nombre de challenges consécutifs s'est révélé déterminant dans le développement du modèle, puisque **la discrimination (pH et orientations fermentaires) entre les 3 GRF n'a été possible que lors du 3<sup>e</sup> challenge**. La résilience observée aux challenges 1 et 2 s'expliquerait par la richesse et l'adaptabilité du microbiote ruminal aux conditions hostiles (ici pH et/ou disparition du substrat) qui font que la disparition d'une espèce suite à l'induction de l'acidose est « rapidement » compensée par une autre plus résistante et pouvant occuper la même niche écologique. Au 3<sup>e</sup> challenge, les conditions deviennent trop drastiques et entraînent un déséquilibre trop important (disparition d'espèces clés) ne pouvant pas être contrebalancé, d'où l'augmentation de l'amplitude de la baisse du pH et l'allongement du temps nécessaire au retour à un état proche de l'état initial.

### 1.3. Modes d'induction de l'acidose et orientations fermentaires

L'élément surprenant de ces deux expérimentations réalisées sur ovins a été le fait que les profils d'AGV obtenus avec le maïs (butyrique) et la pulpe de betterave (propionique) diffèrent de ceux initialement attendus. En effet, en conditions d'alimentations conventionnelles chez la vache laitière, l'utilisation du maïs et généralement de rations riches en amidon oriente le plus souvent les fermentations vers le propionate (**Article 3** ; Goad *et al.*, 1998 ; Khafipour *et al.*, 2009b) alors que l'utilisation de la pulpe de betterave induit le plus souvent une augmentation du butyrate (**Article 3** ; O'Mara *et al.*, 1997 ; Voelker et Allen, 2003). En l'absence d'études ayant comparé l'effet du régime et du mode d'induction de l'acidose sur les fermentations ruminales, ces résultats suggèrent que outre un effet lié au type d'animal, **une modification des voies fermentaires microbiennes lorsque l'acidose est provoquée par un challenge intraruminal**.

Nos résultats suggèrent qu'en conditions extrêmes (challenges), les orientations fermentaires ne sont pas prévisibles même si elles sont répétables au sein d'une même espèce animale. Sur la base des paramètres fermentaires, nous pouvons considérer notre modèle d'induction de l'acidose sur ovins comme valide et reproductible. Sur la base de ce modèle, nous avons cherché i) à caractériser les modifications qui s'opèrent dans l'écosystème microbien suite à l'induction de chaque type d'acidose afin de les associer aux dérives fermentaires puis ii) à évaluer l'efficacité et le mode d'action des bactéries probiotiques pour prévenir les différents types d'acidose ruminale latente.

## 2. Relation entre profils fermentaires et dynamique du microbiote ruminal chez le ruminant en situation d'acidose

### → Chez le mouton non productif : Communications 3 et 4

De même que pour les paramètres fermentaires, la structure et l'activité du microbiote ruminal ont été étudiés pour chacune des acidoses développées chez le mouton non productif. Cette démarche originale avait pour but d'établir une relation entre la composition du microbiote ruminal et les profils fermentaires en quantifiant les changements dans la densité et l'activité des principales espèces bactériennes ruminales et les protozoaires suite à l'induction de l'acidose. Afin de relier la dynamique (composition et activité) du microbiote ruminal aux profils fermentaires, nous avons quantifié par qPCR les bactéries et *Archaea* méthanogènes dont le métabolisme fermentaire est connu (Figure 23) :

- ◆ Bactéries cellulolytiques : *R. albus*, *R. flavefaciens*, *F. succinogenes*
- ◆ Bactéries amylolytiques et/ou productrices de lactate : *S. bovis* et *Lactobacillus* spp.
- ◆ Bactérie utilisatrice de lactate : *M. elsdenii*
- ◆ Bactéries productrices de succinate : *Prevotella* spp.
- ◆ *Archaea* méthanogènes

Pour cette partie et les autres à venir, nous avons choisi d'exprimer le nombre de chaque espèce bactérienne en % des bactéries totales car ce mode d'expression permet de suivre la dynamique de chaque espèce au sein de la communauté bactérienne totale. Chez le mouton non productif, la mise en évidence des modifications au sein de chaque forme d'acidose sera basée sur la comparaison des paramètres fermentaires et microbiens entre l'état d'acidose avérée (fin du challenge 3) et l'état initial (avant l'induction du challenge 1).

### 2.1. Acidose lactique

Le développement de l'acidose lactique s'est accompagné d'une **augmentation de la concentration des bactéries totales (× 3) et des lactobacilles (× 430)**, et une **diminution de la proportion de la bactérie cellulolytique *R. albus***, tandis que le nombre de protozoaires demeurait stable. Parallèlement, **l'activité amylase a augmenté (× 15) et l'activité xylanase fortement diminuée (/11)**. Ces effets sont logiques car ils expliquent l'accumulation du lactate ruminal et le développement d'une acidose sévère (pH = 4,87) de type lactique. Aucun changement n'a été observé dans la proportion de *S. bovis* ; c'est sans doute dû au fait que la quantification des bactéries a été faite

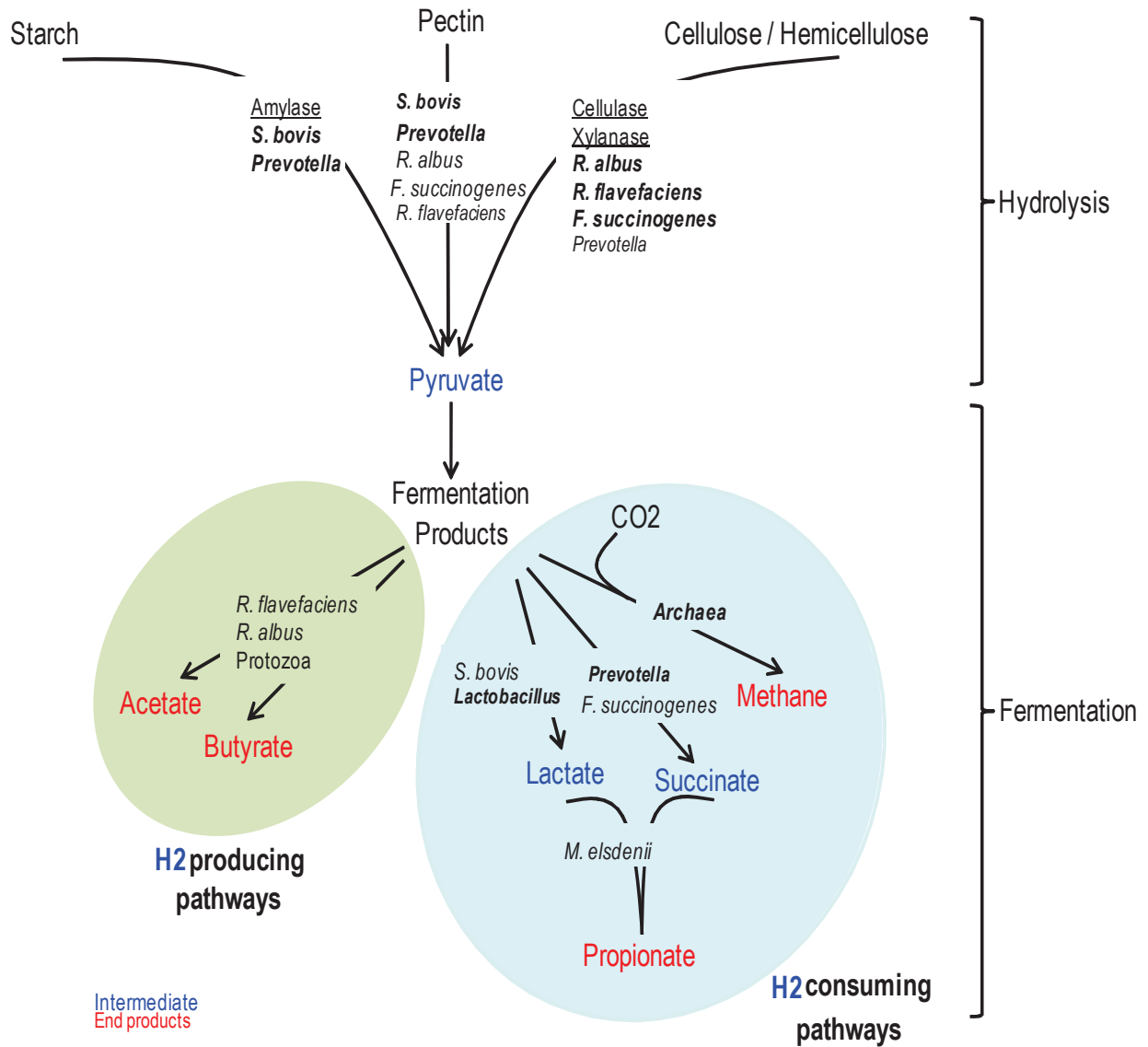


Figure 23. Schéma simplifié des voies de dégradation et de fermentation des glucides par les microorganismes du rumen.

Commentaire : Les bactéries majeures impliquées dans les voies d'hydrolyse et/ou de fermentation sont en gras. Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des polymères végétaux sont soulignées.

en fin de challenge moment où sa proportion décline, car il est rapporté que *S. bovis* intervient plutôt dans la phase d'initiation du processus puis son nombre diminue pour laisser place aux lactobacilles plus résistants aux conditions acides (Martin *et al.*, 2006 ; Nagaraja et Titgemeyer, 2007). L'augmentation des bactéries totales observée ici contredit l'idée généralement admise que l'acidose lactique diminue le nombre de bactéries (Dawson *et al.*, 1997 ; Dunlop, 1972 ; Slyter, 1976 ; cités par Martin *et al.*, 2006). **Malgré le caractère prévisible de ces données sur les flores amylolytique et cellulolytiques, nos résultats sont les premiers à relier quantitativement au sein d'une même étude le profil fermentaire du rumen à la structure et l'activité du microbiote ruminal.**

### 2.2. Acidose latente propionique

L'acidose latente a un impact négatif sur les activités fibrolytiques et par conséquent sur la digestion des fibres (Brossard *et al.*, 2006 ; Krajcarski-Hunt *et al.*, 2002 ; Martin *et al.*, 2001 ; Plaizier *et al.*, 2008). Par contre, son effet sur les bactéries cellulolytiques est variable, et multifactoriel incluant les effets du pH ruminal et des substrats disponibles, d'autant que les capacités d'adaptation des différentes espèces et les phénomènes d'interactions microbiennes sont exacerbés lors de situations nutritionnelles défavorables. Lors de cet essai, **l'acidose latente propionique a diminué le nombre et l'activité de la communauté cellulolytique ce qui explique la diminution observée de la proportion d'acétate dans les AGV totaux (- 4,6 mol/100 mol)**. L'activité amylase n'a pas été affectée lors de cette situation car l'expression de cette enzyme est induite par la présence d'amidon (Nozière et Michalet-Doreau, 1997). En revanche, du fait de l'utilisation de la pulpe de betterave riche en pectine pour induire cette acidose, le dosage de l'activité pectinase aurait été plus judicieux. La population de protozoaires n'a pas été diminuée de manière significative (1,5 fois ;  $P > 0,15$ ). Cette tendance à la baisse est néanmoins cohérente avec notre revue bibliographique qui a confirmé l'effet toxique du propionate lorsqu'il est associé à un pH acide (pH = 5,55) comme précédemment suggéré par Fonty *et al.* (1995). **Par contre, la population des *Prevotella* a doublé** et représentait la moitié de la flore bactérienne (de 25 à 49% de la communauté bactérienne totale). **En produisant d'avantage de succinate** (Chiquette *et al.*, 2008), **les *Prevotella* ont stimulé la propionogenèse via la voie du succinate**. Bien que nous l'ayons pas quantifiée lors de nos essais, *S. ruminantium* pourrait être impliquée dans la métabolisation du succinate en propionate.

### 2.3. Acidose latente butyrique

**Les populations des 3 bactéries cellulolytiques *F. succinogenes*, *R. albus* et *R. flavefaciens* ont été divisées par 3 en moyenne.** De même, **les activités cellulase et xylanase ont été fortement réduites (22 et 256 fois, respectivement) par le développement de l'acidose latente butyrique.**

	Acidose lactique	Acidose latente propionique		Acidose latente Butyrique	
<b>Modèle animal</b>	Mouton	Mouton	Vache	Mouton	Vache
<b>Régime</b>	blé broyé (3 mm)	pulpe de betterave broyée (3 mm)	Ensilage maïs + concentré à base d'amidon	Maïs broyé (3mm)	Ensilage herbe + concentré à base parris
<b>Ration Fourrage:GRF</b>	40:60	40:60	55:45	40:60	55:45
<b>Mode d'induction acidose</b>	challenge intra-ruminal	Challenge intra-ruminal	Alimentation conventionnelle	challenge intra-ruminal	Alimentation conventionnelle
<b>pH moyen</b>	5,25	5,67	5,73	5,49	5,94
<b>pH minimum</b>	4,87	5,55	5,34	5,17	5,73
<b>AGVT, mM</b>	106	115	141,4	108	144,2
<b>% Acétate</b>	71,3	66,4	56,6	61,5	62,0
<b>% Propionate</b>	14,1	22,5	26,0	17,9	18,0
<b>% Butyrate</b>	11,8	9,46	12,2	17,3	15,1
<b>% AGV mineurs</b>	2,75	1,71	5,16	3,30	4,91
<b>NH<sub>3</sub>-N, mM</b>	5,90	0,48	16,1	1,10	11,0
<b>Lactate, mM</b>	23,5	5,36	3,68	5,13	1,96
<b>Bactéries totales, × 10<sup>12</sup> / g MS</b>	5,52	3,29	3,09	3,54	2,00
<b>% <i>R. albus</i></b>	0,025	0,009	0,34	0,007	0,11
<b>% <i>R. flavefaciens</i></b>	0,04	0,02	0,43	0,02	0,23
<b>% <i>F. succinogenes</i></b>	1,98	1,22	1,10	0,82	0,72
<b>% <i>S. bovis</i></b>	0,08	0,01	0,002	0,49	0,0008
<b>% <i>Lactobacillus</i> spp.</b>	1,74	0,09	0,12	0,15	0,028
<b>% <i>Prevotella</i> spp.</b>	29,6	49,38	43,95	29,03	37,36
<b>% <i>M. elsdenii</i></b>	ND <sup>1</sup>	ND	0,47	ND	0,26
<b>Somme bactéries, %</b>	33,46	50,73	46,41	30,52	38,71
<b>Archaea méthanogène, %</b>	NQ <sup>2</sup>	NQ	1,05	NQ	0,82
<b>Protozoaires, × 10<sup>5</sup> / mL</b>	2,95	1,54	0,77	2,22	2,05
<b>Amylase<sup>3</sup></b>	15,3	0,29	28,8	7,06	0,56
<b>Celulase</b>	0,43	0,36	0,40	0,05	1,06
<b>Xylanase</b>	0,47	0,53	14,94	0,03	9,18

<sup>1</sup>ND = non détecté, <sup>2</sup>NQ = Non quantifié, <sup>3</sup> les activités enzymatiques sont exprimées en µmol /mg protéine / heure. Les différentes espèces bactériennes quantifiées sont exprimées en % des bactéries totales.

**Tableau 17. Paramètres fermentaires et microbiens du rumen 3h post-repas ou post- challenge chez les animaux en situation d'acidose (moutons non productifs et vaches laitières) et non supplémentés en bactéries probiotiques (Expérimentations 2, (n=12) et 3 (n=8)).**

En même temps, **l'activité amylase et la population de *S. bovis* ont été augmentées** ( $\times 10$  et  $\times 49$ , respectivement). Malgré la prolifération de la bactérie productrice de lactate *S. bovis*, la concentration en lactate était faible ( $< 5$  mM), ce qui serait dû à une faible production (faible activité de *S. bovis*) ou alors à son utilisation par *M. elsdenii*, principale utilisatrice ( $> 70\%$  du lactate ruminal) pour produire du butyrate (Counotte *et al.*, 1981 ; Klieve *et al.*, 2003 ; Kung et Hession, 1995). D'autre part, les protozoaires pourraient également être impliqués dans cette orientation comme cela a déjà été rapporté (Brossard *et al.*, 2004 ; Eugène *et al.*, 2004 ; Williams, 1997). Au cours de cet essai, le niveau de *M. elsdenii* était en dessous du seuil de détection de la qPCR ( $10^4$  cellules / mL jus de rumen ; Ouwerkerk *et al.*, 2002) et la population des protozoaires n'a pas été significativement affectée ( $\times 1,35$  fois ;  $P > 0,2$ ). **Nos résultats ne nous permettent pas d'expliquer l'orientation butyrique par des changements microbiens caractéristiques, ce qui** suggère la présence d'autres bactéries responsables cette orientation comme *Butyrivibrio fibrisolvens* par exemple (Fonty et Chaucheyras-Durand, 2007 ; Mrázek *et al.*, 2006).

**L'analyse conjointe des paramètres fermentaires et microbiens (Tableau 17) nous a permis de mettre en évidence les points suivants :**

- ▶ **Acidose lactique : orientation vers le lactate due à la prolifération des lactobacilles et à une importante activité amylase.**
- ▶ **Acidose latente propionique : due à la prolifération des *Prevotella* qui ont stimulé la propionogenèse via la voie du succinate.**
- ▶ **Acidose latente butyrique : orientation vers le butyrate inexplicée par les microorganismes quantifiés. Cependant, la prolifération de *S. bovis* et l'augmentation de l'activité amylase y sont associées.**

#### → **Chez la vache laitière**

Chez la vache laitière, les acidoses latentes ont été induites dans des conditions d'alimentation conventionnelle. L'acidose latente propionique a été provoquée à l'aide d'un régime riche en amidon (ensilage de maïs + céréales) tandis que la forme butyrique a été induite avec une ration riche en parois (ensilage d'herbe + pulpes de betterave et de citrus). Afin de vérifier si l'apparition de ces deux formes d'acidose chez la vache s'accompagnait de modifications similaires à celles observées chez le mouton non productif, nous avons comparé les profils fermentaires et microbiens provenant des animaux témoins des différentes expérimentations (Tableau 17). Même si les profils fermentaires en fonction des substrats sont inversés entre les deux modèles animaux (cf. 1.3), les pH les plus bas ont été obtenus avec les régimes riches en amidon.



Quelle que soit la forme d'acidose latente, on observe que la communauté cellulolytique est plus importante (sauf *F. succinogenes*) chez la vache que chez le mouton du fait de la présence d'une part importante de fibres (37,6% vs. 27,2% NDF) apportées par le fourrage dans la ration de base. De même, les activités enzymatiques observées sont très cohérentes avec le type d'alimentation. Elles se sont manifestées par une stimulation de l'activité amylasique par les régimes amyliacés et une augmentation de l'activité des cellulases et/ou des xylanases avec les régimes riches en parois. Au niveau microbien, la proportion de la bactérie utilisatrice de lactate *M. elsdenii* était supérieure à celles des bactéries amylolytiques et/ou productrices de lactate *Lactobacillus* et *S. bovis* chez la vache laitière. **Le fait que nous ayons réussi à quantifier *M. elsdenii* sur vaches et pas sur moutons suggère que sa croissance requiert le maintien d'un régime acidogène pendant un certain temps, ce qui n'était pas le cas lors des inductions de l'acidose par challenges intra-ruminaux chez le mouton. Enfin, indépendamment du modèle animal on observe que la somme des bactéries quantifiées est plus élevée en situation d'acidose latente propionique ce qui semble être principalement dû à un enrichissement en *Prevotella*.** Ces données confirment nos observations obtenues chez le mouton montrant que l'implication des Prevotelles dans l'orientation propionique des fermentations ruminales.

En ce qui concerne l'acidose butyrique chez la vache laitière, il est difficile d'expliquer, comme chez le mouton, cette orientation des fermentations par un profil microbien particulier. Cependant, **en intra-espèce, la population de protozoaires était 2,7 fois plus importante pour l'acidose latente butyrique chez la vache laitière. Cette différence pourrait expliquer le pH plus élevé observé ici (comparé à l'acidose propionique) et qui serait dû à l'effet tampon des protozoaires (Brossard et al., 2004 ; Martin et al., 2006) et de l'ensilage d'herbe (INRA, 2007).**

**Les profils microbiens entre les deux modèles animaux étaient très similaires pour l'acidose latente propionique (augmentation *Prevotella*) mais difficilement caractérisable pour l'acidose butyrique chez la vache comme chez le mouton ce qui indique que les microbes initialement ciblés (protozoaires, *M. elsdenii*) ne sont pas les plus pertinents pour caractériser cette forme d'acidose latente.**

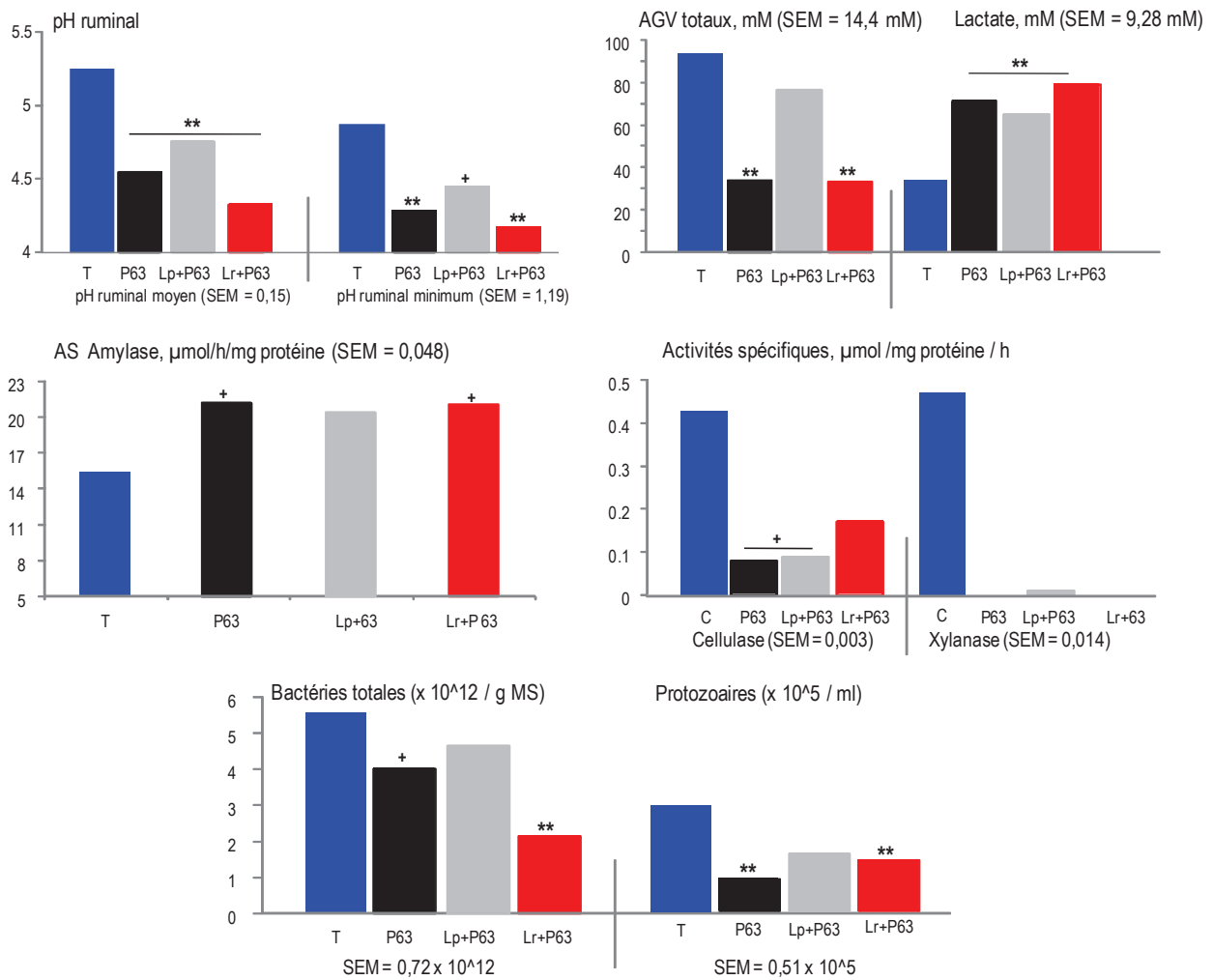


### 3. Modulation du microbiote et des fermentations ruminales par les bactéries probiotiques

Au niveau ruminal, l'hypothèse est que l'apport de bactéries productrices de lactate seules ou en association avec des bactéries utilisatrices permettraient la production d'un niveau de lactate pouvant stimuler la croissance des bactéries utilisatrices. Ce mécanisme s'apparente à un **effet vaccin** permettant à la flore lactitolytique d'être efficace lors de situations nutritionnelles conduisant à l'apparition de l'acidose (Nocek *et al.*, 2002 ; Nocek *et al.*, 2003). Cependant, si cette théorie paraît logique dans des conditions d'acidose lactique, qu'en est-il réellement pour l'acidose latente, situation au cours de laquelle il n'y a pas d'accumulation de lactate ? Il faudrait donc faire évoluer cette théorie comme étant un **moyen d'adaptation du microbiote à des conditions anormalement acides** du fait d'une alimentation riche en GRF entraînant une baisse de pH par une accumulation d'AGV. Notre travail est ciblé sur l'utilisation de la souche *Propionibacterium* P63 seule ou en association avec les bactéries lactiques *Lb. plantarum* 115 (Lp + P63) ou *Lb. rhamnosus* 32 (Lr + P63) afin d'évaluer **l'effet spécifique de bactéries probiotiques sur l'écosystème ruminal du mouton à l'entretien et de la vache laitière en production.**

#### 3.1. L'acidose lactique : situation de déséquilibre extrême

Au cours de l'acidose lactique induite chez le mouton, **la supplémentation en bactéries probiotiques s'est révélée néfaste puisqu'elle a accentué la chute du pH ruminal (Article 2).** Au niveau des fermentations ruminales, cette diminution du pH a été le résultat d'une accumulation du lactate (72 mM en moyenne) aux dépens des AGV qui sont passés en dessous de 35 mM chez les animaux traités avec P63 et Lr + P63 (Figure 24). Nous avons observé que si l'induction de l'acidose a diminué la résilience de l'écosystème ruminal, la supplémentation en bactéries probiotiques a entraîné sa perte (Figure 25). Au niveau microbien, les probiotiques testés ont augmenté l'activité amylase et diminué les activités cellulolytiques (cellulase et xylanase) ainsi que le nombre de bactéries totales et de protozoaires (Figure 24). **L'addition des probiotiques a complètement déséquilibré la communauté bactérienne.** En effet, **les bactéries cellulolytiques (*R. albus* et *F. succinogenes*) et *Prevotella* ont été réduites au profit des lactobacilles qui sont devenus dominants (23% de la flore, en moyenne) et la proportion de *S. bovis* qui a été multipliée par 50 chez les animaux traités avec P63 et Lr + P63 (Figure 26).** Des résultats similaires ont été rapportés chez des moutons supplémentés en levures et soumis à des stress acidogènes successifs (80% foin + 20% blé pendant 21 jours puis 40% foin + 60% blé pendant 5 jours ; Silberberg *et al.*, 2008). L'idée soulevée **lors de ces travaux était qu'en situation de déséquilibre important comme c'est le cas lors de l'acidose**



\*\* pour P < 0,05 ; \* pour P < 0,1 ; + pour P < 0,15

Figure 24. Effets des bactéries probiotiques sur les paramètres fermentaires et microbien du rumen chez le mouton en situation d'acidose lactique (Expérimentation 2, n=4).

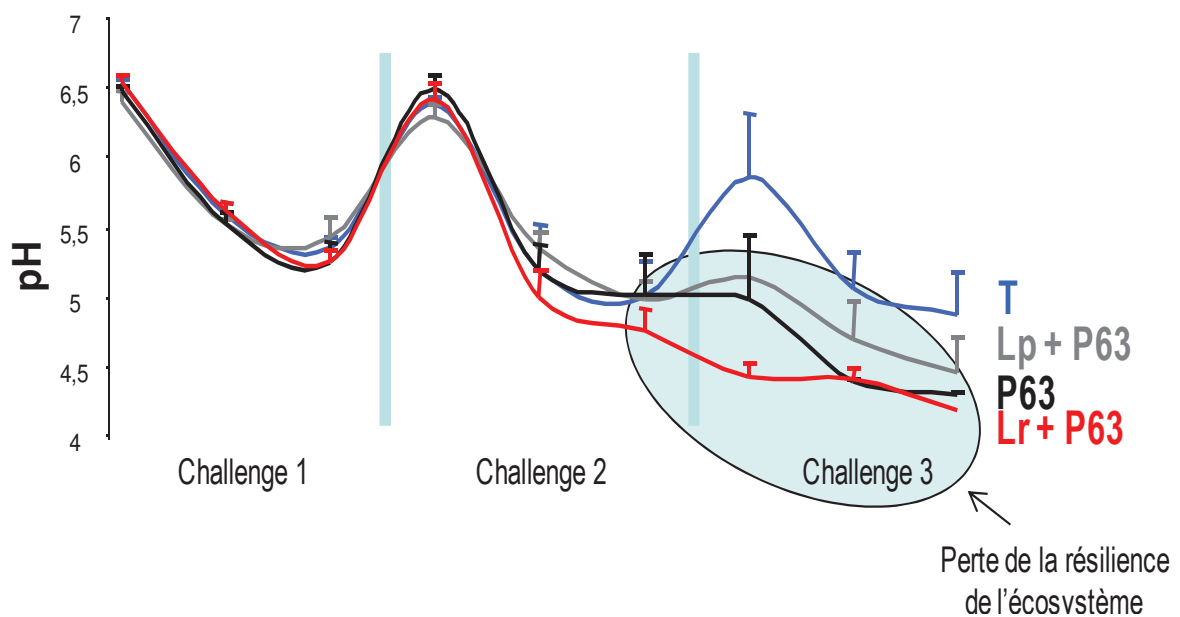
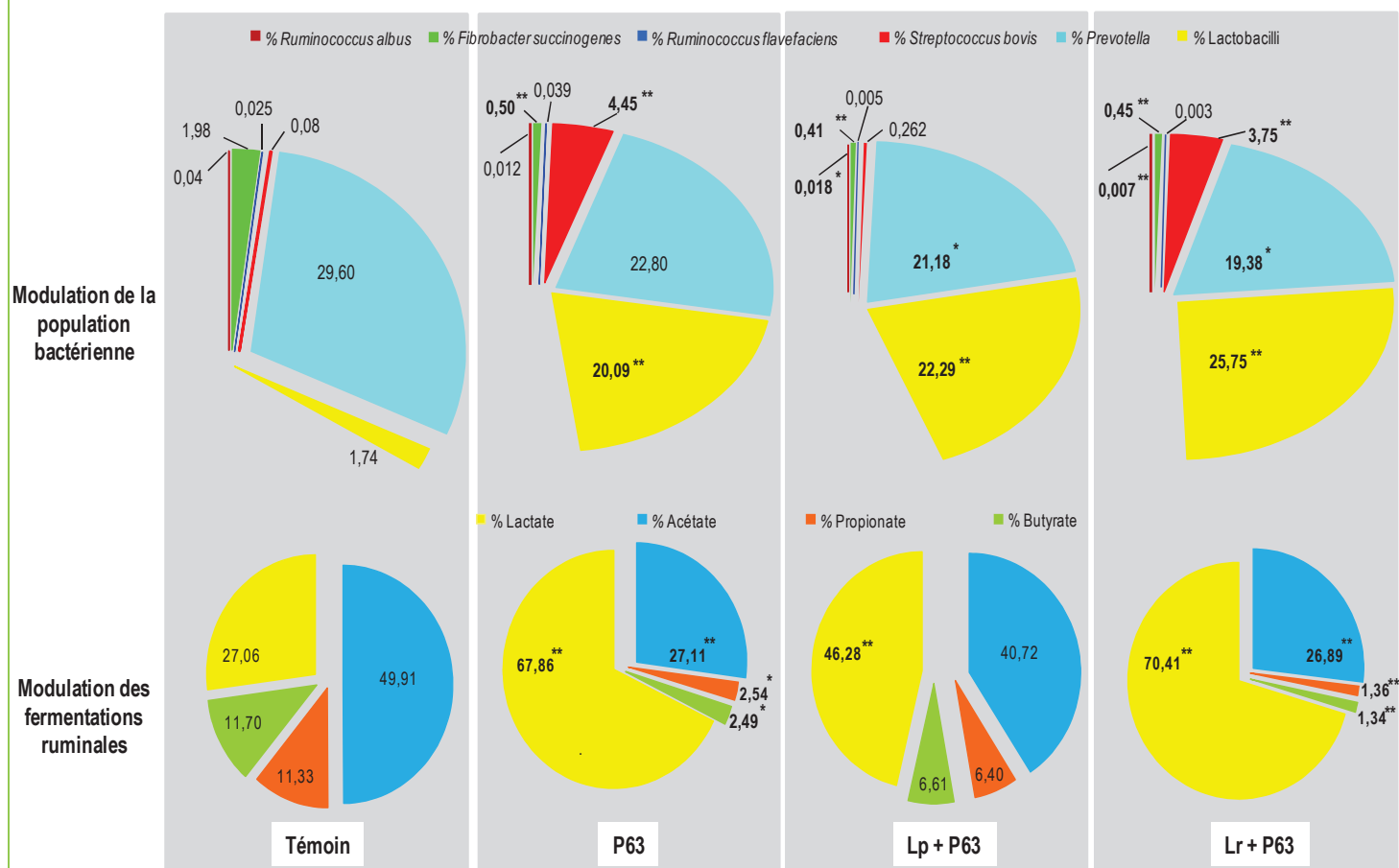


Figure 25. Effets des bactéries probiotiques sur la résilience de l'écosystème ruminal chez le mouton en situation d'acidose lactique (Expérimentation 2, n=4).

**lactique, les probiotiques amplifient la situation via une stimulation de flore indésirable** (apport de vitamines, facteurs de croissance, ...). Comparé aux deux autres probiotiques, **Lp + P63 est celui qui a eu le moins d'effets négatifs sur le pH et les AGV totaux et ceci est lié à une moindre proportion de *S. bovis***. Ces résultats suggèrent que ***S. bovis* constitue un agent aggravant de l'acidose lactique et non l'initiateur comme cela est généralement admis (Nagaraja et Titgemeyer, 2007)**. D'autre part, nous avons observé que la proportion en lactobacilles était similaire entre les animaux traités avec P63 et ceux ayant reçu P63 associée aux 2 souches de lactobacilles. **Ceci suggère que nous avons quantifié les lactobacilles autochtones et que P63 stimulerait leur croissance** (1,7 vs. 23% de lactobacilles en moyenne pour le témoin et les animaux supplémentés, respectivement).

**L'acidose lactique est une situation de déséquilibre extrême pour l'animal que l'on observe de manière accidentelle dans les conditions de la pratique. Nous avons montré que la supplémentation en bactéries probiotiques chez le mouton en situation d'acidose lactique est inefficace en tant que traitement préventif. Pour cette pathologie considérée comme rare et accidentelle, la bonne formulation de la ration reste la meilleure stratégie de prévention. Par ailleurs, l'utilisation de l'acarbose (inhibiteur des alpha-glucosidases) semble être un moyen de prévention efficace.**



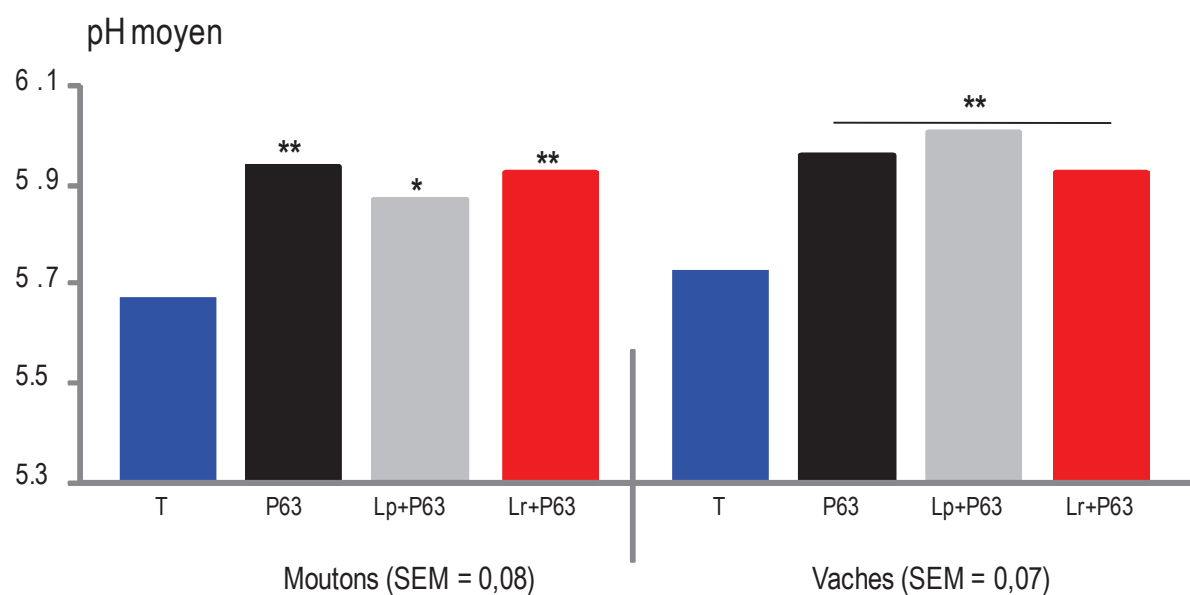
\*\* pour  $P < 0,05$ ; \* pour  $P < 0,1$ ; + pour  $P < 0,15$

Figure 26. Modulation de la communauté bactérienne et des fermentations ruminales par les bactéries probiotiques chez le mouton en situation d'acidose lactique (Expérimentation 2, n=4).

### 3.2. L'acidose latente propionique

#### 3.2.1. Stabilisation du pH ruminal chez le mouton et la vache laitière

Cette forme d'acidose latente est la plus répandue dans la pratique (Lettat *et al.*, 2010). Elle a été induite avec succès chez le mouton non productif et la vache laitière (pH moyens 5,67 et 5,73 respectivement). Avec les deux modèles animaux, les bactéries probiotiques ont amélioré le pH ruminal moyen de + 0,24 unités pH en moyenne (Figure 27).



\*\* pour  $P < 0,05$  ; \* pour  $P < 0,1$  ; + pour  $P < 0,15$

**Figure 27. Effets des bactéries probiotiques sur le pH ruminal chez le mouton à l'entretien et la vache laitière en situation d'acidose latente propionique (Expérimentations 2 (n=4) et 3 (n=4)).**

Chez le mouton (**Article 2**), l'augmentation du pH est difficile à expliquer car la supplémentation en probiotiques n'a eu aucun effet sur les fermentations et le microbiote ruminal à l'exception de la proportion de lactobacilles qui tendait à diminuer chez les moutons supplémentés avec P63 et Lp + P63. Cet effet sur la flore lactique considéré comme bénéfique est toutefois difficile à associer avec l'augmentation du pH ruminal même si des effets similaires ont été observés chez des moutons supplémentés en levures et soumis à des stress acidogènes successifs (80% foin + 20% blé pendant 21 jours puis 40% foin + 60% blé pendant 5 jours ; Silberberg *et al.*, 2008). Chez la vache laitière (**Article 3**), la stabilisation du pH a été accompagnée par une augmentation du propionate aux dépens de l'acétate du butyrate et du lactate. Cependant, la diminution du lactate est à interpréter avec précaution car sa concentration était initialement faible ( $< 4$  mM) et sa diminution après supplémentation en probiotiques n'a donc probablement pas eu d'effet sur le pH. En raisonnant sur la quantité de dihydrogène ( $H_2$ ) présente dans le rumen, il semble exister une relation entre

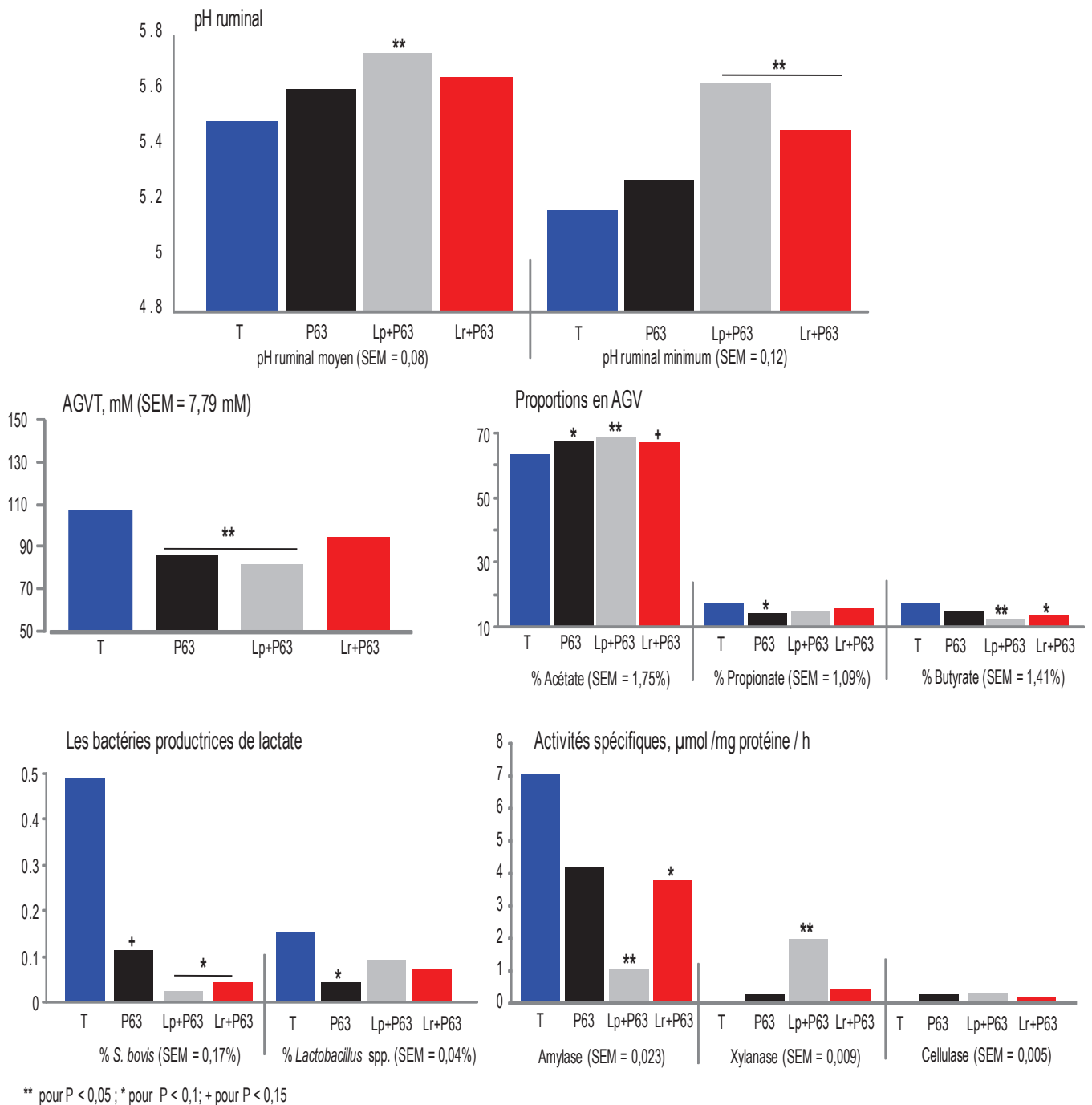


Figure 28. Effets des bactéries probiotiques sur les paramètres fermentaires et microbiens du rumen chez le mouton en situation d'acidose latente butyrique (Expérimentation 2, n=4).

l'augmentation du pH et celle du propionate et/ou de la densité bactérienne observées chez la vache laitière. En effet, **la métabolisation d'une partie du dihydrogène via la propionogenèse et/ou la croissance bactérienne participent à diminuer le pool de H<sub>2</sub> susceptible d'être transformé en H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> par la réaction d'oxydoréduction :  $2 \text{H}_3\text{O}^+ + 2 \text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$  ; entraînant ainsi une élévation du pH ruminal puisque ce dernier est directement lié à la concentration en protons :  $\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+]$ . D'autre part, un **accroissement du pouvoir tampon du jus de rumen est envisageable**, comme cela a été précédemment montré chez la chèvre laitière supplémentée avec *S. cerevisiae* (Giger-Reverdin *et al.*, 2004 ; Sauvant *et al.*, 2006).**

### 3.3. L'acidose latente butyrique

#### 3.3.1. Stabilisation du pH ruminal chez le mouton et la vache laitière

Chez le mouton non productif (**Article 2**), l'acidose latente butyrique a été induite avec succès (pH moyen = 5,49) et l'association de P63 avec les deux souches lactiques a eu des effets positifs sur le pH ruminal (Figure 28). **Le traitement le plus efficace a été l'association Lp + P63** qui a significativement augmenté les pH minimum et moyen **de 0,51 et 0,25 unités pH** que l'on peut associer à une **baisse des AGV totaux (- 25 mM)**. Chez la vache laitière alimentée de manière conventionnelle avec de l'ensilage d'herbe et du concentré à base de pavois (**Article 3**), les probiotiques n'ont pas amélioré le pH ruminal de manière significative. Comparé à l'essai sur moutons, le pH ruminal des vaches laitières en situation d'acidose butyrique était moins acide (pH moyen 5,94 vs. 5,49, respectivement), ce qui confirme les résultats de notre étude quantitative ayant montré que **l'effet des probiotiques sur le pH n'est observable que pour des pH moyens faibles (pH seuil < 5,75) traduisant un environnement modérément perturbé (Figure 29)**. Ces effets bénéfiques sur le pH sont en accord avec l'utilisation des levures seules (Desnoyers *et al.*, 2009 ; revue quantitative incluant des bovins, des ovins et des caprins) ou associées à la bactérie lactique *E. faecium* (Chiquette, 2009) chez la vache laitière. Parallèlement à cela, **la croissance et l'activité de la flore amylolytique et/ou productrice de lactate ont été réduites tandis que l'activité xylanase (dégradation des hémicelluloses) a été augmentée chez le mouton (Article 2)**, ceci expliquerait la **réorientation des fermentations ruminales vers l'acétate aux dépens du propionate et du butyrate**. Si la diminution de l'activité amylase peut être associée à la baisse de *S. bovis*, qui est l'une des principales bactéries amylolytiques, l'augmentation de l'activité xylanase observée avec Lp + P63 est plus difficile à expliquer. Toutefois, une stimulation de cette activité par Lp + P63 est envisageable même si les mécanismes sous-jacents ne sont pour l'instant pas connus.

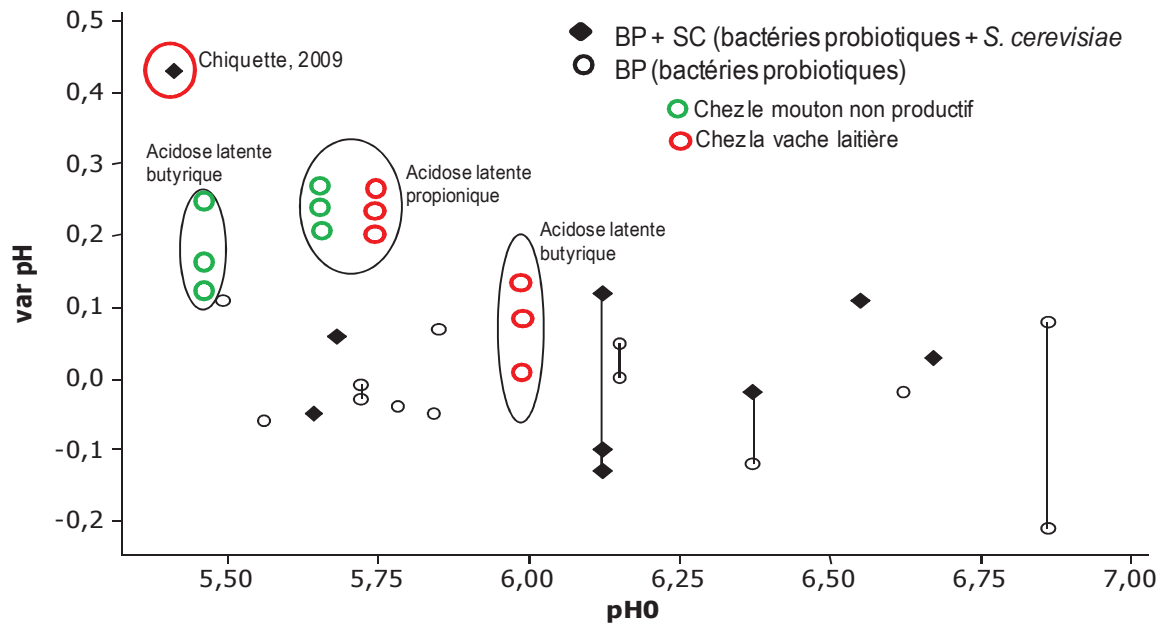


Figure 29. Positionnement de nos résultats sur l'amélioration du pH ruminal par rapport aux données de la littérature (pH0 = pH du témoin non supplémenté en BP, varpH = pH probiotique – pH témoin).

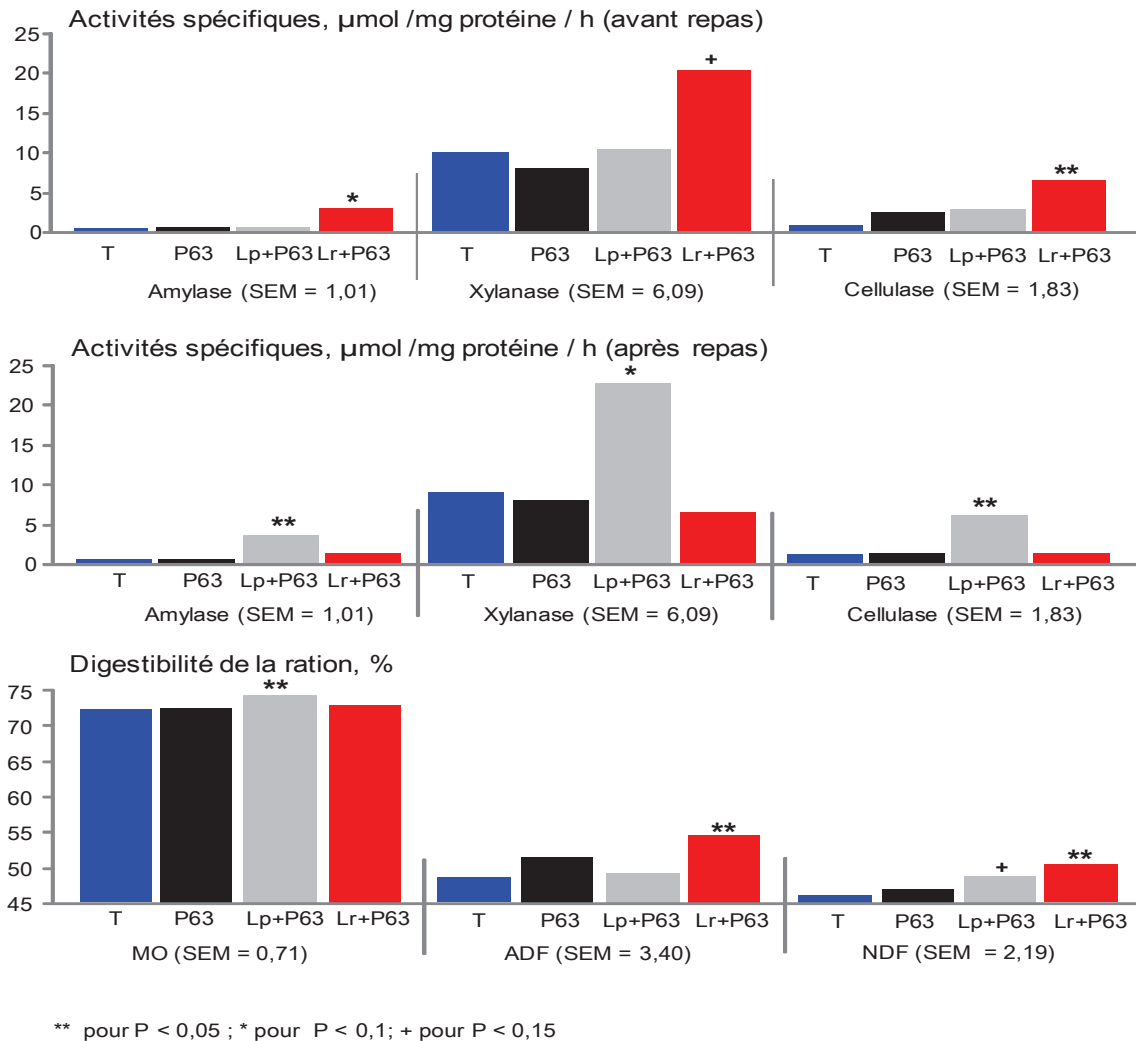


Figure 30. Effets des bactéries probiotiques sur les activités fibrolytiques et la digestibilité de la ration chez la vache laitière en situation d'acidose latente butyrique (Expérimentation 3, n=4).



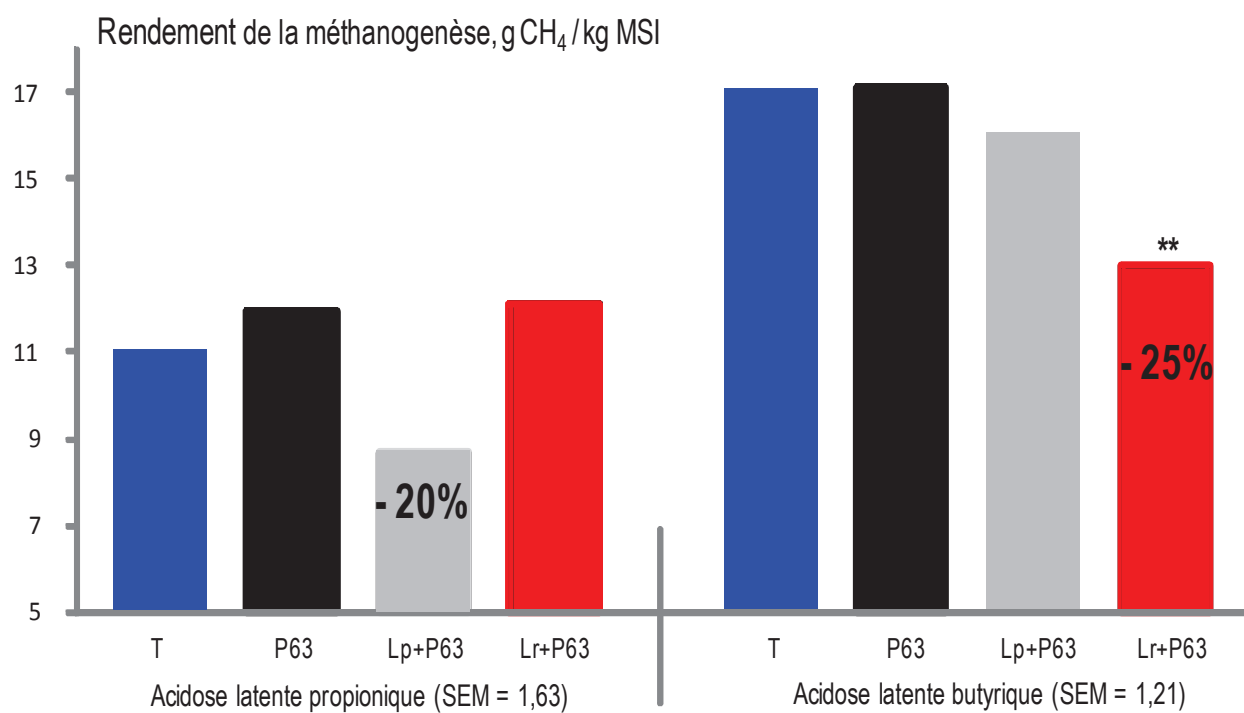
**Nos résultats sont les premiers à démontrer un effet spécifique et bénéfique des bactéries probiotiques sur le pH ruminal. Jusque là la stabilisation du pH ruminal n'a été possible que par l'utilisation de la levure *S. cerevisiae* seule ou associée à la bactérie lactique *E. faecium* (cf. Chapitre 3).**

### 3.3.2. Amélioration de la digestion chez la vache laitière

Avant repas, l'association Lr + P63 a significativement amélioré les activités cellulase et xylanase. Après repas, c'est l'association Lp + P63 qui a augmenté les activités enzymatiques précitées (Figure 30). **La conséquence logique de l'augmentation des activités enzymatiques a été une amélioration de la digestion de la ration et plus particulièrement des parois végétales. L'association Lp + P63 a augmenté la digestibilité de la matière organique (+ 2,5%) et du NDF (+ 2,71%) tandis que celle des fibres ADF et NDF a été augmentée par Lr + P63 (+ 6 et + 4,3%, respectivement).** Si une amélioration de la digestibilité a déjà été rapportée pour les levures (+ 0,8% en moyenne pour la MO ; revue Desnoyers *et al.*, 2009), notre essai (**Article 3**) est le premier à montrer un effet spécifique des bactéries probiotiques.

## 4. Amélioration de la production laitière

Au cours de l'expérimentation sur vaches en production (**Article 3**), nous avons évalué la possibilité d'améliorer l'ingestion et/ou la production et la qualité du lait par l'addition de bactéries probiotiques car ceci constitue une finalité pour l'industriel (Danisco) et l'éleveur. Aucun effet significatif n'a été observé, même lorsque la digestibilité était améliorée, comme c'était le cas avec la ration ensilage d'herbe + pulpes (acidose latente butyrique). Cette absence d'effet est en accord avec notre étude quantitative de la littérature (cf. Chapitre 3) qui a montré que **i) l'utilisation de bactéries probiotiques peut améliorer la production laitière en stimulant l'ingestion, ii) les effets sont avérés avec des bactéries lactiques seules ou des associations levures *S. cerevisiae* + bactéries (lactiques ou propioniques).** Cependant, il faut rappeler que la durée de supplémentation des bactéries probiotiques (4 semaines) est relativement courte comparé aux données de la littérature (17 semaines en moyenne ; Nocek et Kautz, 2006 ; Stein *et al.*, 2006 ; Weiss *et al.*, 2008). De plus, comme cela a déjà été soulevé précédemment (Beauchemin *et al.*, 2003), le dispositif en carré latin ne serait peut-être pas le plus approprié pour étudier l'effet des additifs microbiens sur les performances animales. On pourrait supposer qu'une distribution prolongée puisse améliorer les performances zootechniques car l'action des probiotiques nécessite un temps de latence pour que l'écosystème microbien s'adapte à l'apport des probiotiques et pour que les probiotiques exercent leurs actions (cf. Chapitre 2).



\*\* pour  $P < 0,05$ ; \* pour  $P < 0,1$ ; + pour  $P < 0,15$

Figure 31. Effets des bactéries probiotiques sur la production de méthane chez la vache laitière en situation d'acidose latente propionique ou butyrique (Expérimentations 3, n=8).

## 5. Diminution de la méthanogenèse

Bien que l'étude de l'effet des BP sur la méthanogenèse ne fût pas prévue dans nos objectifs initiaux, nous avons jugé pertinent d'étudier leurs effets sur la production de méthane du fait de leur capacité à moduler les fermentations ruminales. L'utilisation des probiotiques pour réduire la méthanogenèse est peu documentée et les rares études *in vivo* ont concerné l'effet des levures. Sur bovins en croissance, la supplémentation en *S. cerevisiae* ( $2 \times 10^{10}$  UFC/jr de Levucell SC, Lallemand Inc;  $6 \times 10^{10}$  UFC/jr de Procreatin-7 yeast, SAF Agri) n'a eu aucun effet sur la production de méthane (McGinn *et al.*, 2004). Récemment l'utilisation de la levure *S. cerevisiae* (nouvelles souches) a réduit la production de méthane (g/kg MSI) de 7% (Chung *et al.*, 2011) chez la vache laitière tarie. Il n'est pas possible de conclure à un effet direct des levures sur la réduction de la méthanogenèse car elle s'est accompagnée d'une chute du pH ruminal (6,24 à 5,98) qui peut inhiber la croissance et/ou l'activité des méthanogènes (Martin *et al.*, 2010). Concernant l'effet spécifique des bactéries, l'utilisation du surnageant de culture de *Lb. plantarum* 80 seul ou en association avec la bactérie acétogène *Peptostreptococcus productus* avait permis une baisse de la production de méthane (10 et 15%, respectivement) en stimulant l'acétogenèse réductrice (Nollet *et al.*, 1998). *In vivo* la méthanogenèse a été réduite de 80% au cours des 3 premiers jours suivant la supplémentation avant un retour à la normale de la production de méthane. Selon les auteurs, la réduction de la méthanogenèse serait due à une inhibition de la population de protozoaires et/ou des *Archaea* par un métabolite (bactériocine ?) présent dans le surnageant de culture de *Lb. plantarum* 80, dont la dégradation par le microbiote ruminal a entraîné la disparition de l'effet anti-méthanogenèse.

**En situation d'acidose latente butyrique (Figure 31), Lr + P63 a réduit le rendement de la méthanogenèse de 25% comparé aux animaux témoins (13 vs. 17 g CH<sub>4</sub> / kg MSI, respectivement). Chez les vaches en situation d'acidose propionique, Lp + P63 tendait également à réduire la méthanogenèse d'environ 20% par rapport aux vaches non supplémentées (8,69 vs. 11,05 g CH<sub>4</sub> / kg MSI, respectivement). Ceci s'est accompagné d'une légère augmentation de la densité bactérienne ( $P = 0,1$ ) qui constitue une voie consommatrice de H<sub>2</sub> concurrente de la méthanogenèse. Bien que cette réduction ne soit pas statistiquement significative ( $P = 0,20$ ), elle nous paraît tout de même très intéressante car l'effet était presque systématique (75% des cas). Dans les deux situations d'acidose, la réduction des émissions de méthane n'était pas liée à une diminution du nombre des *Archaea*, ce qui est cohérent avec la littérature, ou de la population de protozoaires qui semble pourtant positivement corrélée à la production de méthane (Morgavi *et al.*, 2010). Ceci suggère l'existence d'autres mécanismes. Très récemment, en quantifiant *in vitro* (Guo *et al.*, 2008) et *in vivo* (Popova *et al.*, 2011) l'expression du gène *mcrA* qui code pour l'enzyme impliquée dans la dernière**

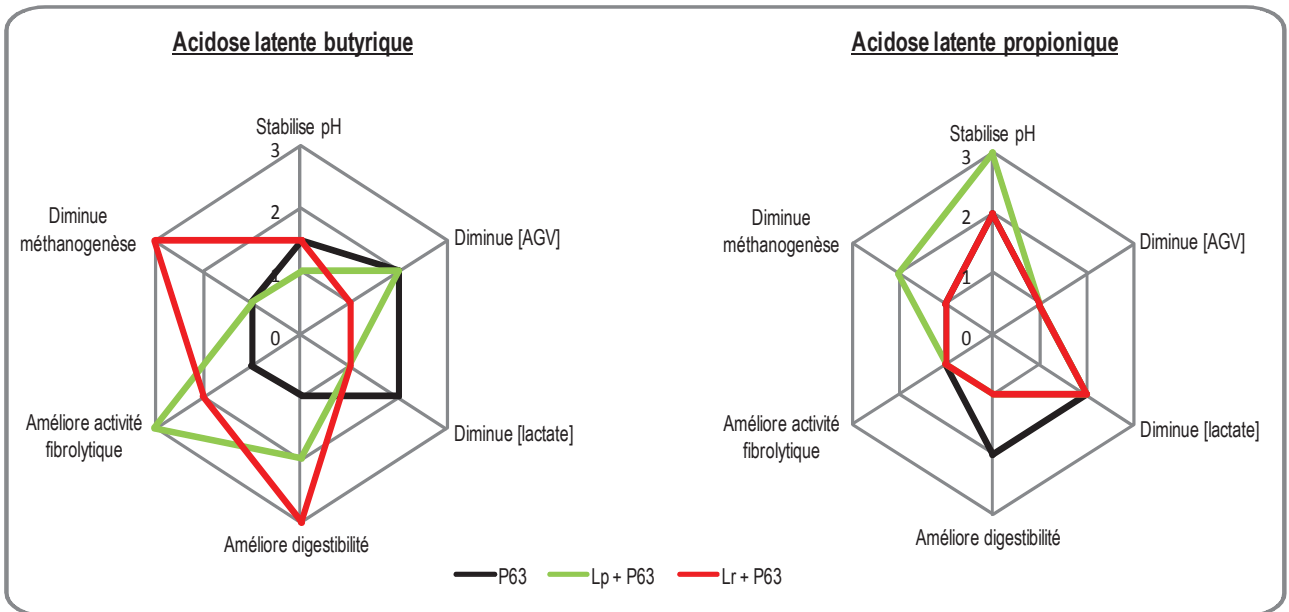


Figure 32. Choix de la solution probiotique en fonction du type d'acidose latente.

étape de la méthanogenèse, il a été montré que la réduction de la production de méthane était associée à une diminution de l'activité et/ou à une modification de la structure de la communauté méthanogène au profit d'individus moins producteurs de méthane. D'autre part, une diminution du temps de séjour des particules dans le rumen pourrait expliquer la baisse de la méthanogenèse du fait d'une moindre production d'H<sub>2</sub> au niveau du rumen (Martin *et al.*, 2010 ; Pinares-Patiño *et al.*, 2003 ; Pinares-Patiño *et al.*, 2007). Enfin, on peut se questionner sur le **devenir de l'énergie « économisée »** par la diminution de la méthanogenèse ? Sans effet sur les performances animales, l'une des possibilités serait la production de chaleur.

**Nos résultats sont les premiers à montrer une diminution significative (20 à 25%) de la méthanogenèse par l'utilisation bactéries probiotiques en associant à *Propionibacterium* P63 les souches lactiques *Lb. plantarum* 115 et *Lb. rhamnosus* 32. Ces résultats feront l'objet d'un brevet qui est actuellement en cours d'instruction.**

## 6. Adéquation entre type d'acidose et solution probiotique

Les expérimentations sur moutons non productifs et vaches en production ont permis d'identifier, en fonction de la ration (amidons vs. fibres), les combinaisons de probiotiques les mieux adaptées pour prévenir les différents type d'acidose. Les 3 solutions probiotiques ont été comparées sur la base de six critères sur lesquels des effets probiotiques ont été observés. Pour chacun des critères un score (1 : pas d'effet ; 2 : effet intéressant ; 3 : effet très intéressant) a été attribué (Figure 32). **D'une manière générale, les associations Lp + P63 et Lr + P63 ont eu des effets plus intéressants que P63 seule ce qui est cohérent avec les études *in vivo* où P63 n'était efficace qu'en étant associée à une bactérie lactique (Swinney-Floyd *et al.*, 1999).** Si les deux groupes bactériens sont connus pour leurs activités stimulatrices sur les flores bactériennes (cf. Chapitre 2), il serait très intéressant de savoir par quel(s) mécanisme(s) ils modulent le microbiote ruminal. En condition d'acidose latente butyrique, **l'association de *Lb. rhamnosus* avec P63 a été la plus intéressante en améliorant la digestion de la ration et en diminuant les émissions de méthane (Lr + P63 > Lp + P63 > P63).** Concernant l'acidose latente propionique qui est la plus répandue dans la pratique, **l'utilisation conjointe de *Lb. plantarum* et P63 a été la plus efficace pour stabiliser le pH ruminal et réduire, mais de manière non significative, la méthanogenèse.**

## 7. Conclusion

Le but de ce travail était d'évaluer l'efficacité et le mode d'action de bactéries propioniques et/ou lactiques pour prévenir l'acidose ruminale latente chez le ruminant. **Nous avons efficacement induit les situations d'acidose latente propionique et butyrique chez les deux modèles animaux étudiés (moutons et vaches).** Nous avons montré que **l'effet des bactéries probiotiques dépend des orientations fermentaires** spécifiques à chaque situation d'acidose et validé notre hypothèse de départ. Un schéma récapitulatif du mode d'action potentiel des bactéries probiotiques a été réalisé (Figure 33) en considérant les résultats obtenus sur les deux modèles animaux.

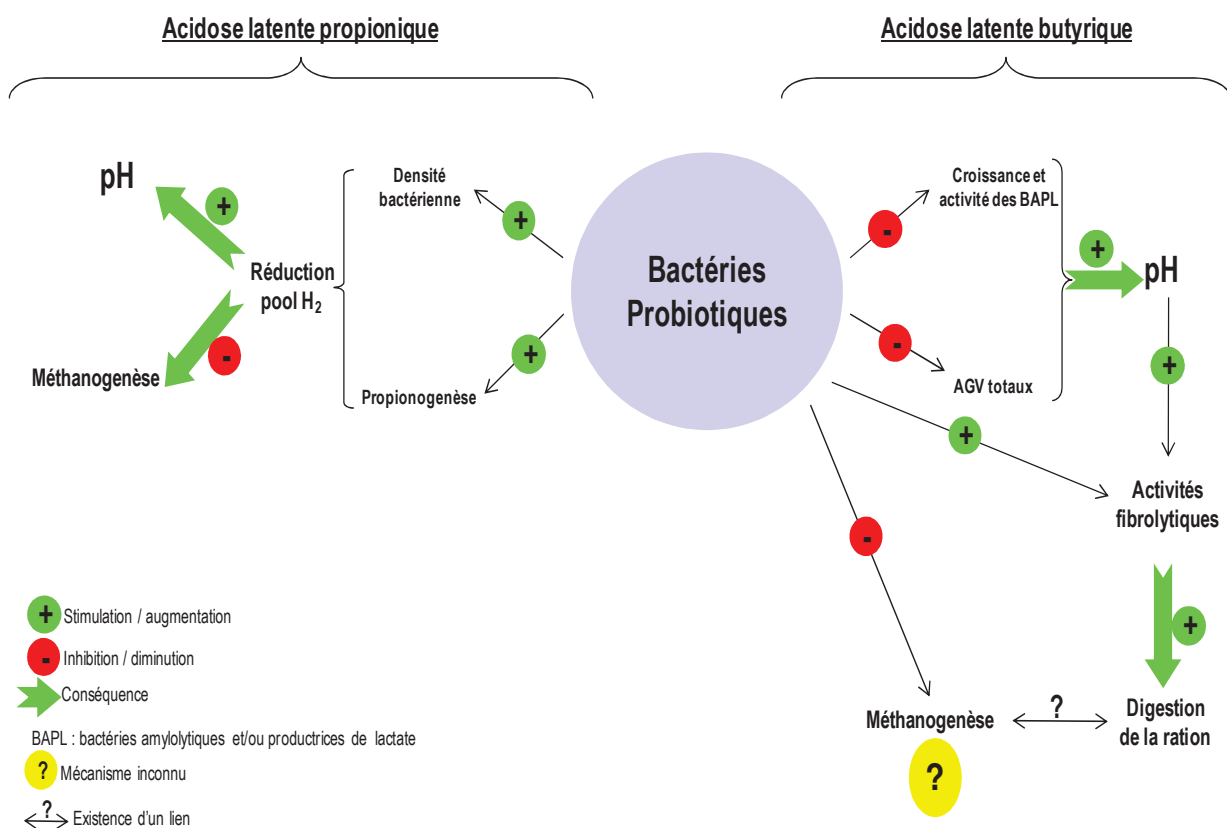


Figure 33. Schéma général du mode d'action des bactéries probiotiques en fonction du type d'acidose latente.

► **Chez le mouton non productif**

En condition d'acidose butyrique, l'association P63 + *Lb. plantarum* 115 a permis de stabiliser le pH ruminal (+ 0,25 unité pH) par une réduction de la production des AGV et la réduction de la prolifération des bactéries productrices de lactate *S. bovis* et *Lactobacillus* spp. Ce meilleur confort ruminal s'est traduit par une amélioration de l'activité fibrolytique. Lors de l'acidose propionique, un effet bénéfique a été obtenu sur le pH (+ 0,24 unité pH en moyenne) avec les 3 probiotiques grâce à un mécanisme encore non élucidé car les paramètres fermentaires et microbiens n'ont pas été modifiés par la supplémentation. Seule la population des lactobacilles tendait à diminuer chez les animaux supplémentés avec P63 et P63 + *Lb. plantarum* 115.

► **Chez la vache en lactation**

En situation d'acidose latente butyrique, l'absence d'effet des BP sur le pH ruminal est probablement liée aux conditions moins acides comparées à nos observations sur moutons. Par contre, les associations P63 + *Lb. plantarum* 115 et ou P63 + *Lb. rhamnosus* 32 ont stimulé les activités fibrolytiques et amélioré par voie de conséquence la digestion des fibres. Lors de l'acidose latente propionique, les trois probiotiques ont stabilisé le pH ruminal (+ 0,24 unité pH en moyenne). Ceci était lié à une stimulation de la propionogenèse et/ou l'augmentation de la densité bactérienne via une diminution du pool en H<sub>2</sub> susceptible d'être transformé en protons. Enfin, la production de méthane a été réduite de 20 et 25% avec P63 + *Lb. plantarum* 115 et P63 + *Lb. rhamnosus* 32 lors des acidoses latentes propionique et butyrique, respectivement. Les mécanismes exacts de cet effet dépressif des BP sur la méthanogenèse ne sont pas encore clairs surtout pour l'acidose butyrique. Pour l'acidose propionique, l'effet des BP pourrait être relié à une moindre disponibilité en hydrogène pour la méthanogenèse suite à la stimulation de certaines voies consommatrices d'hydrogène (propionogenèse, croissance bactérienne).

**Nos résultats sont les premiers à démontrer l'efficacité des bactéries probiotiques pour sécuriser et/ou améliorer la digestion des rations acidogènes chez le ruminant en général et la vache laitière en particulier. De plus, les associations de P63 avec les souches de *Lactobacillus* semblent être les plus efficaces. Cependant, des études complémentaires, sur le long terme et impliquant un plus grand nombre d'animaux, sont requises pour confirmer nos résultats et affiner les mécanismes d'action des bactéries probiotiques avant d'envisager leur commercialisation par DANISCO.**





## PERSPECTIVES



## 1. Perspectives

Nous avons mis en place une approche originale pour caractériser les modifications des profils fermentaires et microbiens suite à l'induction des acidoses ruminales latentes et à la supplémentation en bactéries probiotiques. Cependant, **nos résultats ne reflètent qu'une image partielle de ce qui se passe au sein du microbiote ruminal**. A titre d'exemple, l'ensemble des communautés bactériennes quantifiées constitue ~ **50% de la flore totale pour l'acidose propionique et moins de 40% pour l'acidose butyrique**. De plus, **la part des bactéries dont le métabolisme est connu est inférieure à 5%**. Les perspectives présentées ici sont celles qui nous paraissent les plus concrètes afin de compléter nos résultats actuels et affiner les mécanismes d'action proposés pour les bactéries probiotiques utilisées. En effet, nous disposons des échantillons biologiques et les techniques qui sont présentées ici pourraient être aisément mises en place pour répondre aux questions posées. Par ailleurs, ces mêmes techniques pourraient être utilisées lors de futures expérimentations animales visant à valider nos résultats actuels.

### 1.1. Etudes complémentaires à court terme

#### 1.1.1. Activité et structure de la communauté méthanogène

Comme cela a été présenté précédemment, la réduction de la méthanogenèse observée n'était pas liée à une modification dans la densité des protozoaires ni à celle des méthanogènes. Des résultats récents suggèrent que la production de méthane serait davantage liée à une modification de la structure et/ou de l'activité de la communauté méthanogène (Guo *et al.*, 2008 ; Popova *et al.*, 2011). La mise en place rapide d'une qPCR et d'une DGGE en ciblant le gène *mcrA* pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse.

#### 1.1.2. Colonisation du rumen par les bactéries probiotiques utilisées

La quantification spécifique des souches probiotiques dans le rumen est un élément important du point de vue contrôle qualité (contrôle de la viabilité cellulaire et de la dose théorique à celle réellement administrée à l'animal) mais aussi pour évaluer leur temps de séjour dans le rumen. Si les deux souches de lactobacilles (Lp-115 et Lr-32) ne peuvent être spécifiquement recherchées à l'heure actuelle, l'équipe de X. Smith (Danisco, USA) a récemment développé des amorces spécifiques visant à quantifier la souche P63. Leurs premiers résultats suggèrent que P63 est capable de coloniser le rumen et de se maintenir sur plusieurs semaines à des niveaux importants. Ces résultats méritent d'être confirmés car la colonisation du rumen par une bactérie allochtone est difficilement envisageable ; le microbiote ruminal est complexe et l'ensemble des niches écologiques sont occupées par des bactéries

autochtones adaptées. Afin d'éclaircir ce point, il est possible de tester les amorces récemment développées pour quantifier P63 sur les échantillons d'ADN provenant des expérimentations 2 et 3.

### 1.1.3. Relation *E. coli* – acidose latente - inflammation

Récemment, Khafipour *et al.* (2009c) ont mis en évidence une relation entre l'acidose latente, induite par une alimentation riche en céréales, l'augmentation de la proportion de *E. coli* dans le microbiote ruminal et l'apparition de protéines inflammatoires dans le sang. Par une étude complémentaire, ces mêmes auteurs ont montré que l'acidification du milieu ruminal sélectionne des souches exprimant un nombre important de facteurs de virulences (adhésines) pouvant être associés à la production de protéines inflammatoires dans le sang (Khafipour *et al.*, 2011). Dans notre essai sur vache laitière, les premières tentatives pour quantifier *E. coli*, n'ont pas été concluantes pour des raisons méthodologiques. Le programme d'amplification utilisé par Khafipour *et al.* (2009c) s'est révélé inefficace et devra faire l'objet d'adaptations méthodologiques. D'autre part, le dosage des protéines inflammatoires (échantillons sanguins disponibles) pourrait compléter les résultats de quantification de la bactérie *E. coli* afin d'infirmer ou confirmer les résultats précités. **Si ces résultats se confirment, il serait envisageable de diagnostiquer l'acidose latente à partir de prélèvements ruminiaux (quantification d'*E. coli*) et/ou sanguins (recherche des protéines inflammatoires).**

## 1.2. Etudes complémentaires à moyen terme : application des approches en 'omique' pour l'étude de l'écosystème ruminal

### 1.2.1. La métagénomique

Plutôt que de cibler spécifiquement un gène donné, la métagénomique consiste à séquencer la totalité du microbiote présent dans un écosystème donné afin de visualiser la composition et les fonctions métaboliques potentielles à un moment précis. Cette approche est en plein essor et est utilisée pour l'étude de plusieurs écosystèmes comprenant le sol (Baveye, 2009 ; Brennerova *et al.*, 2009), le tractus digestif humain (Gill *et al.*, 2006 ; Qin *et al.*, 2010) et animal (Brulc *et al.*, 2009 ; Ferrer *et al.*, 2009). Les images instantanées obtenues peuvent être comparées afin de mettre en évidence l'effet d'une perturbation (changement régime, traitement antibiotique, probiotiques, ...) mais aussi pour la découverte d'enzymes et de microorganismes jusque là inconnus (Bayer *et al.*, 2010 ; Brulc *et al.*, 2009 ; Cai *et al.*, 2010 ; Duan *et al.*, 2009 ; Ferrer *et al.*, 2007).

Dans l'étude de l'acidose, il nous paraît intéressant de pouvoir comparer le microbiote ruminal d'un animal souffrant et celui d'un animal témoin (animaux différents ou même animal) ou encore de

comparer le microbiote d'un animal plus sensible à l'acidose qu'un autre. Parmi les différentes techniques qui permettraient cette étude comparative (pyroséquençage, puces à ADN, ...), **l'hybridation suppressive soustractive (SSH)** paraît particulièrement intéressante. Sa mise en œuvre a été décrite pour la première fois en 1990 pour mettre en évidence les séquences d'ADN absentes d'un organisme mutant comparé au sauvage (Straus et Ausubel, 1990) et pour la comparaison des séquences entre souches de la bactérie pathogène *H. pylori* (Akopyants *et al.*, 1998). Son principe est sans *a priori*, et permet de comparer une situation d'intérêt (par exemple rumen en acidose) à la situation témoin. Par cette approche, seuls les fragments d'ADN (ou ARN) spécifiques au rumen en acidose seraient amplifiés et identifiés après séquençage (par comparaison aux bases de données) afin de **mettre en évidence des différences de composition microbienne et d'activités métaboliques potentielles liées à l'état d'acidose**. Au niveau du rumen cette technique a été utilisée dans un essai pilote sur des bouvillons alimentés avec une ration riche en fourrage (Galbraith *et al.*, 2004) et a révélé une importante proportion d'*Archaea* qui atteignait 18,5% des séquences mises en évidence, ce qui est bien au delà des 0,5 à 3% généralement admis (Brulc *et al.*, 2009). Le plus surprenant est que la majorité des séquences apparentées aux *Archaea* présentaient de fortes similitudes avec une espèce non trouvée dans le rumen, *Methanothermobacter thermautotrophicus*. A cela s'ajoute une importante différence dans la structure de la communauté des *Archaea* entre les deux animaux testés alors qu'ils étaient logés ensemble et recevaient une ration identique. **Pour l'étude de l'acidose, cette technique peut être appliquée sur nos échantillons pour suivre spécifiquement les communautés microbiennes métaboliquement actives en ciblant directement l'ARN extrait pour chaque situation d'acidose.**

### 1.2.2. La métabolomique

La métabolomique est un champ de recherche relativement récent qui permet l'identification et la quantification de l'ensemble des métabolites présents dans un écosystème donné (cellule, tissus, organe). L'ensemble des métabolites forme le métabolome (German *et al.*, 2005) qui inclut une importante variété de molécules : acides aminées, acides organiques, glucides, vitamines, polyphénols, alcaloïdes, ... Cette discipline est rendue possible par l'utilisation de technologies hautement résolutes dans l'analyse, la quantification et l'identification des spectres mais aussi de logiciels performants et de bases de données contenant des informations descriptives et des spectres de multiples molécules provenant de divers écosystèmes (Cotter *et al.* ; Kopka *et al.* ; Moco *et al.*, 2006 ; Smith *et al.*, 2005 ; Wishart *et al.*). Parmi les techniques utilisées, on peut citer la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) ainsi que différentes techniques chromatographique couplées à la spectrométrie de masse (GC-MS, la LC-MS, CE-MS). La métabolomique a initialement été utilisée pour des applications pharmaceutiques et

cliniques comme la recherche et l'évaluation de médicaments et de toxiques (Wishart, 2008). Depuis ses applications sont multiples et parmi elles l'étude du métabolisme microbien (Deborde et Boyaval, 2000 ; Xavier *et al.*, 2000) et l'identification des espèces responsables d'aspergilloses invasives chez l'homme afin de proposer le traitement le mieux adapté au patient. Cette dernière application avait pour but de mettre en évidence la présence, dans l'air expiré du patient, de métabolites volatils spécifiques de l'espèce causant la pathologie (Boudra *et al.*, non publié). Par ailleurs, l'étude des interactions entre nutrition et santé par l'évaluation de l'effet de régimes alimentaires ou d'additifs (antibiotiques, probiotiques, ...) sur le microbiote du tractus digestif de l'homme et de l'animal est une piste prometteuse. Chez le ruminant, cette approche a été récemment utilisée (Ametaj *et al.*, 2010) afin de mettre en évidence les changements dans le métabolisme ruminal de vaches laitières recevant des quantités croissantes de GRF (0, 15, 30 et 45%). Les résultats étaient surprenants dans la mesure où plusieurs métabolites potentiellement toxiques ont été identifiés chez les vaches alimentées avec les rations riches en concentré. Les auteurs ont observé une importante augmentation (x 177) du niveau de méthylamine ruminale dont la toxicité a été montrée chez l'homme. Les auteurs ont également observé un accroissement du taux de N-nitrosodiméthylamine dont l'effet hépatotoxique a été montré chez les ovins (Koppang, 1964 ; cité par Ametaj *et al.*, 2010). En plus des molécules précitées, d'autres ont été mises en évidence par cette approche métabolomique et leur rôle dans l'étiologie des différentes pathologies associées à l'utilisation de ration riches en concentré devrait être abordé (Ametaj *et al.*, 2010). **L'application de cette approche sur des animaux avant et après induction d'une acidose ruminale permettrait l'identification de métabolites spécifiques pouvant servir à diagnostiquer la pathologie à partir de prélèvements ruminiaux par exemple (ruminocentèse) et à l'avenir sur des matrices plus simples d'accès sur le terrain comme le lait.**

### 1.3. Etudes complémentaires à moyen ou long terme : expérimentations animales futures

Il est évident que la mise en place d'expérimentations animales est nécessaire pour valider les résultats observés chez le bovin laitier dans le cadre de notre travail. Ces études devront être réalisées sur un plus grand nombre d'animaux conduits en lots (conditions plus proches de la pratique) et sur le long terme (lactation entière) pour confirmer la persistance des effets observés suite à la supplémentation des BP. La priorité sera donnée aux associations *Lactobacillus* + *Propionibacterium* qui semblent être les plus efficaces. L'effet dose, n'ayant pas été évalué lors de ce travail de thèse, pourrait également être abordé dans les expérimentations à venir. Une démarche similaire pourrait être adoptée pour le ruminant à viande (agneaux, taurillons) chez qui les risques d'acidose sont importants en période d'engraissement.

## ANNEXES



## Substrate oriented rumen fermentations in sheep during provoked acidosis

A. Lettat (1,2), P. Nozière (1), M. Silberberg (1), D. P. Morgavi (1), and C. Martin (1)  
 (1) INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France  
 (2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain

### INTRODUCTION

Latent rumen acidosis appears when high energy diets meet a ruminal ecosystem not adapted to such substrate. This digestive disorder is a major problem in high producing ruminants. Excessive consumption of readily fermentable carbohydrates (RFC) disturbs the rumen microbiota affecting fermentation, which became unstable and variably oriented toward lactate, propionate or butyrate at the expense of acetate. Our aim was to develop an experimental model of rumen acidosis in sheep for monitoring the fermentation pathways (lactic, propionic and butyric) and studying the changes in the microbial ecosystem.

### MATERIALS AND METHODS

#### Animals

3 rumen cannulated wethers  $63.4 \pm 5.4$  kg BW randomly assigned to three feed challenges in a 3 x 3 latin square design

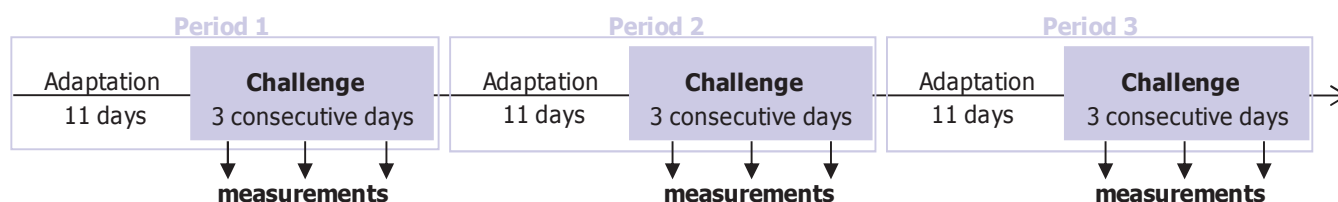
#### Diets

Adaptation: 80 % hay + 20 % wheat

Challenges: 40 % hay + 60 % RFC (wheat, maize or beet pulp) intraruminally dosed through the canula once daily

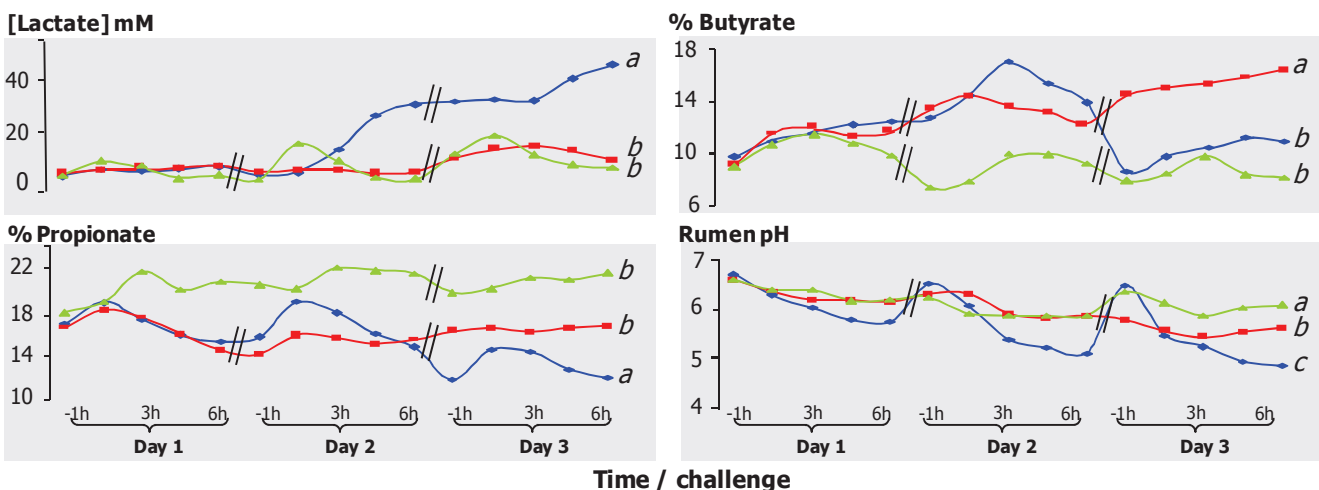
#### Measurements

Rumen pH, volatile fatty acids (VFA) and lactic acid concentrations from ruminal juice sampled 1 h before and 1, 3, 5 and 6 h after challenge



### RESULTS

Effect of feed challenges based on wheat (—◆—), maize (—■—) and beet pulp (—▲—) on lactate concentration, molar proportion of propionate and butyrate, and rumen pH during rumen induced acidosis in sheep. The letters a, b and c indicate significant differences between feed challenges at the end of the challenge period ( $P < 0.05$ ).



Rumen fermentation parameters evolution from day 1 (-1h) to day 3 (6 h)

#### Wheat challenge

- Lactate increased by **85 %**
- Total VFA decreased by **53 %**
- Rumen pH decreased markedly to **4.85**

#### Lactic acidosis

#### Maize challenge

- Butyrate increased by **46 %**
- No changes in propionate and lactate concentrations
- Rumen pH decreased moderately to **5.60**

#### Butyric latent acidosis

#### Beet pulp challenge

- Propionate increased by **17 %**
- No changes in butyrate and lactate concentrations
- Rumen pH remained above **6.00**

#### Propionic latent acidosis

### CONCLUSION

Lactic, butyric and propionic acidosis was selectively induced in sheep using different feeds. This animal model is currently used to study the rumen microbial ecosystem for better comprehension of rumen acidosis onset.



## 1. Communication n°1

Communication présentée lors de l'International Symposium on Ruminant Physiology (XI<sup>th</sup> ISRP), 6-9 Septembre 2009, Clermont-Ferrand, France

### Substrate oriented rumen fermentations in sheep during provoked acidosis

A. Lettat (1,2), P. Nozière (1), M. Silberberg (1), D. P. Morgavi (1) and C. Martin\* (1)

(1) INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France (2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain

\* Correspondence: [cecile.martin@clermont.inra.fr](mailto:cecile.martin@clermont.inra.fr)

#### Introduction

Latent rumen acidosis is a major problem in high producing ruminants. It decreases feed efficiency and production and predisposes to disease (Stock *et al.*, 1990). This rumen disorder is due to excessive consumption of readily fermentable carbohydrates (RFC), which induces a reduction in pH and affects the microbial ecosystem. During latent acidosis microbial fermentations are instable and variably oriented to lactate, propionate or butyrate at the expense of acetate according to the severity of acidosis (Martin *et al.*, 2006), and existing mechanistic rumen models fail to predict rumen VFA profiles (Offner and Sauvant 2004). The aim of this study was to develop an experimental model of rumen acidosis in sheep for monitoring the fermentation pathways (lactic, propionic and butyric) and studying the changes in the microbial ecosystem.

#### Materials and Methods

Three ruminally cannulated Texel wethers, averaging  $63.4 \pm 5.4$  kg BW at the start of the experiment, were used. Weathers were housed in individual stalls (1.00 x 1.50 m) with individual feed-bunks, and were randomly assigned to three dietary treatments in a 3 x 3 Latin square design. Each period lasted 14 days with 11 days where sheep were fed (1.2% of BW) in two equal portions at 8:00 and 16:00 h with 80% hay + 20% wheat based concentrate, and 3 days of acidosis induction by a drastic change of diet (challenge). During the challenge periods, morning feeding was suppressed and sheep were intraruminally dosed with wheat (readily fermentable starch), maize (slowly fermentable starch) or beet pulp (easily digestible fibers). The acidosis challenges were repeated 3 times on 3 consecutive days (1 challenge per day). Animals had free access to water and mineralized salts blocks.

Intake of feed and water were recorded daily. During the acidosis induced periods, rumen liquid samples were taken from the ventral sac one hour before (-1) and 1, 3, 5 and 6 h after challenge induction. Rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids were measured on each sample. All data were analysed in repeated time using the MIXED procedure of SAS, with period, substrate (S, wheat vs. maize vs. beet pulp), challenge (C, 1 to 3), time (T, -1 vs. +1 vs. +3 vs. +5 vs. +6 h), and S×C, S×T, C×T, S×C×T interactions as fixed effect, and animal as random.

## Results

Rumen pH (Figure 1A) was affected by substrate ( $P < 0.01$ ) and S×T interaction ( $P < 0.001$ ), indicating that difference among substrates was enhanced by time. Mean rumen pH was lowest for wheat challenge (5.71), intermediate for maize (5.97) and highest for beet pulp (6.13). At the end of the acidosis induced period, total VFA concentration (data not shown) was affected by time ( $P < 0.001$ ) but not by substrate. Molar proportion of propionate (Figure 1B) was influenced by substrate ( $P < 0.01$ ), time, and S×T interaction ( $P < 0.001$ ). Beet pulp had the highest propionate proportion while it was intermediate for maize and lowest for wheat (21.6%, 16.7% and 12.1%, respectively). Molar proportion of butyrate (figure 1C) varied with time ( $P < 0.001$ ) and tended ( $P = 0.09$ ) to be higher for maize (16.5%) than for the other substrates (9.5% on average). Lactate concentration (figure 1D) in rumen fluid was affected by time ( $P = 0.002$ ) and S×T interaction ( $P < 0.001$ ). It reached 45.5 mM for wheat and was lower for maize and beet pulp (8.3 mM on average).

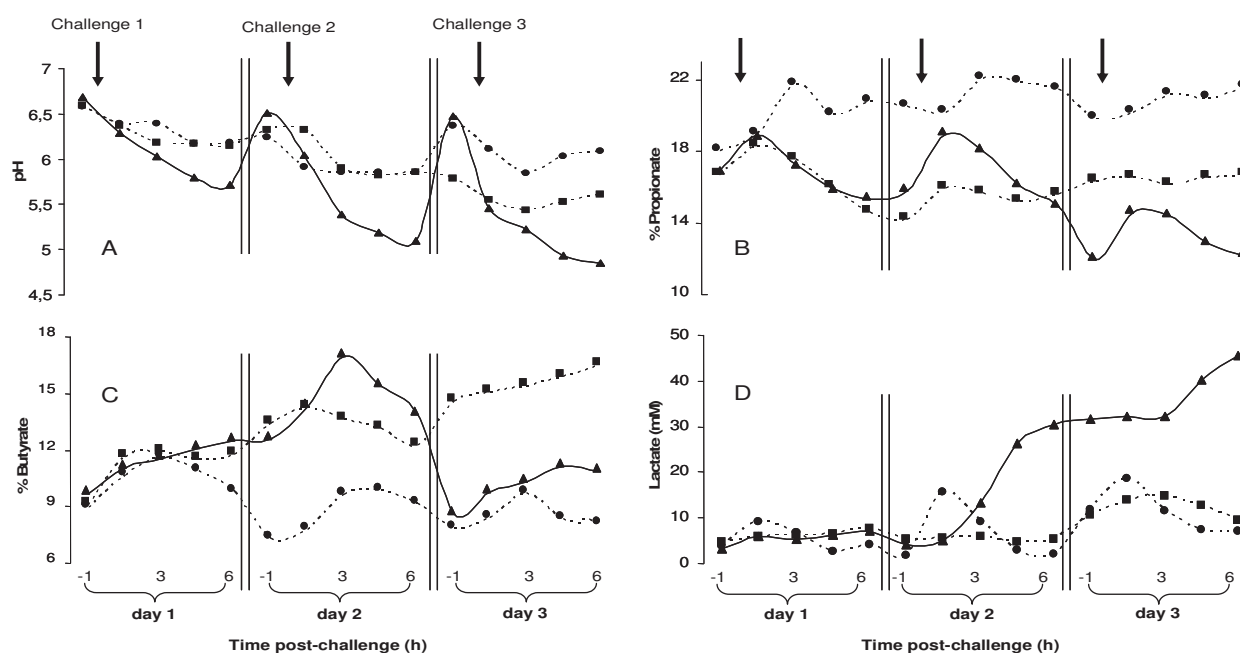


Figure 1: Effect of three different feed challenges based on wheat (▲), maize (■) and beet pulp (●) on pH (A), molar proportion of propionate (B) and butyrate (C), and lactate concentration (D) during rumen induced acidosis in sheep.

## Conclusion

We developed a model which allowed us to obtain differentiated rumen fermentations in sheep. The rumen pH and fermentation parameters obtained with the wheat challenge were indicative of a lactic acidosis, whereas butyric and propionic latent acidosis were observed for maize and beet pulp challenges, respectively. This model should be confirmed before beginning the microbial ecosystem characterisation.

## Acknowledgment

The authors thank Danisco SAS for their financial support and S. Alcouffe, M. Fabre and D. Roux for the care of animals.

## References

- Martin, C., L. Brossard and M. Doreau, 2006. Mécanismes d'apparition de l'acidose latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. INRA Prod. Anim. 19 (2), 93-108.
- Offner, A. and D. Sauvant, 2004. Comparative evaluation of the Molly, CNCPS, and LES rumen models. Anim. Feed Sci. Technol. 112, 107-130.
- Stock, R. A., M. H. Sindt, J. C. Parrot, and F. K. Goedecken. 1990. Effect of grain type, roughage level and monensin level on finishing cattle performance. J. Anim. Sci. 68:3441-3455.



## Développement d'un modèle d'étude des mécanismes microbiens impliqués dans l'acidose latente

A. Lettat (1,2), P. Nozière (1), M. Silberberg (1), D.P. Morgavi (1), et C. Martin (1)

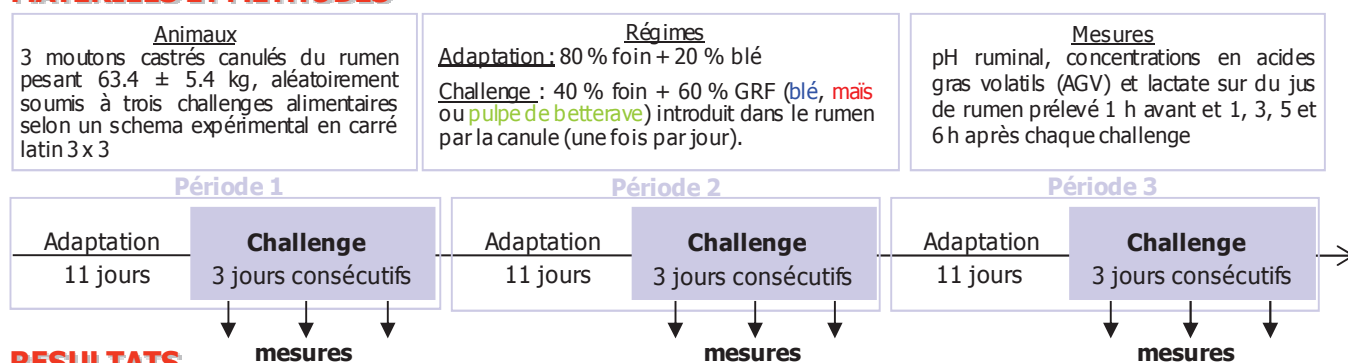
(1) INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France

(2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain

### INTRODUCTION

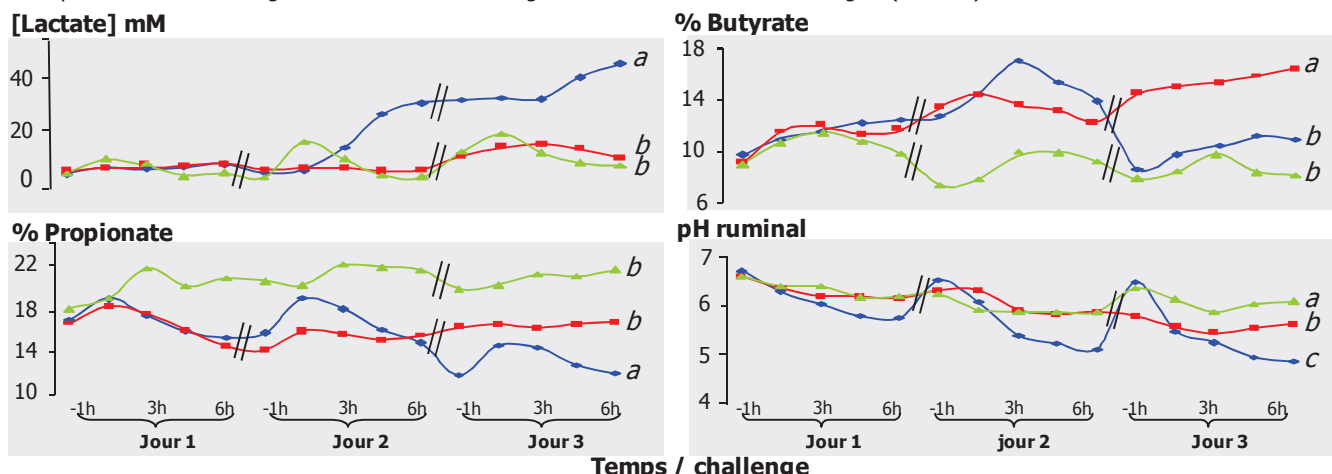
L'acidose ruminale latente apparaît lorsque l'écosystème microbien ruminal n'est pas adapté à des régimes riches en énergie. Ce trouble digestif constitue un problème majeur chez les ruminants fort producteurs alimentés avec des quantités importantes de glucides rapidement fermentescibles (GRF). Ce déséquilibre se traduit par des modifications imprévisibles des profils fermentaires dans le rumen vers le lactate, le propionate ou le butyrate selon la sévérité de l'acidose. Notre objectif était de développer chez le mouton un modèle expérimental permettant de maîtriser les profils fermentaires (lactique, propionique et butyrique) afin d'étudier les mécanismes microbiens impliqués dans les phénomènes d'acidose.

### MATERIELS ET METHODES



### RESULTATS

Effet de challenges alimentaires à base de blé (—●—), maïs (—■—) et pulpe de betterave (—▲—) sur la concentration en lactate, les proportions molaires en propionate et butyrate, et le pH dans le rumen de moutons en situation d'acidose provoquée. Les lettres a, b et c indiquent les différences significatives entre les challenges alimentaires à la fin du challenge 3 ( $P < 0.05$ ).



Evolution des paramètres fermentaires du rumen entre le jour 1 (-1h) et le jour 3 (6h) de chaque challenge

#### Challenge blé

- Le lactate augmente de **85 %**
- Les AGV diminuent de **53 %**
- Chute du pH ruminal à **4.85**

#### Acidose lactique

#### Challenge maïs

- Le butyrate augmente de **46 %**
- [lactate] et % propionate constantes
- Diminution du pH ruminal **5.60**

#### Acidose latente Butyrique

#### Challenge pulpe de betterave

- Le propionate augmente de **17 %**
- [lactate] et % butyrate constantes
- Le pH ruminal atteint **6.00**

#### Acidose latente Propionique

### CONCLUSION

Nous avons induit des acidoses ruminales se caractérisant par des pH différents et des orientations fermentaires contrastées en fonction des GRF distribués. Ce modèle expérimental a été reproduit dans un autre essai et les mécanismes microbiens impliqués dans l'apparition de l'acidose ruminale chez le mouton sont en cours d'étude.

## 2. Communication n°2

Poster présenté lors des 16<sup>e</sup> Journées 3R : Rencontre autour des Recherches sur les Ruminants, 7-8 Décembre 2010, Paris, France. Il s'agit en réalité d'une traduction du poster présenté au congrès l'ISRP

### Acidose latente provoquée : un modèle expérimental pour la maîtrise des orientations fermentaires ruminales chez le mouton à l'entretien

#### Induced latent acidosis: an experimental model for the monitoring of rumen fermentation patterns in sheep at maintenance

LETTAT A. (1,2), NOZIERE P. (1), MORGAVI D.P. (1), SILBERBERG M. (1) et MARTIN C. (1)

(1) INRA UR1213 Herbivores, Theix, F-63122 St Genès Champanelle

(2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain

#### INTRODUCTION

L'acidose latente est très souvent rencontrée chez les animaux à haut potentiel de production recevant des rations riches afin de couvrir leurs besoins énergétiques élevés (Kleen et al. 2003). L'acidose latente reste difficile à caractériser si ce n'est par l'instabilité des fermentations ruminales. Il semblerait que les fermentations microbiennes s'orientent variablement vers le lactate, le propionate ou le butyrate au dépend de l'acétate selon la sévérité de l'acidose (Martin et al, 2006). L'objectif du travail a été de développer un modèle d'étude permettant l'induction et la maîtrise d'orientations fermentaires ruminales contrastées chez le mouton à l'entretien, afin de pouvoir étudier les mécanismes microbiens sous-jacents.

#### 1. MATERIEL ET METHODES

L'essai a été réalisé en carré latin 3x3 sur 3 moutons mâles castrés munis d'une canule du rumen. Chaque période a duré 14 jours avec une phase d'adaptation (11 jours) pendant laquelle les animaux ont été alimentés 2 fois par jour avec un régime non acidogène (80% foin + 20% blé), suivie d'une phase de challenges acidogènes (3 jours consécutifs) durant laquelle le repas du matin a été supprimé et remplacé par l'introduction directe et massive dans le rumen (challenge) de glucides rapidement fermentescibles (GRF) broyés (3 mm), à raison de 1.2% du poids vif de l'animal. Trois types de GRF, se

différenciant par la nature des glucides et leur vitesse de dégradation, ont été comparés : le blé (amidon rapide), le maïs (amidon lent) et la pulpe de betterave (parois rapides), sensés orienter les fermentations ruminales vers le lactate, le propionate et le butyrate, respectivement. Le pH ruminal, les concentrations ruminales en lactate et en acides gras volatils (AGV) ont été mesurés avant (-1h), 1, 3, 5 et 6h après chaque challenge.

## 2. RESULTATS

Au 3ème jour de challenge, le pH ruminal (figure 1A) est plus faible avec le blé (4,85), intermédiaire avec le maïs (5,61) et plus élevé avec la pulpe de betterave (6,09). Par ailleurs, on observe que ces différences de pH entre substrats s'accroissent avec le temps ( $P < 0,001$ ). La proportion molaire en propionate (figure 1B) augmente avec la pulpe (21,0 mol/100 mol d'AGV totaux) et diminue avec le blé (12,1 %) alors qu'elle est relativement stable avec le maïs (17,3 %). La proportion molaire en butyrate (figure 1C) est plus élevée avec le maïs (16,3 %), intermédiaire avec le blé (10,8 %) et plus faible avec la pulpe de betterave (8,3 %). Le lactate ruminal atteint 45,5 mM avec le blé alors qu'il reste faible avec le maïs et la pulpe de betterave (8,3 mM en moyenne).

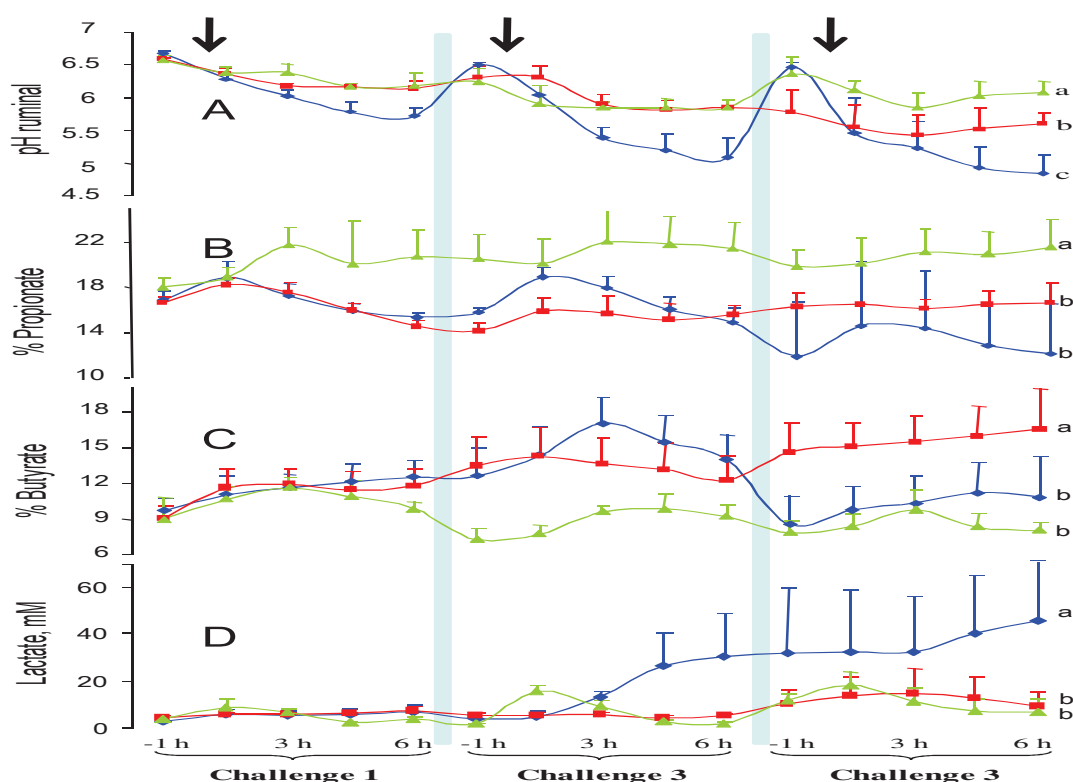


Figure 1: Effet de trois challenges alimentaires (flèches) à base de blé (▲), maïs (■) et pulpe de betterave (●) sur le pH (A), la proportion molaire en propionate (B) et butyrate (C), et la concentration en lactate (D) dans le rumen de moutons en condition d'acidose latente provoquée. Les lettres a, b et c indiquent les résultats statistiquement différents pour le dernier point de la cinétique.

### 3. DISCUSSION

Nous avons réussi à induire des acidoses se caractérisant par des pH différents dans le rumen et des orientations fermentaires contrastées en fonction des GRF distribués: orientation butyrique instable dérivant vers une acidose lactique avec le blé, orientation butyrique stable avec le maïs, et orientation propionique stable avec la pulpe de betterave. Les profils d'AGV obtenus avec le maïs (butyrique) et la pulpe (propionique) diffèrent de ceux attendus, ce qui suggère une modification des voies fermentaires microbiennes dans le rumen d'animaux en situation d'acidose provoquée par challenge.

### CONCLUSION

Les résultats d'un essai en cours montrent que notre modèle est reproductible ; il est actuellement utilisé pour caractériser les relations entre écosystème microbien et profil fermentaire ruminal.

Les auteurs remercient Danisco SAS pour leur soutien financier et les animaliers de l'URH pour les soins apportés aux animaux.

### REFERENCES

- Kleen, J.L., G. A., Rehage, Noordhuizen, J., 2003. J. Vet. Med. Ser. A. 50 : 406-414  
Martin, C., L. Brossard and Doreau, M., 2006. INRA Prod. Anim. 19 (2), 93-108



## Monitoring the rumen bacterial population changes during feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis in sheep



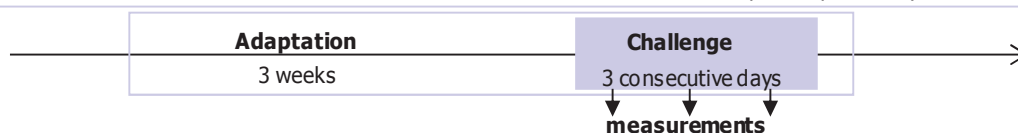
**A. Lettat** (1,2), P. Nozière (1), M. Silberberg (1), D. P. Morgavi (1), and C. Martin (1)  
 (1) INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France  
 (2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain, France

### INTRODUCTION

Ruminal acidosis likely to arise when high energy diets meet a rumen microbial ecosystem that is not adapted to this type of substrate. We make a distinction between lactic acidosis for which the fermentation end product is lactate and subacute ruminal acidosis (SARA) where fermentations are unstable and variably oriented toward propionate or butyrate at the expense of acetate (Martin et al. 2006). We recently developed a sheep model of experimentally-induced lactic acidosis and butyric or propionic SARA (Lettat et al. 2010) and the aim of this present study was to describe the effects of different acidosis types on cellulolytic and lactate producing bacteria as well as on *Prevotella* genus.

### MATERIALS AND METHODS

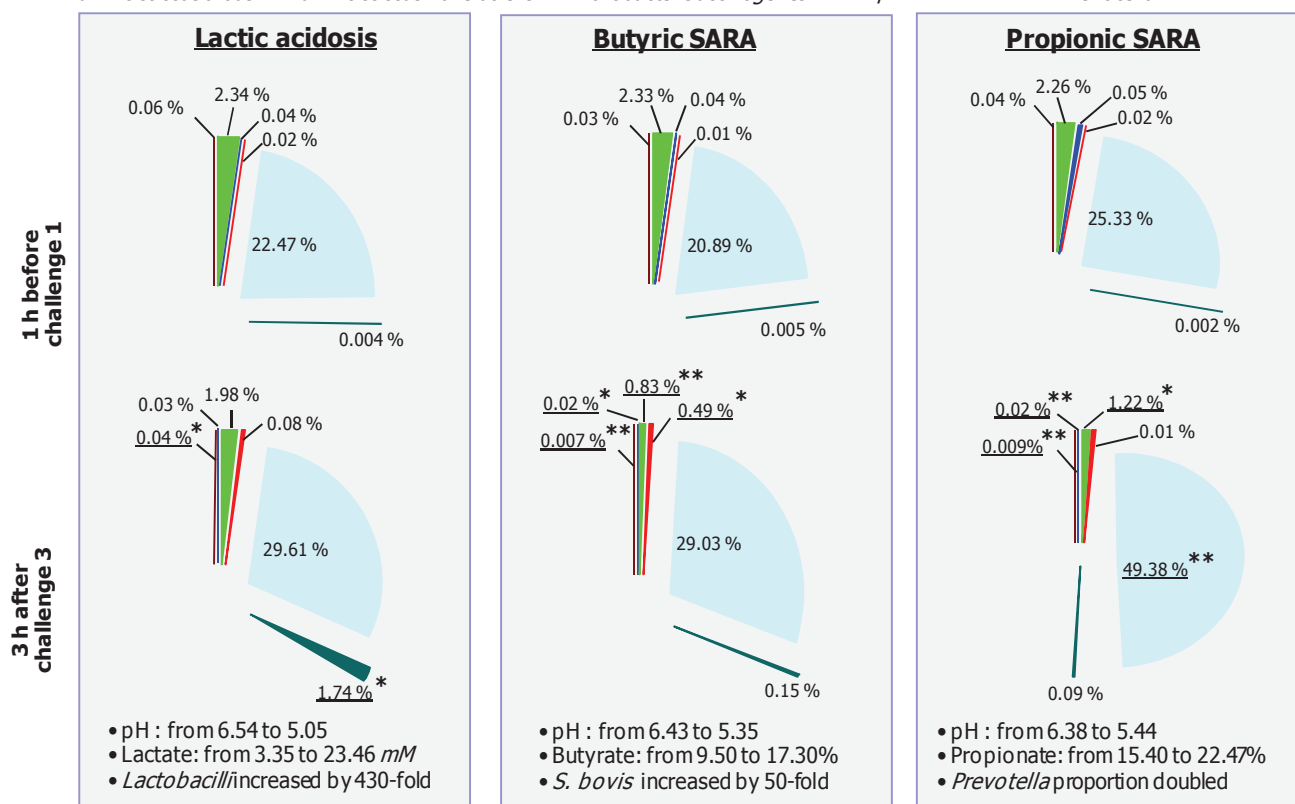
Animals	Diets	Measurements
12 rumen fistulated wethers 60.7 ± 3.3 kg BW randomly assigned to three feed challenges in a 4 x 4 Latin square design.	<b>Adaptation:</b> 80 % hay + 20 % wheat <b>Challenges:</b> 40 % hay + 60 % RFC (wheat, maize or beet pulp) intraruminally dosed through the canula once daily.	. Rumen pH, volatile fatty acids and lactate concentrations. . Bacterial composition using 16S rDNA specific primers by real-time qPCR.



### RESULTS

Figure : Effects of feed-induced ruminal acidosis on rumen bacterial composition in sheep (% of total bacteria). \*\* for  $P \leq 0.05$  and \* for  $P \leq 0.15$  within the same treatment.

■ *Ruminococcus albus* ■ *Ruminococcus flavefaciens* ■ *Fibrobacter succinogenes* ■ *Streptococcus bovis* ■ *Prevotella* ■ *Lactobacilli*



### CONCLUSION

We show here that each acidosis form is associated with a specific bacterial composition. Furthermore, we observed that independently of the acidosis form, *F. succinogenes* became predominant among cellulolytic bacteria after acidosis induction; this indicates that this bacterium was more acido-tolerant than the 2 *Ruminococci*.



### 3. Communication n°3

Poster présenté lors du 7<sup>e</sup> Symposium Rowett-INRA organisé conjointement par l'INRA et l'institut Rowett. Gut Microbiology: *new insight into gut microbial ecosystems*, 23-25 Juin 2010, Aberdeen, UK.

#### Monitoring the rumen bacterial population changes during feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis in sheep

Ruminal acidosis is a recurrent problem in ruminant production systems. The prevailing fermentation acid is difficult to predict in practice and it is thought to be the reason for the variable effectiveness of some rumen modifiers. We developed a sheep model of experimentally-induced lactic, butyric or propionic acidosis to describe the associated changes in the rumen microbiota. Twelve rumen-cannulated sheep separated into 3 groups of 4 animals were fed a hay:concentrate diet (80:20) during 3 weeks followed by three consecutive days of acidosis challenge by direct intraruminal supply (1.2% BW) of ground wheat, maize or beet pulp. Rumen contents were analyzed for fermentation parameters and polysaccharidase activities. Populations of *Fibrobacter succinogenes*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacilli* and *Prevotella* were quantified by qPCR.

At the end of the challenge, rumen pH was lower for wheat (4.87) than for maize (5.17) and beet pulp (5.55). Lactate was predominant for wheat (33.8 mM vs. ~3 mM for other challenges), whereas beet pulp and maize favored a high molar percentage of propionate (22.5%) and butyrate (16.9%), respectively. Fibrolytic activity and *F. succinogenes* proportion were similar among treatments. Amylase activity was highest for wheat, intermediate for maize and lowest for beet pulp. *Lactobacilli* and *S. bovis* proportions tended to be highest for wheat (1.74 vs. ~0.12%;  $P = 0.15$ ) and maize (0.49 vs. ~0.05%;  $P=0.17$ ) respectively, whereas *Prevotella* was highest for beet pulp (49 vs. ~29%). This study demonstrated that, feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis were associated with a specific change in the bacterial population.

# Monitoring rumen microbial changes during feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis in sheep

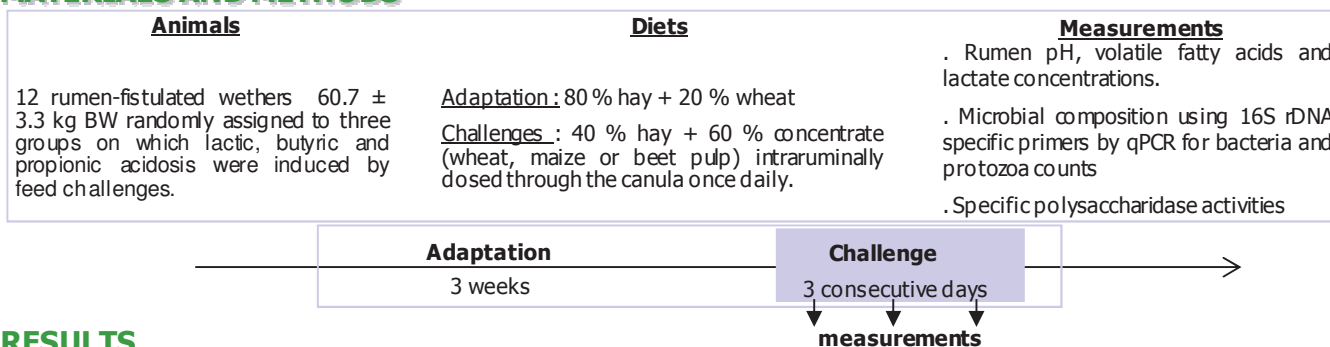
**A. Lettat** (1,2), P. Nozière (1), M. Silberberg (1), D. P. Morgavi (1), and C. Martin (1)  
 (1) INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France  
 (2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain, France



## INTRODUCTION

Ruminal acidosis is a common disorder observed when high-energy diets are fed to non adapted animals. We make a distinction between lactic acidosis for which the fermentation end product is lactate and subacute ruminal acidosis (SARA) where fermentations are unstable and variably oriented toward propionate or butyrate at the expense of acetate (Martin et al. 2006). We recently developed a sheep model of experimentally-induced lactic acidosis and butyric or propionic SARA (Lettat et al. 2010) and the aim of this present study was to describe the effects of different acidosis types on ruminal fermentations, enzymatic activities, cellulolytic and lactate producing bacteria as well as on the *Prevotella* genus.

## MATERIALS AND METHODS



## RESULTS

Effects of feed-induced ruminal acidosis on rumen fermentations, polysaccharidase activities and microbial composition in sheep 3h after acidosis induction.

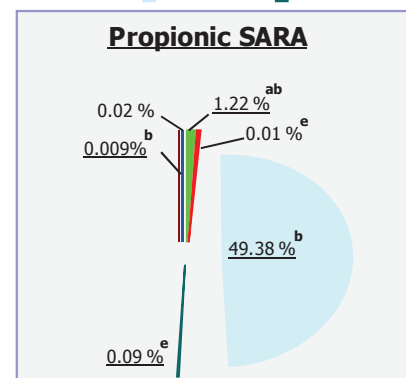
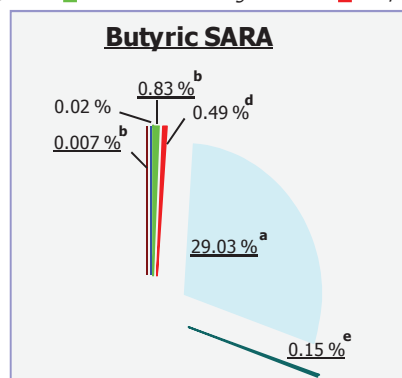
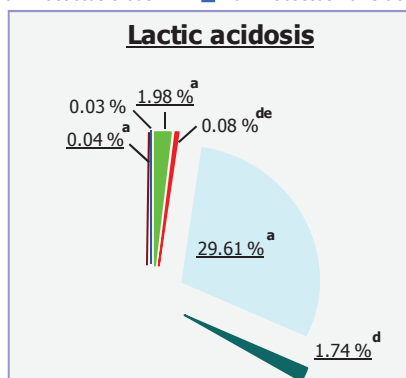
	Lactic acidosis	Butyric SARA	Propionic SARA	SEM
pH	5.05 <sup>d</sup>	5.35 <sup>de</sup>	5.44 <sup>e</sup>	0.17
Total VFA, mM	105.67	107.89	114.8	8.96
Acetate, %	71.28 <sup>a</sup>	61.48 <sup>b</sup>	66.36 <sup>ab</sup>	2.82
Propionate, %	14.13 <sup>a</sup>	17.92 <sup>b</sup>	22.47 <sup>c</sup>	1.48
Butyrate, %	11.84 <sup>a</sup>	17.31 <sup>b</sup>	9.46 <sup>a</sup>	1.54
Lactate, mM	23.46 <sup>a</sup>	5.13 <sup>b</sup>	5.36 <sup>b</sup>	6.36
Amylase*	15.32 <sup>a</sup>	7.06 <sup>b</sup>	0.29 <sup>c</sup>	2.30
Carboxymethylcellulase*	0.43	0.05	0.36	0.24
Xylanase*	0.47	0.03	0.53	0.58
Total bacteria x 10 <sup>12</sup> 16S rDNA copies / g DM	5.52 <sup>a</sup>	3.54 <sup>de</sup>	3.29 <sup>e</sup>	0.93
Protozoa x 10 <sup>5</sup> / mL	2.87	2.22	1.59	0.49

\* Enzymatic activities were expressed as μmol of reducing sugar / mg protein / hour; DM = dry matter

<sup>abc</sup> within a row, means that do not share a common superscript differ (P < 0.05)

<sup>ade</sup> within a row, means that do not share a common superscript differ (P < 0.15)

■ *Ruminococcus albus* ■ *Ruminococcus flavefaciens* ■ *Fibrobacter succinogenes* ■ *Streptococcus bovis* ■ *Prevotella* ■ *Lactobacilli*



The bacterial composition is expressed as % of total bacteria  
 a, b for P ≤ 0.05 and d, e for P ≤ 0.15 indicate significant effects among acidosis forms

## RESULTS and CONCLUSION

For lactic acidosis and butyric SARA situations, the fermentation patterns were associated with increased *Lactobacillus spp.* and *S. bovis* proportions respectively, as well as a rise in amylase activity for both. For propionic SARA, *Prevotella* genus represented near 50% of ruminal bacteria. Even if the pH conditions were more severe for lactic acidosis, total bacteria, *F. Succinogenes* and *R. albus* were more abundant compared to the butyric and propionic SARA.

**By this study, we show that each acidosis form is associated with a specific microbial and fermentation profile.**

#### 4. Communication n°4

Poster présenté lors de la 13<sup>e</sup> édition de l'International Symposium on Microbial Ecology (ISME-13) : *stewards of a changing planet*, 22-27 Août 2010, Seattle, USA.

### Monitoring rumen microbial changes during feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis in sheep

Ruminal acidosis is a recurrent problem in ruminant production systems. The prevailing fermentation acid is difficult to predict in practice and it is thought to be the reason for the variable effectiveness of some rumen modifiers. We developed a sheep model of experimentally-induced lactic, butyric or propionic acidosis to describe the associated changes in the rumen microbiota. Twelve rumen-cannulated sheep separated into 3 groups of 4 animals were fed a hay:concentrate diet (80:20) during 3 weeks followed by three consecutive days of acidosis challenge by direct intraruminal supply (1.2% BW) of ground wheat, corn or beet pulp. Rumen contents were analyzed for fermentation parameters (rumen pH, volatile fatty acids, lactate) and polysaccharidase activities (amylase, xylanase, and carboxymethylcellulase). Populations of *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, Lactobacilli, *Prevotella* and total bacteria were quantified by qPCR and protozoa were counted under photonic microscope.

At the end of the challenge, rumen pH was lower for wheat (4.87) than for corn (5.17) and beet pulp (5.55). Lactate was predominant for wheat (33.8 mM vs. ~3 mM for other challenges), whereas beet pulp and corn favored a high molar percentage of propionate (22.5%) and butyrate (16.9%), respectively. *R. albus* and *F. succinogenes* proportions were highest for wheat than corn and beet pulp while *R. flavefaciens* proportions and fibrolytic activities, total bacteria and protozoa were similar among treatments. Amylase activity was highest for wheat, intermediate for corn and lowest for beet pulp. Lactobacilli and *S. bovis* proportions tended to be highest for wheat (1.74 vs. ~0.12%; P = 0.15) and corn (0.49 vs. ~0.05%; P = 0.17) respectively, whereas *Prevotella* was highest for beet pulp (49 vs. ~29%). This study demonstrated that, feed-induced lactic, butyric or propionic acidosis were associated with specific changes in the bacterial population.

## L'efficacité des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose ruminale latente dépend des fermentations microbiennes ruminales



**A. Lettat** (1, 2), P. Nozière (1), M. Silberberg (1), D. P. Morgavi (1), C. Berger (3) et C. Martin (1)  
 (1) INRA, UR1213 Herbivores, Site de Theix, F-63122 Saint Genès Champanelle, France  
 (2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain, France  
 (3) Danisco France SAS, 20 rue Brunel, F-75017 Paris, France

### INTRODUCTION

L'acidose est une préoccupation majeure pour la nutrition des ruminants à haut potentiel de production. L'instabilité des fermentations microbiennes dans le rumen est une caractéristique de l'acidose latente qui pourrait être responsable des effets variables voire contradictoires des probiotiques utilisés pour prévenir cette pathologie. Nous émettons l'hypothèse que l'efficacité des probiotiques dépend de l'orientation des fermentations microbiennes ruminales. Pour tester cette hypothèse nous avons développé un modèle expérimental d'induction de l'acidose latente butyrique et propionique chez le mouton à l'entretien en utilisant comme glucides rapidement fermentescibles (GRF) du maïs et de la pulpe de betterave, respectivement (Lettat et al. 2010). Nous avons utilisé ce modèle pour évaluer, dans ces 2 situations, l'efficacité et les mécanismes d'action des bactéries probiotiques (BP) pour prévenir l'acidose ruminale latente.

### MATERIEL et METHODES

**Animaux** : 8 moutons castrés de race Texel (61±3 kg), canulés du rumen, aléatoirement répartis dans 2 groupes de 4

**Alimentation** : 80 % foin + 20 % blé pendant 3 semaines d'adaptation

**Challenges** : 40 % foin + 60 % GRF introduit dans le rumen par la canule (une fois par jour pendant 3 j)

GRF = maïs (groupe 1) ou pulpe de betterave (groupe 2)

**Schéma expérimental** : 2 carrés latin 4x4

**Traitements** :

**C** : contrôle (lactose)

**P63** : *Propionibacterium* P63

**Lp + P63** : *Lactobacillus plantarum* 115 plus P63

**Lr + P63** : *Lactobacillus rhamnosus* 32 plus P63

La dose utilisée était 10<sup>11</sup> UFC/animal / jour

### Mesures

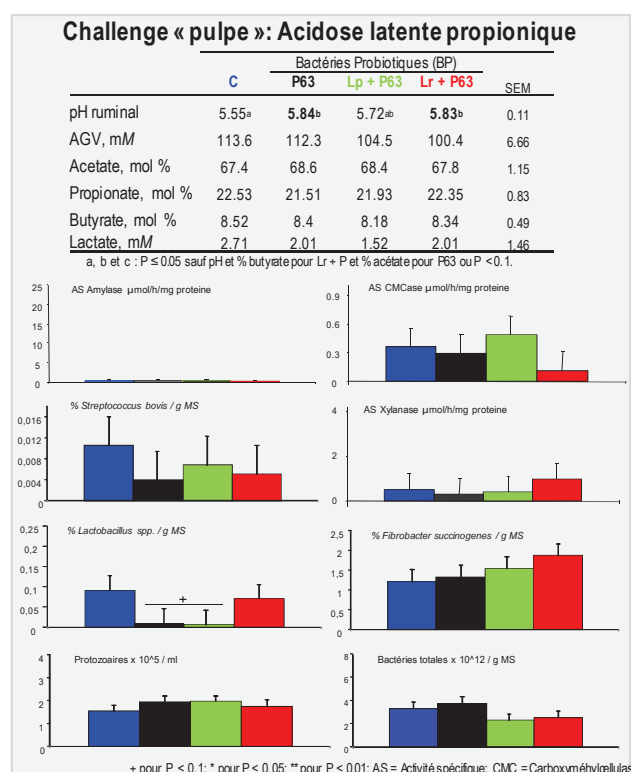
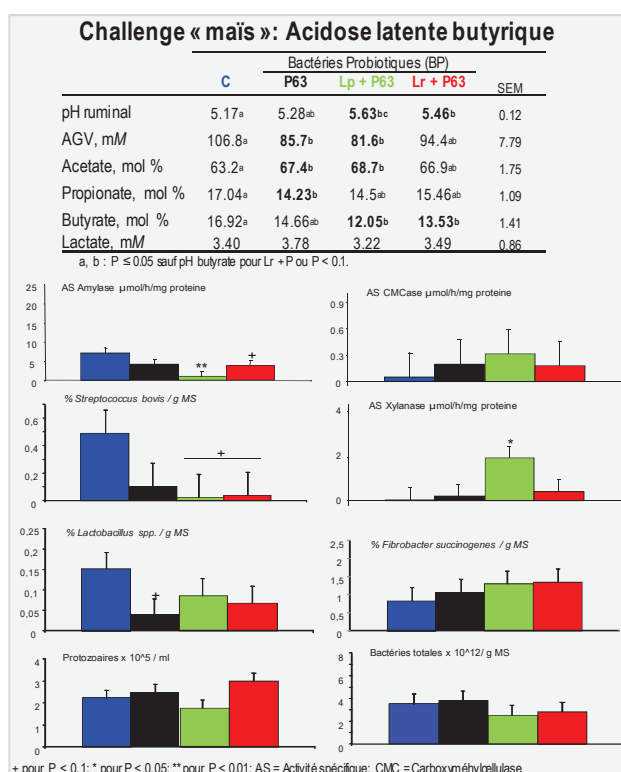
Sur du contenu ruminal total prélevé avant (-1h) et après induction de l'acidose par challenge (+3h et +6h)

• **Paramètres fermentaires** : pH, concentration en acides gras volatils (AGV) et en lactate

• **Paramètres microbiens** : densité (qPCR sur ADNr 16S) et activité des bactéries cellulolytiques et amylolytiques ; dénombrement des protozoaires.

Durant cet expérimentation la différence entre probiotiques n'étaient significatives que lors du troisième jour de challenge (J3), c'est pour cela que nous ne présenterons ici que les résultats postprandiaux à + 3h pour l'écosystème microbien et + 6h pour les fermentations ruminales.

### RESULTATS et CONCLUSION



• **Acidose latente butyrique** : Lp + P63 et Lr + P63 ont prévenu la chute du pH ruminal. L'association Lp + P63 est la plus efficace, l'amélioration du pH semble liée à une diminution des AGVT et une réorientation des fermentations vers l'acétate. La croissance et l'activité des bactéries amylolytiques ont été réduites et la cellulolyse a été améliorée sans modifier la densité des bactéries cellulolytiques. Aucun effet n'a été observé sur la densité des bactéries totales et des protozoaires.

• **Acidose latente propionique** : Le pH était plus élevé chez les animaux supplémentés avec les probiotiques P63 et Lr + P63. L'effet sur le pH ne peut être expliqué ici par des modifications des paramètres fermentaires et/ou microbiens.

➔ **L'efficacité et le mode d'action des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose latente dépendent des orientations fermentaires microbiennes dans le rumen.**

## 5. Communication n°5

Poster présenté lors des 17<sup>e</sup> Journées 3R : Rencontre autour des Recherches sur les Ruminants, 7-8 Décembre 2010, Paris, France.

### L'efficacité des bactéries probiotiques pour prévenir l'acidose ruminale dépend des fermentations microbiennes ruminales

#### Direct-fed microbials (DFM) mechanisms to minimize acidosis risk depends on ruminal fermentation patterns

LETTAT A. (1,2), NOZIERE P. (1), MORGAVI D.P. (1), SILBERBERG M. (1), BERGER C. (3) et MARTIN C. (1)  
(1) INRA UR1213 Herbivores, Theix, F-63122 St Genès Champanelle  
(2) Danisco France SAS, Zone d'Activités de Buxières, BP 10, F-86220 Dangé Saint Romain  
(3) Danisco France SAS, 20 rue Brunel, F-75017 Paris

#### INTRODUCTION

L'acidose est une préoccupation majeure pour la nutrition des ruminants à haut potentiel de production. L'instabilité des fermentations microbiennes dans le rumen caractéristique de l'acidose latente pourrait être responsable des effets variables voire contradictoires des probiotiques utilisés pour prévenir cette pathologie. Nous émettons l'hypothèse que l'efficacité des probiotiques dépend de l'orientation des fermentations microbiennes ruminales. Pour tester cette hypothèse nous avons développé un modèle expérimental d'induction de l'acidose latente butyrique et propionique chez le mouton à l'entretien (Lettat *et al.*, 2010) et évalué l'efficacité et les mécanismes d'action de bactéries probiotiques (BP) pour prévenir l'acidose ruminale.

#### 1. MATERIEL ET METHODES

Huit moutons castrés et canulés du rumen ont été répartis en 2 lots de 4 animaux chacun alimenté avec une ration constituée de 80% de foin + 20% de GRF pendant 3 semaines suivies d'une semaine de challenges acidogènes durant laquelle le repas du matin a été supprimé et remplacé par l'introduction directe dans le rumen de maïs ou de pulpe de betterave broyées à la grille de 3 mm (un substrat par lot à raison de 1.2% du poids vif de l'animal) pour orienter les fermentations microbiennes vers le butyrate et le propionate respectivement (Lettat *et al.*, 2010). Les animaux de chaque lot ont été

supplémentés ou non en bactéries probiotiques ( $10^{11}$  UFC/animal/jour) selon un carré latin  $4 \times 4$ . Les traitements étaient T (placebo à base de lactose), A (*Propionibacterium* + *Lactobacillus* A), B (*Propionibacterium*) et C (*Propionibacterium* + *Lactobacillus* C). Durant les 3 jours de challenge, des prélèvements de contenu ruminal ont été réalisés afin de déterminer les paramètres fermentaires (pH, acides gras volatils [AGV] et lactate) et microbiens correspondant à la densité des bactéries cellulolytiques et des bactéries productrices de lactate *S. bovis* et *Lactobacillus* par qPCR (Stevenson et Weimer 2007 ; Furet *et al.*, 2009) et à leur activité xylanase et amylase (Martin et Michalet-Doreau 1995).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les probiotiques testés ont été efficaces pour prévenir la chute de pH dans les 2 lots testés. Avec le lot maïs, cet effet sur le pH est relié à une diminution des AGV totaux et une réorientation des profils d'AGV vers l'acétate au détriment du propionate et du butyrate. Concernant les paramètres microbiens, les probiotiques utilisés ont réduit l'activité amylolytique et la proportion des bactéries productrices de lactate et amélioré l'activité fibrolytique sans modifier le nombre de bactéries cellulolytiques. (Tableau 1). Avec le lot pulpe de betterave, nous n'avons pas observé d'effets sur les AGV totaux, les profils d'AGV et les activités enzymatiques, mais la proportion de lactobacilles a diminué avec les probiotiques A et B.

	T	A	B	C	ES	
<b>Lot maïs</b>	pH	5.17	5.63 *	5.28	5.46 +	0.12
	AGV totaux	106.84	81.65 *	85.70 *	94.44	7.79
	% C2	63.16	68.66 *	67.43 +	66.91	1.75
	% C3	17.04	14.50	14.23 +	15.46	1.09
	% C4	16.92	12.05 *	14.66	13.53 +	1.41
	% <i>S. bovis</i>	0.491	0.023 +	0.106	0.039+	0.168
	% <i>lactobacilli</i>	0.152	0.086	0.036+	0.067	0.041
	AS amylase	7.06	1.06 *	4.20	3.81+	1.37
	AS xylanase	0.03	1.95 *	0.20	0.42	0.53
<b>Lot pulpe de betterave</b>	pH	5.55	5.72	5.84 *	5.83 +	0.11
	AGV totaux	113.56	104.51	112.28	100.36	6.66
	% C2	67.45	68.37	68.61	67.85	1.15
	% C3	22.53	21.93	21.51	22.35	0.83
	% C4	8.52	8.18	8.40	8.34	0.49
	% <i>S. bovis</i>	0.011	0.007	0.004	0.005	0.005
	% <i>lactobacilli</i>	0.092	0.008 +	0.011+	0.071	0.036
	AS amylase	0.29	0.32	0.3	0.24	0.22
	AS xylanase	0.53	0.38	0.29	0.96	0.73

\* pour  $P < 0.05$  et + pour  $P < 0.1$ . AS = activité spécifique en  $\mu\text{mol}$  de produit / h / mg de protéine. Bactérie exprimées en % de bactéries totales.

Tableau 1 : Effets des bactéries probiotiques sur les paramètres fermentaires et microbiens du rumen chez le mouton en situation d'acidose provoquée. ES = erreur standard.

## CONCLUSION

Ce travail a permis d'une part de valider la reproductibilité de notre modèle expérimental d'induction de l'acidose ruminale (Lettat *et al*, 2010), et d'autre part de confirmer notre hypothèse selon laquelle le mode d'action des bactéries probiotiques dépend des orientations fermentaires ruminales. Au vu de ces résultats ces probiotiques pourraient être efficaces pour prévenir l'acidose latente.

Les auteurs remercient Danisco SAS pour leur soutien financier, L. Genestoux et V. Chomiller pour leur aide technique et les animaliers de l'URH pour les soins apportés aux animaux.

## REFERENCES

- Furet, J.P. et al., 2009. *Microbiol. Ecol.*, 63,351-362.
- Lettat, A. et al., 2010. *J. Anim. Sci.* 88:3041-3046
- Martin, C. et Michalet-Doreau B., 1995. *J. Sci. Food Agric.*, 67,407-413
- Stevenson, D.M., et Weimer, P.J., 2007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75,165–174.





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Akopyants N.S., Fradkov A., Diatchenko L., Hill J.E., Siebert P.D., Lukyanov S.A., et al. (1998) PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95:13108-13113.
- Alonso L., Cuesta E.P., Gilliland S.E. (2003) Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. J. Dairy Sci. 86:1941-1946.
- Ametaj B., Zebeli Q., Saleem F., Psychogios N., Lewis M., Dunn S., et al. (2010) Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows. Metabolomics. 6:583-594. DOI: 10.1007/s11306-010-0227-6.
- Arthur T.M., Bosilevac J.M., Kalchayanand N., Wells J.E., Shackelford S.D., Wheeler T.L., et al. (2010) Evaluation of a direct-fed microbial product effect on the prevalence and load of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle. J. Food Prot. 73:366-71.
- Asanuma N., Hino T. (2005) Ability to utilize lactate and related enzymes of a ruminal bacterium, *Selenomonas ruminantium*. Anim. Sci. J. 76:345-352. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2005.00274.x.
- Bauer M.L., Herold D.W., Britton R.A., Stock R.A., Klopfenstein T.J., Yates D.A. (1995) Efficacy of laidlomycin propionate to reduce ruminal acidosis in cattle. J. Anim Sci. 73:3445-3454.
- Baveye P.C. (2009) To sequence or not to sequence the whole-soil metagenome? Nat. Rev. Micro. 7:756-756.
- Bayer S., Kunert A., Ballschmiter M., Greiner-Stoeffele T. (2010) Indication for a new lipolytic enzyme family: Isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 18:181-187.
- 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., Yang W.Z., Morgavi D.P., Ghorbani G.R., Kautz W., Leedle J.A. (2003) Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. J. Anim. Sci. 81:1628-40.
- Bekele A.Z., Koike S., Kobayashi Y. (2010) Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. FEMS Microbiol. Lett. 305:49-57. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.01911.x.
- Béra-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. J. Microbiol. Methods. 77:8-16.
- Berger C. (2010) Method for improving the digestibility and the assimilability of cereals and/or fibres in a monogastric herbivorous animal. US Patent 20,100,278,796.
- Bernardeau M., Vernoux J.P. (2009) Overview of the use of probiotics in the feed/food chain. In: Probiotics: Production, Evaluation and uses in animal feed. Research Signpost, Trivandrum, India, 15-45.
- Bernardeau M., Guguen M., Vernoux J.P. (2006) Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. FEMS Microbiol. Rev. 30:487-513. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x.
- Bevans D.W., Beauchemin K.A., Schwartzkopf-Genswein K.S., McKinnon J.J., McAllister T.A. (2005) Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. J. Anim Sci. 83:1116-1132.
- Blanch M., Calsamiglia S., DiLorenzo N., DiCostanzo A., Muetzel S., Wallace R.J. (2009) Physiological changes in rumen fermentation during acidosis induction and its control using a multivalent polyclonal antibody preparation in heifers. J. Anim Sci. 87:1722-1730. DOI: 10.2527/jas.2008-1184.
- Block E., Nocek J.E., Kautz W.P., Leedle J.A.Z. (2000) Direct fed microbial and anionic salt supplementation to dairy cows fed 21 days pre- to 70 days postpartum. J. Anim. Sci. 78(Suppl. 1):304.

- Boudra H., Karlshøj K., Frisvad J.C., Nielsen K.F., Larsen T.O. (non publié) Simple and fast methods for identification of key fungi involved in 1 human Aspergillosis.
- Boyaval P., Deborde C., Corre C., Blanco C., Bégué É. (1999) Stress and osmoprotection in propionibacteria. *Lait*. 79:59-69.
- Brashears M.M., Galyean M.L., Loneragan G.H., Mann J.E., Killinger-Mann K. (2003) Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and performance by beef feedlot cattle given *Lactobacillus* direct-fed microbials. *J. Food Prot.* 66:748-54.
- Brennerova M.V., Josefiova J., Brenner V., Pieper D.H., Junca H. (2009) Metagenomics reveals diversity and abundance of meta-cleavage pathways in microbial communities from soil highly contaminated with jet fuel under air-sparging bioremediation. *Environ. Microbiol.* 11:2216-2227. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01943.x.
- Brockman R.P. (1990) Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. *Br. J. Nutr.* 64:95-101. DOI: doi:10.1079/BJN19900012.
- Brossard L., Martin C., Chaucheyras-Durand F., Michalet-Doreau t.I.B. (2004) Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:195-206.
- Brossard L., Chaucheyras-Durand F., Michalet-Doreau B., Martin C. (2006) Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. *Anim. Sci.* 82:829-836. DOI: doi:10.1017/ASC200693.
- Brulc J.M., Antonopoulos D.A., Berg Miller M.E., Wilson M.K., Yannarell A.C., Dinsdale E.A., et al. (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:1948-1953. DOI: 10.1073/pnas.0806191105.
- Cai S., Li J., Hu F.Z., Zhang K., Luo Y., Janto B., et al. (2010) *Cellulosilyticum ruminicola*, a Newly Described Rumen Bacterium That Possesses Redundant Fibrolytic-Protein-Encoding Genes and Degrades Lignocellulose with Multiple Carbohydrate- Borne Fibrolytic Enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3818-3824. DOI: 10.1128/aem.03124-09.
- Cantalapiedra-Hijar G., Yanez-Ruiz D.R., Martin-Garcia A.I., Molina-Alcaide E. (2009) Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J. Anim Sci.* 87:622-631. DOI: 10.2527/jas.2008-1142.
- Chaucheyras-Durand F., Durand H. (2010) Probiotics in animal nutrition and health. *Beneficial Microbes.* 1:3-9.
- Chaucheyras-Durand F., Walker N.D., Bach A. (2008) Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5-26.
- Chen J., Weimer P.J. (2001) Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology.* 147:21-30.
- Chen J., Stevenson D.M., Weimer P.J. (2004) Albusin B, a bacteriocin from the ruminal bacterium *Ruminococcus albus* 7 that inhibits growth of *Ruminococcus flavefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3167-3170. DOI: 10.1128/aem.70.5.3167-3170.2004.
- Chin A.C., Flynn A.N., Fedwick J.P., Buret A.G. (2006) The role of caspase-3 in lipopolysaccharide-mediated disruption of intestinal epithelial tight junctions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84:1043-1050.
- Chiquette J. (2009) Evaluation of the protective effect of probiotics fed to dairy cows during a subacute ruminal acidosis challenge. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:278-291.
- Chiquette J., Allison M.J., Rasmussen M.A. (2008) *Prevotella bryantii* 25A used as a probiotic in early-lactation dairy cows: effect on ruminal fermentation characteristics, milk production, and milk composition. *J. Dairy Sci.* 91:3536-43. DOI: 91/9/3536 [pii]10.3168/jds.2007-0849.
- Chung Y.-H., Walker N.D., McGinn S.M., Beauchemin K.A. (2011) Differing effects of two active dried yeast (SC) strains on ruminal acidosis and methane production in non lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* (in press). *J. Dairy Sci.*

- Cobos M.A., de Coss A.L., Ramirez N.D., Gonzalez S.S., Ferrera Cerrato R. (2011) *Pediococcus acidilactici* isolated from the rumen of lambs with rumen acidosis, 16S rRNA identification and sensibility to monensin and lasalocid. *Res. Vet. Sci.* 90:26-30.
- Coe M.L., Nagaraja T.G., Sun Y.D., Wallace N., Towne E.G., Kemp K.E., et al. (1999) Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *J. Anim Sci.* 77:2259-2268.
- Collado M., Meriluoto J., Salminen S. (2008) Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226:1065-1073. DOI: 10.1007/s00217-007-0632-x.
- Collado M.C., Meriluoto J., Salminen S. (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett. Appl. Microbiol.* 45:454-460. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02212.x.
- Commun L., Mialon M.M., Martin C., Baumont R., Veissier I. (2009) Risk of subacute ruminal acidosis in sheep with separate access to forage and concentrate. *J. Anim Sci.*:jas.2009-1968. DOI: 10.2527/jas.2009-1968.
- Cotter D., Maer A., Guda C., Saunders B., Subramaniam S. LMPD: LIPID MAPS proteome database. *Nucleic Acids Res.* 34:D507-D510.
- Counotte G.H.M., Prins R.A., Janssen R.H.A.M., DEBie M.J.A. (1981) Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-13C]lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:649-655.
- Cousin F.J., Mater D.D.G., Foligne B., Jan G. (2010) Dairy propionibacteria as human probiotics: A review of recent evidence. *Dairy Sci. Technol.*
- Daniel C., Poiret S., Goudercourt D., Dennin V., Leyer G., Pot B. (2006) Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5799-5805. DOI: 10.1128/aem.00109-06.
- de Ondarza M.B., Seymour W.M. (2008) Case study: Effect of propionibacteria supplementation on yield of milk and milk components of dairy cows. *Professional Animal Scientist.* 24:254-259.
- de Vrese M., Marteau P.R. (2007) Probiotics and prebiotics: Effects on diarrhea. *J. Nutr.* 137:803S-811.
- Deborde C., Boyaval P. (2000) Interactions between pyruvate and lactate metabolism in *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*: In vivo 13C nuclear magnetic resonance studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2012-2020. DOI: 10.1128/aem.66.5.2012-2020.2000.
- Dennis S.M., Arambel M.J., Bartley E.E., Dayton A.D. (1983) Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci.* 66:1248-1254.
- Desnoyers M., Giger-Reverdin S., Bertin G., Duvaux-Ponter C., Sauvant D. (2009) Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620-1632.
- Desnoyers M., Morgavi D.P., Giger-Reverdin S., Bertin G., Jouany J.P., Martin C. (2008) Effect of live yeasts on rumen bacterial diversity in lactating goats fed a high concentrate diet. *Proc. Nutr. Soc.*
- Ding W.K., Shah N.P. (2007) Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J. Food Prot.* 72:M446-M450. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2007.00565.x.
- Doreau M., Ollier A., Michalet-Doreau B. (2001) An atypical case of ruminal fermentations leading to ketosis in early lactating cows. *Rev. Méd. Vét.* 152::301-306.
- Doreau M., Laverroux S., Normand J., Chesneau G., Glasser F. (2009) Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids.* 44:53-62. DOI: 10.1007/s11745-008-3250-x.
- Dragomir C., Sauvant D., Peyraud J.-L., Giger-Reverdin S., Michalet-Doreau B. (2008) Meta-analysis of 0 to 8 h post-prandial evolution of ruminal pH. *Animal.* 2:1437-1448. DOI: doi:10.1017/S1751731108002656.

- Duan C.J., Xian L., Zhao G.C., Feng Y., Pang H., Bai X.L., et al. (2009) Isolation and partial characterization of novel genes encoding acidic cellulases from metagenomes of buffalo rumens. *J. Appl. Microbiol.* 107:245-256. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04202.x.
- Duffield T., Plaizier J.C., Fairfield A., Bagg R., Vessie G., Dick P., et al. (2004) Comparison of Techniques for Measurement of Rumen pH in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87:59-66.
- 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. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00392.x.
- EFSA. (2009) EFSA, Scientific opinion of the panel on biological hazards on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food or feed, *EFSA Journal* 7 (12), pp. 1–93
- Elam N.A., Gleghorn J.F., Rivera J.D., Galyean M.L., Defoor P.J., Brashears M.M., et al. (2003) Effects of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (strains NP45 and NP51) and *Propionibacterium freudenreichii* on performance, carcass, and intestinal characteristics, and *Escherichia coli* strain O157 shedding of finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* 81:2686-2698.
- Emmanuel D.G.V., Dunn S.M., Ametaj B.N. (2008) Feeding high proportions of barley grain stimulates an inflammatory response in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:606-614.
- Enemark J.M., Jørgensen R.J. (2001) Subclinical rumen acidosis as a cause of reduced appetite in newly calved dairy cows in Denmark: results of a poll among Danish dairy practitioners. *Vet. Q.* 23:206-210.
- Enemark J.M.D. (2008) The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *Vet. J.* 176:32-43.
- 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 Prod. Sci.* 85:81-97.
- Fairfield A.M., Plaizier J.C., Duffield T.F., Lindinger M.I., Bagg R., Dick P., et al. (2007) Effects of Parturition Administration of a Monensin Controlled Release Capsule on Rumen pH, Feed Intake, and Milk Production of Transition Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:937-945.
- Falentin H., Deutsch S.-M., Jan G., Loux V., Thierry A., Parayre S., et al. (2010) The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1, a hardy *Actinobacterium* with food and probiotic applications. *PLoS One.* 5:e11748.
- Faubladier C., Jacotot E., Berger C., Julliand V. (2010) Effects of alive or heat treated lactic bacteria versus a placebo on faecal microbial communities and activities in horses. In : the impact of Nutrition on the Health and Welfare of horses. EAAP publication n°128. Eds AD Ellis, AC Longland, M Coenen, N Miraglia. 5th European Workshop on Equine Nutrition. Cirencester, UK, 19-22 September, pp 288-292.
- Fernando S.C., Purvis H.T., II, Najar F.Z., Sukharnikov L.O., Krehbiel C.R., Nagaraja T.G., et al. (2010) Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.*:AEM.00388-10. DOI: 10.1128/aem.00388-10.
- Ferrer M., Beloqui A., Timmis K.N., Golyshin P.N. (2009) Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16:109-123.
- Ferrer M., Beloqui A., Golyshina O.V., Plou F.J., Neef A., Chernikova T.N., et al. (2007) Biochemical and structural features of a novel cyclodextrinase from cow rumen metagenome. *Biotechnol. J.* 2:207-213. DOI: 10.1002/biot.200600183.
- Foligne B., Zoumpopoulou G., Dewulf J., Ben Younes A., Chareyre F., Sirard J.-C., et al. (2007) A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One.* 2:e313.
- Fonty G., Chaucheyras-Durand F. (2007) Les écosystèmes digestifs. Lavoisier (ed), Paris, France.
- Fonty G., Jouany J.-P., Forano E., Gouet P. (1995) L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In : Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.H., Journet M. (ed) : Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion. INRA, Paris, pp 299-347.
- Forsberg C.W., Lam K. (1977) Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:528-537.



- Francisco C.C., Chamberlain C.S., Waldner D.N., Wettemann R.P., Spicer L.J. (2002) Propionibacteria fed to dairy cows: effects on energy balance, plasma metabolites and hormones, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 85:1738-51.
- Franzolin R., Dehority B.A. (1996) Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.* 74:2803-2809.
- 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. *Environ. Microbiol.* 4:634-43. DOI: 358 [pii].
- Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-78.
- Galbraith E.A., Antonopoulos D.A., White B.A. (2004) Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. *Environ. Microbiol.* 6:928-937. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2004.00575.x.
- Garner M.R., Flint J.F., Russell J.B. (2002) *Allisonella histaminiformans* gen. nov., sp. nov.: A novel bacterium that produces histamine, utilizes histidine as its sole energy source, and could play a role in bovine and equine laminitis. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:498-506.
- Garrett E.F., Nordlund K.V., Goodger W.J., Oetzel G.R. (1997) A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80 (Suppl.1):p. 169.
- German J.B., Hammock B.D., Watkins S.M. (2005) Metabolomics: building on a century of biochemistry to guide human health. *Metabolomics.* 1:3-9. DOI: 10.1007/s11306-005-1102-8.
- Ghorbani G.R., Morgavi D.P., Beauchemin K.A., Leedle J.A. (2002) Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 80:1977-85.
- Giger-Reverdin S., Sauvant D., Tessier J., Bertin G., Morand-Fehr P. (2004) Effect of live yeast culture supplementation on rumen fermentation in lactating dairy goats. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 34:59-61.
- Gill S.R., Pop M., DeBoy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., et al. (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 312:1355-1359.
- Goachet A.G., Berger C., Julliand V. (2010) Effect of a new live lactic bacteria as a probiotic on organic matter and cell-walls digestibility in competing endurance horses. In : the impact of Nutrition on the Health and Welfare of horses. EAAP publication n°128. Eds AD Ellis, AC Longland, M Coenen, N Miraglia. 5th European Workshop on Equine Nutrition. Cirencester, UK, 19-22 September, pp 319-322.
- Goad D.W., Goad C.L., Nagaraja T.G. (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76:234-241.
- Gomez-Basauri J., de Ondarza M.B., Siciliano-Jones J. (2001) Intake and milk production of dairy cows fed lactic acid bacteria and mannanoligosaccharide. *J. Dairy Sci.* 84(Suppl. 1):283.
- Gozho G.N., Krause D.O., Plaizier J.C. (2006) Ruminal lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. *J. Dairy Sci.* 89:4404-4413.
- Gozho G.N., Krause D.O., Plaizier J.C. (2007) Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:856-866.
- Gozho G.N., Plaizier J.C., Krause D.O., Kennedy A.D., Wittenberg K.M. (2005) Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J. Dairy Sci.* 88:1399-1403.
- Grubb J.A., Dehority B.A. (1975) Effects of an Abrupt Change in Ration from All Roughage to High Concentrate upon Rumen Microbial Numbers in Sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 30:404-412.
- 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. *Lett. Appl. Microbiol.* 47:421-426. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02459.x.

- Hagg F.M., Erasmus L.J., Henning P.H., Coertze R.J. (2010) The effect of a direct fed microbial (*Megasphaera elsdenii*) on the productivity and health of Holstein cows. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 40:101-112.
- Harmon D.L., Britton R.A., Prior R.L., Stock R.A. (1985) Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed a 70% concentrate diet *ad libitum*. *J. Anim. Sci.* 60:560-569.
- Hino T., Kuroda S. (1993) Presence of lactate dehydrogenase and lactate racemase in *Megasphaera elsdenii* grown on glucose or lactate. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:255-259.
- Hino T., Shimada K., Maruyama T. (1994) Substrate Preference in a Strain of *Megasphaera elsdenii*, a Ruminant Bacterium, and Its Implications in Propionate Production and Growth Competition. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1827-1831.
- Hristov A.N., Ivan M., Rode L.M., McAllister T.A. (2001) Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79:515-524.
- Huang Y., Kotula L., Adams M.C. (2003) The *in vivo* assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, in a male Wistar rat model. *Food Chem. Toxicol.* 41:1781-1787.
- INRA. (2007) Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux - Valeurs des aliments. Tables INRA, Versailles, France.
- Jan G., Leverrier P., Pichereau V., Boyaval P. (2001) Changes in Protein Synthesis and Morphology during Acid Adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2029-2036. DOI: 10.1128/aem.67.5.2029-2036.2001.
- Jaquette R.D., Dennis R.J., Coalson J.A., Ware D.R., Manfredi E.T., Read P.L. (1988) Effect of feeding viable *Lactobacillus acidophilus* (BT1386) on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71(Suppl. 1):219.
- Johnson K.A., Westberg H.H., Michal J.J., Cossalman M.W. (2007) The SF6 tracer technique: Methane measurement from ruminants, in: H. P. S. Makkar and P. E. Vercoe (Eds.), *Measuring Methane Production From Ruminants*, Springer Netherlands. pp. 33-67.
- Jones S., Lennon J. (2009) Evidence for limited microbial transfer of methane in a planktonic food web. *Aquat. Microb. Ecol.* 58:45-53. DOI: 10.3354/ame01349.
- Kang S., Denman S., Morrison M., Yu Z., McSweeney C. (2009) An efficient RNA extraction method for estimating gut microbial diversity by polymerase chain reaction. *Curr. Microbiol.* 58:464-471. DOI: 10.1007/s00284-008-9345-z.
- 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. *J. Anim. Sci.* 81:812-815.
- Khafipour E., Krause D.O., Plaizier J.C. (2009a) A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J. Dairy Sci.* 92:1060-1070.
- Khafipour E., Krause D.O., Plaizier J.C. (2009b) Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *J. Dairy Sci.* 92:1712-1724.
- Khafipour E., Li S., Plaizier J.C., Krause D.O. (2009c) Rumen Microbiome Composition Determined Using Two Nutritional Models of Subacute Ruminal Acidosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7115-7124. DOI: 10.1128/aem.00739-09.
- Khafipour E., Plaizier J.C., Aikman P.C., Krause D.O. (2011) Population structure of rumen *Escherichia coli* associated with subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94:351-360.
- Kim Y.G., Lee T.H., Park T.J., Park H.S., Lee S.H. (2009) Identification of dominant microbial community in aerophilic biofilm reactors by fluorescence *in situ* hybridization and PCR-



- denaturing gradient gel electrophoresis. Korean J. Chem. Eng. 26:685-690. DOI: 10.1007/s11814-009-0114-x.
- Kishino S., Ogawa J., Ando A., Iwashita T., Fujita T., Kawashima H., et al. (2003) Structural analysis of conjugated linoleic acid produced by *Lactobacillus plantarum*, and factors affecting isomer production. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:179-182.
- Kleen J.L., Hooijer G.A., Rehage J., Noordhuizen J.P.T.M. (2003) Subacute ruminal acidosis (SARA): A review. J. Vet. Med. A. 50:406-414. DOI: 10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x.
- Kleen J.L., Hooijer G.A., Rehage J., Noordhuizen J.P.T.M. (2009) Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds. Vet. Rec. 164:681-684. DOI: 10.1136/vr.164.22.681.
- Kleerebezem M., Vaughan E.E. (2009) Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: Molecular approaches to study diversity and activity. Annu. Rev. Microbiol. 63:269-290. DOI: doi:10.1146/annurev.micro.091208.073341.
- Klieve A., Hennessy D., Ouwerkerk D., Forster R., Mackie R., Attwood G. (2003) Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrisolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. J. Appl. Microbiol. 95:621-630. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02024.x.
- Komari R.K., Reddy Y.K.L., Suresh J., Raj D.N. (1999) Effect of feeding yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and *Lactobacillus acidophilus* on production performance of crossbred dairy cows. J. Dairy Sci. 82(Suppl. 1):128.
- Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E., et al. GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. Bioinformatics 21:1635-1638.
- Krajcarski-Hunt H., Plaizier J.C., Walton J.P., Spratt R., McBride B.W. (2002) Short communication: Effect of subacute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 85:570-573.
- Krause D.O., Smith W.J.M., Conlan L.L., Gough J.M., Anna Williamson M., McSweeney C.S. (2003) Diet influences the ecology of lactic acid bacteria and *Escherichia coli* along the digestive tract of cattle: neural networks and 16S rDNA. Microbiology. 149:57-65. DOI: 10.1099/mic.0.25685-0.
- Krause K.M., Dhuyvetter D.V., Oetzel G.R. (2009) Effect of a low-moisture buffer block on ruminal pH in lactating dairy cattle induced with subacute ruminal acidosis. J. Dairy Sci. 92:352-364.
- Kung L., Jr, Hession A.O. (1995) Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. J. Anim. Sci. 73:250-256.
- Lan A., Bruneau A., Philippe C., Rochet V., Rouault A., Hervé C., et al. (2007) Survival and metabolic activity of selected strains of *Propionibacterium freudenreichii* in the gastrointestinal tract of human microbiota-associated rats. Br. J. Nutr. 97:714-724. DOI: doi:10.1017/S0007114507433001.
- Larue R., Yu Z., Parisi V.A., Egan A.R., Morrison M. (2005) Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. Environ. Microbiol. 7:530-543. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2005.00721.x.
- Le Ruyet P., Tucker W.B. (1992) Ruminal buffers: Temporal effects on buffering capacity and pH of ruminal fluid from cows fed a high concentrate diet. J. Dairy Sci. 75:1069-1077.
- Lechartier C. (2010) Equilibre de la ration et acidose ruminale chez la vache laitière : rôle des éléments dégradables et de la fibre physique. Thèse de l'Ecole Doctorale VAS, AGROCAMPUS OUEST, Rennes, 159pp.
- Lehloenya K.V., Krehbiel C.R., Mertz K.J., Rehberger T.G., Spicer L.J. (2008a) Effects of propionibacteria and yeast culture fed to steers on nutrient intake and site and extent of digestion. J. Dairy Sci. 91:653-662.
- Lehloenya K.V., Stein D.R., Allen D.T., Selk G.E., Jones D.A., Aleman M.M., et al. (2008b) Effects of feeding yeast and propionibacteria to dairy cows on milk yield and components, and

- reproduction. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92:190-202. DOI: JPN726 [pii]10.1111/j.1439-0396.2007.00726.x.
- Lema M., Williams L., Rao D.R. (2001) Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Rumin. Res.* 39:31-39.
- Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Berger C., Martin C. (2010) Experimental feed induction of ruminal lactic, propionic, or butyric acidosis in sheep. *J. Anim. Sci.* 88:3041-3046. DOI: 10.2527/jas.2010-2926.
- Lettat A., Nozière P., Silberberg M., Morgavi D.P., Berger C., Martin C. (2011) Direct-fed microbials minimize subacute ruminal acidosis but not lactic acidosis in sheep. *J. Anim. Sci.* (soumis)
- Leuschner R.G.K., Robinson T.P., Hugas M., Cocconcelli P.S., Richard-Forget F., Klein G., et al. (2010) Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends Food Sci. Technol.* 21:425-435.
- Lever M. (1977) Carbohydrate determination with 4-hydroxybenzoic acid hydrazide (PAHBAH): Effect of bismuth on the reaction. *Anal. Biochem.* 81:21-27.
- Leverrier P., Fremont Y., Rouault A., Boyaval P., Jan G. (2005) In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices. *Food Microbiol.* 22:11-18.
- Lilly D.M., Stillwell R.H. (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 147:747-748. DOI: 10.1126/science.147.3659.747.
- Lin X. (2009) Evaluation of Kahne rumen sensors in fistulated sheep and cattle under contrasting feeding conditions: A thesis presented in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Agriculture at Massey University, Palmerstone North, New Zealand. 131 pp. .
- Loncke C., Ortigues-Marty I., Vernet J., Lapierre H., Sauvant D., Nozière P. (2009) Empirical prediction of net portal appearance of volatile fatty acids, glucose, and their secondary metabolites ( $\beta$ -hydroxybutyrate, lactate) from dietary characteristics in ruminants: A meta-analysis approach. *J. Anim. Sci.* 87:253-268. DOI: 10.2527/jas.2008-0939.
- Mackie R.I., Gilchrist F.M.C. (1979) Changes in Lactate-Producing and Lactate-Utilizing Bacteria in Relation to pH in the Rumen of Sheep During Stepwise Adaptation to a High-Concentrate Diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:422-430.
- 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. Agri. Sci.* 90:241-254. DOI: doi:10.1017/S0021859600055313.
- Macouzet M., Lee B.H., Robert N. (2009) Production of conjugated linoleic acid by probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5. *J. Appl. Microbiol.* 106:1886-1891. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04164.x.
- Manome A., Okada S., Uchimura T., Komagata K. (1998) The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44:371-374.
- Mantovani A., Maranghi F., Purificato I., Macrì A. (2006) Assessment of feed additives and contaminants: an essential component of food safety *Ann. Ist. Super. Sanita.* 42:427-32.
- Marden J.P., Julien C., Monteils V., Auclair E., Moncoulon R., Bayourthe C. (2008) How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *J. Dairy Sci.* 91:3528-3535.
- Marounek M., Fliegrova K., Bartos S. (1989) Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1570-1573.
- Martin C., Michalet-Doreau B. (1995) Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. *J. Sci. Food Agric.* 67:407-413. DOI: 10.1002/jsfa.2740670319.
- Martin C., Philippeau C., Michalet-Doreau B. (1999a) Effect of wheat and corn variety on fiber digestion in beef steers fed high-grain diets. *J. Anim. Sci.* 77:2269-2278.

- Martin C., Devillard E., Michalet-Doreau B. (1999b) Influence of sampling site on concentrations and carbohydrate-degrading enzyme activities of protozoa and bacteria in the rumen. *J. Anim. Sci.* 77:979-987.
- Martin C., Fonty G., Michalet-Doreau B. (2002) Factors affecting the fibrolytic activity of the digestive microbial ecosystems in ruminants. In: *Gastrointestinal microbiology in animals*. S.A. Martin (Ed). Research Signpost, Trivandrum, India, 1-17.
- Martin C., Brossard L., Doreau M. (2006) Mécanismes d'apparition de l'acidose ruminale latente et conséquences physiopathologiques et zootechniques. *INRA Prod. Anim.* 19:93-108.
- Martin C., Morgavi D.P., Doreau M. (2010) Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*. 4:351-365. DOI: doi:10.1017/S1751731109990620.
- Martin C., Millet L., Fonty G., Michalet-Doreau B. (2001) Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:413-424.
- 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.* 86:2642-2650. DOI: 10.2527/jas.2007-0774.
- Mathieu F., Jouany J., Sénaud J., Bohatier J., Bertin G., Mercier M. (1996) The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on fermentations in the rumen of faunated and defaunated sheep; protozoal and probiotic interactions. *Reprod. Nutr. Dev.* 36:271-287.
- McGinn S.M., Beauchemin K.A., Coates T., Colombatto D. (2004) Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82:3346-3356.
- McIntosh F.M., Shingfield K.J., Devillard E., Russell W.R., Wallace R.J. (2009) Mechanism of conjugated linoleic acid and vaccenic acid formation in human faecal suspensions and pure cultures of intestinal bacteria. *Microbiology*. 155:285-294. DOI: 10.1099/mic.0.022921-0.
- Meile L., Le Blay G., Thierry A. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.* 126:316-320.
- Michalet-Doreau B., Fernandez I., Fonty G. (2002) A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *J. Anim. Sci.* 80:790-796.
- Moco S., Bino R.J., Vorst O., Verhoeven H.A., de Groot J., van Beek T.A., et al. (2006) A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.* 141:1205-1218. DOI: 10.1104/pp.106.078428.
- Morgavi D.P., Jouany J.-P., Martin C. (2008) Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Aus. J. Experim. Agric.* 48:69-72. DOI: doi:10.1071/EA07236.
- Morgavi D.P., Forano E., Martin C., Newbold C.J. (2010) Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*. 4:1024-1036. DOI: doi:10.1017/S1751731110000546.
- Mosoni P., Fonty G., Gouet P. (1997) Competition between ruminal cellulolytic bacteria for adhesion to cellulose. *Curr. Microbiol.* 35:44-47. DOI: 10.1007/s002849900209.
- 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. *J. Appl. Microbiol.* 103:2676-2685. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03517.x.
- Mouriño F., Akkarawongsa R., Weimer P.J. (2001) Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 84:848-859.
- Mrázek J., Tepšič K., Avguštin G., Kopečný J. (2006) Diet-dependent shifts in ruminal butyrate-producing bacteria. *Folia Microbiol.* 51:294-298. DOI: 10.1007/bf02931817.

- Muenger A., Brand D., Arrigo Y., Dohme F. (2010) Influence d'un fourrage riche en glucides solubles sur la fermentation ruminale et le comportement masticatoire chez la vache laitière. *Renc. Rech. Rum.* 17:326.
- Mwenya B., Santoso B., Sar C., Gamo Y., Kobayashi T., Arai I., et al. (2004) Effects of including [beta]1-4 galacto-oligosaccharides, lactic acid bacteria or yeast culture on methanogenesis as well as energy and nitrogen metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:313-326.
- Nagaraja T.G., Titgemeyer E.C. (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90:E17-E38.
- Nocek J.E. (1997) Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80:1005-1028.
- Nocek J.E., Kautz W.P. (2006) Direct-fed microbial supplementation on ruminal digestion, health, and performance of pre- and postpartum dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:260-266.
- Nocek J.E., Kautz W.P., Leedle J.A.Z., Allman J.G. (2002) Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:429-433.
- Nocek J.E., Kautz W.P., Leedle J.A.Z., Block E. (2003) Direct-fed microbial supplementation on the performance of dairy cattle during the transition period. *J. Dairy Sci.* 86:331-335.
- 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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:49-66.
- Nozière P., Michalet-Doreau B. (1997) Effects of amount and availability of starch on amylolytic activity of ruminal solid-associated microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* 73:471-476. DOI: 10.1002/(sici)1097-0010(199704)73:4<471::aid-jsfa754>3.0.co;2-c.
- Nozière P., Glasser F., Sauvant D. (2010) In vivo production and molar percentages of volatile fatty acids in the rumen: a quantitative review by an empirical approach. *Animal. FirstView*:1-12. DOI: doi:10.1017/S1751731110002016.
- Nozière P., Besle J.M., Martin C., Michalet-Doreau B. (1996) Effect of barley supplement on microbial fibrolytic enzyme activities and cell wall degradation rate in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 72:235-242. DOI: 10.1002/(sici)1097-0010(199610)72:2<235::aid-jsfa647>3.0.co;2-y.
- O'Grady L., Doherty M.L., Mulligan F.J. (2008) Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows. *The Veterinary Journal* 176:44-49.
- Odenyo A.A., Mackie R.I., Stahl D.A., White B.A. (1994) The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: development of probes for *Ruminococcus* species and evidence for bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3688-3696.
- Oetzel G.R. (2000) Clinical aspects of ruminal acidosis in dairy cattle. 33rd Annual Conference, American Association of Bovine Practitioners, Rapid City, South Dakota, USA, September 21-23, 2000. 14 pages.
- Oetzel G.R. (2004) Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 20:651-674.
- Offner A., Sauvant D. (2004) Comparative evaluation of the Molly, CNCPS, and LES rumen models. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112:107-130.
- Olumeyan D.B., Nagaraja T.G., Miller G.W., Frey R.A., Boyer J.E. (1986) Rumen microbial changes in cattle fed diets with or without salinomycin. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:340-345.
- Ouwehand A., Salminen S., Isolauri E. (2002a) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:279-289. DOI: 10.1023/a:1020620607611.
- Ouwehand A.C., Suomalainen T., Tölkö S., Salminen S. (2002b) In vitro adhesion of propionic acid bacteria to human intestinal mucus. *Lait.* 82:123-130.
- 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. *Curr. Microbiol.* 52:158-162. DOI: 10.1007/s00284-005-0266-9.
- Paineau D., Carcano D., Leyer G., Darquy S., Alyanakian M.-A., Simoneau G., et al. (2008) Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53:107-113. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2008.00413.x.
- Park G., Oh H., Ahn S. (2009) Improvement of the ammonia analysis by the phenate method in water and wastewater. *Bull. Korean Chem. Soc.* 30:2032-2038.
- Parrott T.D., Rehberger T.G., Owens F.N. (2001) Selection of Propionibacterium strains capable of utilizing lactic acid from in vitro models. *J. Anim. Sci. (Supplement 1)*, pp. 79-80.
- Penner G.B., Aschenbach J.R., Gabel G., Oba M. (2009) Technical note: Evaluation of a continuous ruminal pH measurement system for use in noncannulated small ruminants. *J. Anim. Sci.* 87:2363-2366. DOI: 10.2527/jas.2008-1665.
- Pérez Chaia A., Zarate G., Oliver G. (1999) The probiotic properties of propionibacteria. *Lait.* 79:175-185.
- Perry A.L., Lambert P.A. (2006) *Propionibacterium acnes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:185-188. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01866.x.
- Peterson R.E., Klopfenstein T.J., Erickson G.E., Folmer J., Hinkley S., Moxley R.A., et al. (2007) Effect of *Lactobacillus acidophilus* strain NP51 on *Escherichia coli* O157:H7 fecal shedding and finishing performance in beef feedlot cattle. *J. Food Prot.* 70:287-291.
- Peyraud J.L., Apper-Bossard E. (2006) L'acidose latente chez la vache laitière. *INRA Prod. Anim.* 19:79-92.
- Pierce J., Suelter C.H. (1977) An evaluation of the Coomassie brilliant blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Anal. Biochem.* 81:478-480.
- Pinares-Patiño C.S., Ulyatt M.J., Lassey K.R., Barry T.N., Holmes C.W. (2003) Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *J. Agri. Sci.* 140:205-214. DOI: doi:10.1017/S0021859603003046.
- Pinares-Patiño C.S., Waghorn G.C., Machmüller A., Vlaming B., Molano G., Cavanagh A., et al. (2007) Methane emissions and digestive physiology of non-lactating dairy cows fed pasture forage. *Can. J. Anim. Sci.* 87:601-613.
- Piveteau P. (1999) Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait.* 79:23-41.
- Plaizier J.C., Krause D.O., Gozho G.N., McBride B.W. (2008) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176:21-31.
- Popova M., Martin C., Morgavi D. (2010) Improved protocol for high-quality co-extraction of DNA and RNA from rumen digesta. *Folia Microbiologica* 55:368-372. DOI: 10.1007/s12223-010-0060-3.
- 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 *Anim. Feed Sci. Technol.*:in press.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 464:59-65.
- Raeth-Knight M.L., Linn J.G., Jung H.G. (2007) Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1802-9. DOI: 90/4/1802 [pii]10.3168/jds.2006-643.
- Rainio A., Vahvaselkä M., Suomalainen T., Laakso S. (2002) Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* ssp. shermanii. *Lait.* 82:91-101.
- Rehberger T.G. (1999) Biological poultry litter treatment composition and its use. US Patent 5,945,333.
- Rehberger T.G., Parrott T.D., Owens F.C., Hibberd C.A. (2002) Propionibacterium P-63 for use in direct fed microbials for animal feeds. US Patent 6,455,063.

- Russell J.B., Baldwin R.L. (1978) Substrate Preferences in Rumen Bacteria: Evidence of Catabolite Regulatory Mechanisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:319-329.
- Russell J.B., Chow J.M. (1993) Another theory for the action of ruminal buffer salts: Decreased starch fermentation and propionate production. *J. Dairy Sci.* 76:826-830.
- Rust S.R., Metz K., Ware D.R. (2000) Effects of Bovamine™ rumen culture on the performance and carcass characteristics of feedlot steers. *Mich. Agric. Exp. Sta. Beef Cattle, Sheep, and Forage Sys. Res. Dem. Rep.* 581:22-26.
- Sanchez B., Arias S., Chaignepain S., Denayrolles M., Schmitter J.M., Bressollier P., et al. (2009) Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology.* 155:1708-1716. DOI: 10.1099/mic.0.025288-0.
- Sanz-Penella J.M., Tamayo-Ramos J.A., Sanz Y., Haros M. (2009) Phytate Reduction in Bran-Enriched Bread by Phytase-Producing Bifidobacteria. *J. Agri. Food Chem.* 57:10239-10244. DOI: 10.1021/jf9023678.
- Sauvant D., Peyraud J.L. (2010) Calculs de ration et évaluation du risque acidogène. *INRA Prod. Anim.* 23:333-342.
- Sauvant D., Meschy F., Mertens D. (1999) Components of ruminal acidosis and acidogenic effects of diets. *INRA Prod. Anim.* 12:49-60.
- Sauvant D., Giger-Reverdin S., Schmidely P. (2004) Rumen acidosis: modeling ruminant response to yeast culture. *Alltech's 20th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry. Re-imagining the feed industry.* Ed. T. P. Lyons et K. A. Jacques, Nottingham University Press : 221-229.
- Sauvant D., Giger-Reverdin S., Meschy F. (2006) Le contrôle de l'acidose ruminale latente. *INRA Prod. Anim.* 19:69-78.
- Schneider K., Mertz D., Mertz K., Breunig R. (2009) Estimation of herd level risk of subacute ruminal acidosis on four commercial dairies on the Priority P-One Program. *J. Anim. Sci.* Vol. 87, E-Suppl. 2 / *J. Dairy Sci.* Vol. 92, E-Suppl. 1. Presented at the 2009 ADSA Meeting in Montreal, Canada.
- Sharp R., Hazlewood G., Gilbert H., O'Donnell A. (1994) Unmodified and recombinant strains of *Lactobacillus plantarum* are rapidly lost from the rumen by protozoal predation. *J. Appl. Microbiol.* 76:110-117. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01605.x.
- Shi Y., Odt C., Weimer P. (1997) Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:734-742.
- Silberberg M., Chaucheyras-Durand F., Commun L., Morgavi D.P., Martin C. (2008) Repeated ruminal acidogenic challenge in sheep, effects on pH and microbial ecosystem influence of a yeast feed additive. *Renc. Rech. Rum.* 15:208.
- Smith A.H., Mackie R.I. (2004) Effect of Condensed Tannins on Bacterial Diversity and Metabolic Activity in the Rat Gastrointestinal Tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1104-1115. DOI: 10.1128/aem.70.2.1104-1115.2004.
- Smith C.A., Maille G.O., Want E.J., Qin C., Trauger S.A., Brandon T.R., et al. (2005) METLIN: A metabolite mass spectral database. *Therapeutic Drug Monitor.* 27:747-751.
- Stein D.R., Allen D.T., Perry E.B., Bruner J.C., Gates K.W., Rehberger T.G., et al. (2006) Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 89:111-25. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302.061111 [pii].
- Stephens T.P., Loneragan G.H., Karunasena E., Brashears M.M. (2007a) Reduction of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial. *J. Food Prot.* 70:2386-91.
- Stephens T.P., Loneragan G.H., Chichester L.M., Brashears M.M. (2007b) Prevalence and enumeration of *Escherichia coli* O157 in steers receiving various strains of *Lactobacillus*-based direct-fed microbials. *J Food Prot* 70:1252-5.

- Stephens T.P., Stanford K., Rode L.M., Booker C.W., Vogstad A.R., Schunicht O.C., et al. (2010) Effect of a direct-fed microbial on animal performance, carcass characteristics and the shedding of *Escherichia coli* O157 by feedlot cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158:65-72.
- Stevenson D.M., Weimer P.J. (2007) Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:165-174. DOI: 10.1007/s00253-006-0802-y.
- Stone W.C. (1999) The effect of subclinical acidosis on milk components. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Cornell Univ., Ithaca, NY, pp. 40–46.
- Straus D., Ausubel F.M. (1990) Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1889-1893.
- Sun Y.Z., Mao S.Y., Zhu W.Y. (2010) Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Animal.* 4:210-217. DOI: doi:10.1017/S175173110999111X.
- Swinney-Floyd D., Gardner B.A., Owens F.N., Rehberger T.G., Parrott T.D. (1999) Effects of inoculation with either *Propionibacterium* strain P-63 alone or combined with *Lactobacillus acidophilus* strain LA53545 on performance of feedlot cattle, *J. Anim. Sci.* 77 (Suppl. 1), pp. 77–78.
- Tabé E.S., Oloya J., Doetkott D.K., Bauer M.L., Gibbs P.S., Khaitsa M.L. (2008) Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in naturally infected feedlot cattle. *J. Food Prot.* 71:539-44.
- Tailliez P. (2004) Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques.* 6:35-41.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2766-2774. DOI: 10.1128/aem.67.6.2766-2774.2001.
- Tajima K., Arai S., Ogata K., Nagamine T., Matsui H., Nakamura M., et al. (2000) Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe.* 6:273-284.
- Timmerman H.M., Mulder L., Everts H., van Espen D.C., van der Wal E., Klaassen G., et al. (2005) Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88:2154-2165.
- Towne G., Nagaraja T.G., Brandt R.T., Jr, Kemp K.E. (1990a) Ruminal ciliated protozoa in cattle fed finishing diets with or without supplemental fat. *J. Anim. Sci.* 68:2150-2155.
- Towne G., Nagaraja T.G., Brandt R.T., Jr, Kemp K.E. (1990b) Dynamics of ruminal ciliated protozoa in feedlot cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3174-3178.
- 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. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- Vance R.D., Preston R.L., Klosterman E.W., Cahill V.R. (1972) Utilization of whole shelled and crimped corn grain with varying proportions of corn silage by growing-finishing steers. *J. Anim. Sci.* 35:598-605.
- Vasconcelos J.T., Elam N.A., Brashears M.M., Galyean M.L. (2007) Effects of increasing dose of live cultures of *Lactobacillus acidophilus* (Strain NP 51) combined with a single dose of *Propionibacterium freudenreichii* (Strain NP 24) on performance and carcass characteristics of finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* jas.2007-0526. DOI: 10.2527/jas.2007-0526.
- von Buenau R., Jaekel L., Schubotz E., Schwarz S., Stroff T., Krueger M. (2005) *Escherichia coli* strain Nissle 1917: Significant reduction of neonatal calf diarrhea. *J. Dairy Sci.* 88:317-323.
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., et al. (2000) Detection and Identification of Gastrointestinal *Lactobacillus* Species by Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Species-Specific PCR Primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:297-303. DOI: 10.1128/aem.66.1.297-303.2000.
- Wang L.-M., Lv J.-P., Chu Z.-Q., Cui Y.-Y., Ren X.-H. (2007) Production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chem.* 103:313-318.

- Ware D.R., Read P.L., Manfredi E.T. (1988) Lactation performance of two large dairy herds fed *Lactobacillus acidophilus* strain BT138 in a switchback experiment. *J. Dairy. Sci.* 71(Suppl. 1):219.
- Weimer P.J., Waghorn G.C., Odt C.L., Mertens D.R. (1999) Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:122-134.
- Weingarten H.P. (1996) Cytokines and food intake: The relevance of the immune system to the student of ingestive behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20:163-170.
- Weiss W.P., Wyatt D.J., McKelvey T.R. (2008) Effect of feeding propionibacteria on milk production by early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:646-652.
- Wells J.E., Krause D.O., Callaway T.R., Russell J.B. (1997) A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22:237-243. DOI: 10.1111/j.1574-6941.1997.tb00376.x.
- West J.W., Bernard J.K., Cross G.H., Trammell D.S. (2005) Effects of Live Bacterial Inoculants on Performance of Lactating Dairy Cows. [http://www.bovine.com/publications/Georgia\\_Final\\_report.pdf](http://www.bovine.com/publications/Georgia_Final_report.pdf).
- Whitford M.F., Forster R.J., Beard C.E., Gong J., Teather R.M. (1998) Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. *Anaerobe.* 4:153-163.
- Wishart D.S. (2008) Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends Food Sci. Technol.* 19:482-493.
- Wishart D.S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A.C., Young N., et al. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 35:D521-D526.
- Wood J., Scott K.P., Newbold C.J., Flint H.J. (1998) Estimation of the Relative Abundance of Different Bacteroides and Prevotella Ribotypes in Gut Samples by Restriction Enzyme Profiling of PCR-Amplified 16S rRNA Gene Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3683-3689.
- Xavier K.B., da Costa M.S., Santos H. (2000) Demonstration of a novel glycolytic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus zilligii* by <sup>13</sup>C-labeling experiments and nuclear magnetic resonance analysis. *J. Bacteriol.* 182:4632-4636. DOI: 10.1128/jb.182.16.4632-4636.2000.
- Younts-Dahl S.M., Galyean M.L., Loneragan G.H., Elam N.A., Brashears M.M. (2004) Dietary supplementation with *Lactobacillus*- and *Propionibacterium*-based direct-fed microbials and prevalence of *Escherichia coli* O157 in beef feedlot cattle and on hides at harvest. *J Food Prot* 67:889-93.
- Younts-Dahl S.M., Osborn G.D., Galyean M.L., Rivera J.D., Loneragan G.H., Brashears M.M. (2005) Reduction of *Escherichia coli* O157 in finishing beef cattle by various doses of *Lactobacillus acidophilus* in direct-fed microbials. *J. Food Prot.* 68:6-10.
- Zimmer W.A. (1999) An evaluation of the ruminal establishment of *Propionibacterium* species in dairy cattle using three different treatments. Bio-Vet, Inc. <http://www.bio-vet.com/Articles/P63establishmenttrial1299.pdf>.