



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique
Université Larbi Ben M'hidi Oum Elbouaghi
Faculté Des Sciences Exactes et Sciences de La Nature et De La vie
Département Des Sciences De la Nature et de La Vie

N° D'ordre :.....

Série :.....

THESE

Présentée pour l'obtention du Diplôme de **Doctorat en Sciences**

Spécialité : Microbiologie Appliquée.

Intitulée :

Essai de la réduction de la production de méthane chez les ruminants via la manipulation du pool d'hydrogène : utilisation des nitrates et des nitrites.

Présentée par : **KHEDDOUMA Asma**

Soutenue publiquement le: 22/11/2018

Devant le Jury

Président :	Pr. ZELLAGUI Amar	Professeur, Univ. Larbi Ben M'hidi, OEB
Directeur de Thèse :	Pr. ARHAB Rabah	Professeur, Univ. Larbi Ben M'hidi, OEB
Examineurs :	Pr. AYACHI Ammar	Professeur, Univ. Elhaj Lakhdhar, Batna
	Pr. DJEBBAR-TINE Fouzia	Professeur, Univ. Larbi Tébessi, Tebessa
	Pr. DARBOUCHE A.Elhak	Professeur, Univ. Abbes Laghrour, Khenchela
	Dr. GRAMA Borhane Samir	MCA, Univ. Larbi Ben M'hidi, OEB

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au département de Production animale, de la station expérimentale de Zaidin, Espagne ; (*Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain*).

Je suis très honorée et je tiens à remercier **M. ZELLAGUI Amar** ; Professeur à l'université Larbi Ben M'hidi OEB, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier les membres du jury **M. AYACHI Ammar** ; Professeur à l'université Elhaj Lakhdhar, Batna, **M. DARBOUCHE A.Elhak** ; Professeur à l'université Abbes Laghrour, Khenchela, **M^{me}. DJEBBAR-TINE Fouzia** ; Professeur à l'université Larbi Tébéssi, Tebessa et **M. GRAMA Borhane Samir** Maître de conférence classe A à l'université Larbi Ben M'hidi, OEB d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur le professeur **ARHAB Rabah** ; Professeur à l'université Larbi Ben M'hidi OEB pour avoir encadré et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique. Sa compétence et la qualité de ses conseils, le soutien et la confiance qu'il m'a accordés.

Je remercie également **M. ANTONIO Ignacio Martín-García**, Professeur et directeur du Laboratoire de production de l'Estación Experimental del Zaidín, de m'avoir accueilli chaleureusement et permis la réalisation d'une grande partie de ce travail dans son laboratoire. Merci pour ses contributions et ses conseils avisés et pour l'intérêt porté à mes travaux.

Je remercie chaleureusement **M^{elle}. JIMENEZ Elisabeth** et **M. GARCÍA TREJO Ricardo** pour leur aide technique et leur disponibilité.

Je remercie également le personnel de l'unité de Recherche de Chimie de l'Environnement et Moléculaire Structurale (CHEMS), Université-Constantine 1, spécialement **M. BOURAIYOU Abdelmalek** et **M. BOUACIDA Sofiane** pour leur aide.

Merci à **M^{me} CHORFI Rafika** et à tous les membres de laboratoires pédagogiques de l'université de Khenchela pour leurs accueils, leurs aides, et leurs sympathies.

Dédicace

Je dédie cette thèse de Doctorat à mon mari. Pour son soutien moral, ses encouragements et sa présence avec moi au cours de chaque étape de la réalisation de ce travail.

A mes parents

A ma petite princesse, la lumière de ma vie ; ma fille Rinad

A ma famille et à ma belle famille.

Table de Matière

Introduction Générale	1
Etude Bibliographique	
Chapitre I. La production du méthane	4
I. Le méthane	4
II. L'émission de méthane	5
II.1. L'émission par espèce	6
II.1.1. Emission de méthane par les petits ruminants	6
II.1.1.1. L'anatomie de l'appareil digestif des ruminants	7
II.1.1.2. Les paramètres physico-chimiques du rumen	10
II.1.1.3. Les bactéries ruminales	11
II.1.1.4. Les Archées	12
II.1.1.5. Les protozoaires	13
II.1.1.6. Les champignons	14
II.1.1.7. Les virus	14
II.1.1.8. Biotransformation des constituants de la ration dans le rumen	15
II.1.2. Emission de méthane par les bovins	17
II.1.3. Emission de méthane par les volailles	18
II.1.4. Emission de méthane par les porcs	19
II.2. L'émission de méthane par région	19
II.3. Le secteur de l'élevage en Algérie	20
III. Les facteurs influençant la production du méthane	21
III.1. Influence du régime alimentaire sur la production de CH ₄	21
III.2. Influence de type de substrat (ration de base de l'animal)	21
III.3. Influence de la vitesse de fermentation	22
III.4. Influence du taux de protozoaires dans le rumen	22

Table de Matière

IV. Méthodes de mesure de l'émission de méthane	22
IV.1. Les modes d'expression de la production de CH ₄	22
IV.2. Techniques de mesure de l'émission de CH ₄	23
IV.2.1. Calorimétrie indirecte	23
IV.2.2. Technique du gaz traceur SF ₆	24
IV.2.3. Technique de production de gaz <i>in vitro</i>	25
IV.2.4. Le détecteur laser de méthane (LMD)	25
V. Le méthane et l'effet de serre	26
Chapitre II. La réduction du méthane	29
I. La réduction du méthane par l'utilisation des additifs	29
I.1. Les antibiotiques et les additifs chimiques	29
I.2. Les extraits de plantes	31
II. La réduction du méthane par manipulations de l'écosystème microbien	31
II.1. La défaunation	31
II.2. Les agents biologiques	32
III. La réduction du méthane par modification du système d'élevage	33
III.1. Proportion de concentrés	33
III.2. Apport des lipides	34
III.3. Additifs alimentaires	34
IV. La réduction du méthane par manipulation du pool d'hydrogène	36
Chapitre III. Métabolisme de l'hydrogène dans le rumen	38
I. La production de l'hydrogène ruminal	38
I.1. La réduction de la ferrédoxine dans le rumen.	38
I.1.1. Distribution bactérienne et production des ferrédoxines	38
I.1.2. La réduction de ferrédoxine par fermentation des hydrates de carbone	40
I.1.3. La réduction de ferrédoxine par fermentation des protéines	42
I.2. la production des H ₂ par l'oxydation de la ferrédoxine	43

Table de Matière

I.2.1. Rôles des hydrogénases	44
I.2.2. Classification des hydrogénases	45
I.3. Solubilisation et condensation des H ₂	48
II. L'utilisation de l'hydrogène dans le rumen	49
II.1. L'utilisation de l'hydrogène dans la production du méthane	50
II.2. L'utilisation de l'hydrogène dans la synthèse des acides gras volatils	51
II.3. La synthèse de la biomasse microbienne	52
II.4. Hydrogénation des acides gras polyinsaturés	53

Etude Expérimentale

I. Matériel chimique	54
I.1. Les produits commerciaux	54
I.1.1. Les Nitrates	54
I.1.2. Le Nitrophénol	55
I.1.3. Le 5-Nitrobenzimidazol	57
I.2. Les produits de synthèse	58
I.2.1. ABLE 244	59
I.2.2. ABLE 245	59
II. Matériel biologique	60
II.1. Les animaux utilisés	60
II.2. L'échantillonnage	61
III. Méthodes	61
III.1. Fermentation <i>in vitro</i>	61
III.2. Analyse quantitative de la phase gazeuse et mesure de pH	64
III.3. Analyse et mesure de méthane	64
III.4. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatiles	65
III.4.1. Conditions chromatographiques	65
III.4.2. Préparation des échantillons	65

Table de Matière

III.4.3. Préparation des étalons	66
III.4.4. Dosage chromatographique	66
III.5. Comptage des protozoaires	67
III.6. La balance d'hydrogène	67
IV. Analyses statistiques	68

Résultats et Discussion

I. Effets des additifs nitreux sur la fermentation <i>in vitro</i>	69
I.1. Effets des additifs nitreux sur la production de gaz total	69
I.2. Effets des additifs nitreux sur la production du méthane	73
I.3. Evolution du pH	81
I.4. Production d'acides gras volatiles (AGV)	81
II. Effets des additifs nitreux sur la population de protozoaires ruminants	89
III. Stœchiométrie de la fermentation	91
Conclusion générale	96
Références Bibliographiques	100
Annexes	126

Figure 1. Structure d'une molécule de méthane ; (a) : structure tétraédrique et (b) structure du modèle spatial (Demirbas, 2010)	4
Figure 2. Emission mondiale de méthane par l'agriculture (Johnson <i>et al.</i> , 1991)	5
Figure 3. Contribution de différentes espèces animales à l'émission mondiale de méthane entérique (FAOSTAT, 2013 ; Sauvant <i>et al.</i> , 2011)	6
Figure 4. Tube digestif des ruminants (Russel et Rynchlik, 2001).	9
Figure 5. Dégradation de protéines dans le rumen (Jouany, 1994).	15
Figure 6. Métabolisme des lipides dans le rumen (Jenkins <i>et al.</i> , 2008)	16
Figure 7. Métabolisme des glucides dans le rumen (Morgavi <i>et al.</i> , 2010)	17
Figure 8. L'émission de GES par région (Gerger <i>et al.</i> , 2013)	20
Figure 9. Les gaz responsables de l'effet de serre (Sanchis, 2015)	27
Figure 10. Schéma résumant les stratégies de réduction du méthane chez les ruminants (Rira, 2015)	30
Figure 11. Les réactions d'oxydoréduction impliquées dans la production des H ₂ . (Hegarty et Gerdes, 1999 in Popova, 2011)	38
Figure 12. Voie de fermentation du glucose chez les procaryotes et les eucaryotes dans le rumen (Fonty <i>et al.</i> , 1995 ; Prescott <i>et al.</i> , 2010 ; Guyader, 2015).	41
Figure 13. Fermentation microbienne des acides aminés dans le rumen (Wu, 2013)	42
Figure 14. Structure du site actif de [Fe-Fe] et [Ni-Fe]-hydrogénases (Vignais et Billoud, 2007).	45
Figure 15. Réaction catalysée par les hydrogénases sans cluster fer-soufre (Shima <i>et al.</i> , 2004).	47

Figure 16. Les principales voies métaboliques de production et d'utilisation de l'hydrogène dans le rumen (Sauvant <i>et al.</i> , 2011).	50
Figure 17. Voies métaboliques d'utilisation de l'hydrogène au cours de la production des AGV dans le rumen (Jouany, 2009).	51
Figure 18. Structures chimiques de différents nitrophénols (Pankaj Kumar <i>et al.</i> , 2014).	56
Figure 19. Structure moléculaire de 5-Nitrobenzimidazole (Katarzyna <i>et al.</i> , 2012)	57
Figure 20. Structure chimique de ABLE 244 (A) (Sayyafi <i>et al.</i> , 2008) et de ABLE 245 (B) (Lamera <i>et al.</i> , 2017).	58
Figure 21. Chèvres fistulées servant pour les études <i>in vitro</i>	60
Figure 22. Système de fermentation en batch (flacons Wheathon).	63
Figure 23. Pression-mètre	64
Figure 24. La cinétique de la production du gaz (ml/g MS) pendant 24h de fermentation <i>in vitro</i>	72
Figure 25. Production de méthane et de gaz total (ml/ml) en présence de différentes concentrations des produits nitreux.	74
Figure 26. Principales voies métaboliques du nitrate (NO_3^-) et du nitrite (NO_2^-) dans le rumen (Nolan <i>et al.</i> , 2016).	76
Figure 27. Diagramme montre les enzymes qui interviennent dans le métabolisme de l'azote chez les bactéries ruminales (Andrade et Einsle, 2013).	78
Figure 28. Stratégie microbienne de la dégradation des composés nitro-aromatiques en anaérobie (Kulkarni et Chaudhari, 2007)	79
Figure 29. Relation entre les concentrations des produits et la réduction des AGV totaux	86
Figure 30. Effets de différents produits nitreux sur le profil des acides gras volatils <i>in vitro</i>	87

Tableau I. Distribution taxonomique des [Fe-Fe] et [Ni-Fe]-hydrogénases dans 2912 génomes de <i>Bacteria</i> et <i>Archeae</i> (Peters <i>et al.</i> , 2015).	47
Tableau II. Composition de la biomasse bactérienne (Reichl et Baldwin, 1975)	53
Tableau III. Composition chimique du foin de luzerne et de l'avoine (g / kg de matière sèche).	61
Tableau IV. Préparation des solutions de la salive artificielle (Theodoreau <i>et al.</i> , 1994)	62
Tableau V. Composition de la salive artificielle selon (Theodoreau <i>et al.</i> , 1994)	63
Tableau VI. Effets des additifs nitreux sur la production de gaz total et du méthane <i>in vitro</i> , après 24h d'incubation	71
Tableau VII. Evolution du pH dans les différentes cultures après 24h de fermentation	82
Tableau VIII. Effets des additifs nitreux sur les acides gras volatils après 24h de fermentation <i>in vitro</i>	83
Tableau IX. Effets des additifs nitreux sur la population de protozoaires ruminants (\log_{10}) après 24h de fermentation <i>in vitro</i> .	89
Tableau X. Stoechiométrie de la fermentation <i>in vitro</i> .	92

5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol

Å : Angström

ABLE244: 13-(4-nitrophenyl)-3,4-dihydro-2H-indazolo [1,2-b] phthalazine-1,6,11 (2H, 13H)-trione

ABLE245: 16-(4-nitrophenyl)-1,16-dihydrophthalazino [2',3':1,2] pyrazolo [4,3-a] carbazole-9,14 dione

ADF: Acid detergent fibre

ADL: Acid detergent lignin

AGV: Acide gras volatil

CCM: Chromatographie sur couche mince

CPG: Chromatographie à phase gazeuse

Eq: Equation

Fed_{ox} : Rerrédoxine oxydée

Fed_{red} : Ferrédoxine réduite

GES: Gaz à effet de serre

GT: Gaz total

LMD: Détecteur laser de méthane

MO: Matière organique

MS: Matière sèche

NDF: Neutral detergent fibre

NIP: Nitrophénol

Prod_{ox} : Produit oxydé

Prod_{red} : Produit réduit

Tpm : Tours par minute

La réduction des émissions de méthane liées à l'élevage est une préoccupation majeure qui nécessite l'implication des pouvoirs publics et des acteurs des filières animales à l'échelle mondiale.

L'objectif de ce travail de thèse était de tester le pouvoir antiméthanogène, *in vitro*, de cinq additifs nitreux et de proposer et évaluer de nouvelles stratégies alimentaires pour réduire les émissions de CH₄, en supposant que la manipulation de la production et de l'utilisation de H₂ permet une réduction plus importante des émissions de CH₄.

Nos travaux permettent de conclure que les nitrates ont le potentiel d'atténuer la production de méthane *in vitro* sans effets indésirables notables sur la fermentation ruminale et sur la flore ruminale. A 12μM, les nitrates ont engendré une diminution de 80% de la production de CH₄. Alors que, la dose de 8μM baisse 53% de la production de CH₄.

L'effet des nitrates est plutôt lié à son action sur le pool d'hydrogène et sa voie compétitive à la méthanogenèse qui permet de réduire la part d'hydrogène disponible pour les méthanogènes.

Ce travail de thèse a aussi mis en évidence l'activité réductrice de méthane des additifs aromatiques ayant des groupements nitrites (le nitrophénol et le 5-nitrobenzimidazol) (une réduction de 60% de la concentration du méthane produit), cette réduction du méthane est due à l'effet anti-protozoaire (jusqu'à 52%) et/ ou un changement de la diversité des archées méthanogènes des nitrites.

Les produits de synthèse ne montrent aucune réduction de méthane *in vitro*, à cause de manque de l'adaptation de la flore ruminale à ces produits à chaîne carbonique longue (ce qui rend leur dégradation difficile) ; et/ ou leur l'insolubilité dans le milieu de culture.

Mots clés : Réduction de méthane, ruminants, Nitrate, Nitrite, pool d'hydrogène.

Abstract

Strategies of methane reduction will have to take into account the other environmental impacts and the social-economic stakes. Therefore, the main encouraging way envisaged to reduce enteric methane is the use of nitrocompounds.

The objective of this thesis work was to test the *in vitro* potential of five nitrocompounds to reduce methane production and to propose and evaluate new dietary strategies to mitigate CH₄ emissions. We assumed that manipulating production and utilization of H₂ allows a more important reduction of CH₄ emissions.

Our work allows concluding that nitrates have the have the potential to decrease *in vitro* methane production, it negatively affect *in vitro* ruminal fermentation.

The effect of nitrates is rather related to its action on the hydrogen pool and its competitive pathway to methanogenesis, which reduces the proportion of hydrogen available for methanogens.

This work also highlighted the reducing activity of nitroaromatic compounds (nitrophenol and 5-nitrobenzimidazol), this reduction of methane is due to the anti-protozoa effect.

The synthetic nitrocompounds show no reduction of methane *in vitro*, because of the lack of adaptation of the rumen flora to these nitrocompounds with long carbon chain (which makes their degradation difficult); and / or their insolubility in the culture medium.

Key words: Methane-inhibitor, rumen, Nitrate, Nitrite, hydrogen pool.

يعتبر الحد من انبعاث الميثان المرتبطة بالثروة الحيوانية مصدر قلق كبير يتطلب تضافر مجهودات الهيئات العمومية والجهات الفاعلة في الإنتاج الحيواني على حد سواء .

الهدف الأساسي من هذا العمل هو اختبار فعالية خمس مركبات نيتروجينية في تخفيض نسبة انبعاث غاز الميثان عند الحيوانات المجترة .

تتلخص أهم نتائج هذا البحث في القدرة الهائلة للنترات على تخفيض نسبة الميثان المنبعث و ذلك دون أي تأثير سلبي على التخمر. و يعود تأثير النيترات إلى كونه مستقبلي قوي للالكترونات مما يقلل نسبة الهيدروجين المتاح لتكوين الميثان.

وقد أبرز هذا العمل أيضا فعالية المركبات الحلقية العطرية (نيتروفينول و 5 نيتروبانزيميدازول) في تخفيض نسبة الميثان، و ذلك يرجع إلى التأثير المباشر لهذه المركبات على الكائنات الدقيقة المسؤولة عن تكوين الميثان عند المجترات.

من جهة أخرى، المركبات المصنعة في المختبر لم تُظهر أي تأثير على نسبة الميثان، و ذلك يعود إلى عدم تكيف الكائنات الدقيقة مع هذه المركبات و عدم قدرتها على تفكيكها، أو أن هذه المركبات لم تتحلل بشكل جيد.

الكلمات الدالة: تخفيض نسبة الميثان، المجترات، النيترات، النيتريت، تجمع الهيدروجين.

Introduction Générale

Le méthane est un gaz à effet de serre qui contribue au réchauffement de la planète (**Crutzen et al., 1986, Johnson et Johnson, 1995, Moss et al., 2000, Wuebbles et Hayhoe, 2002, Lassey, 2007**). Il est considéré comme le gaz à effet de serre le plus puissant après le dioxyde de carbone (**IPCC, 2001**), en raison de l'efficacité plus élevée (20-30 fois) de l'absorption du rayonnement par rapport au CO₂ et de l'implication du CH₄ dans les réactions chimiques conduisant à la formation d'ozone (**Crutzen, 1995**). Comme la concentration de CH₄ dans l'atmosphère a plus que doublé dans l'ère postindustrielle, une grande partie des efforts de recherche ont été déployés pour identifier les sources et les puits de méthane et estimer leurs forces (**Bodelier et al., 2004; , 2012, Guangming et al., 2013**).

Sur le plan environnemental, la méthanogenèse ruminale contribue à près de 20% des émissions totales de ce gaz à effet de serre (**Yáñez-Ruiz et Martín-García, 2016**). Dans le rumen, le méthane (CH₄) est produit par des méthanogènes qui utilisent principalement du CO₂ et du H₂. La production de méthane entraîne un gaspillage de 4% à 12% de l'énergétique brute pour les bovins nourris aux concentrés alimentaires et aux fourrages (**Zhenming et al., 2012**).

Les méthanogènes appartiennent au domaine *Archaea* ; plus précisément à l'embranchement *Euryarchaeota* (**Woese et al., 1990**). Elles catalysent le transfert de l'hydrogène et du dioxyde de carbone en méthane. En plus de la production de méthane, le maintien d'une faible pression partielle d'hydrogène par les méthanogènes a une profonde influence sur la production d'hydrogène et d'autres produits par la communauté microbienne non méthanogène et fermentative (**Wolin et al., 1997**).

La limitation des émissions de méthane représente donc un double intérêt, économique et environnemental. Différentes stratégies sont déployées pour minimiser son émission (**Moss, 1993, Anderson et al., 2008**). Elles s'intéressent essentiellement à la modification des conditions fermentaires et/ou à un changement de l'équilibre des populations microbiennes ruminales (**Anderson et al. 2006, Zhenming et al., 2012, Van Nevel et Demeyer, 1996, Brown et al., 2011**).

Plusieurs substances telles que le monensin et le lasalocide (**Hook et al., 2009, Immig et al., 1996, Russell et Strobel, 1989**), les extraits de plantes (tannins) (**Hariadi et Santoso, 2010**) et l'acide 2 bromo-éthane-sulfoniques (BES) (**Khiaosa-Ard et al., 2009**), ont été évaluées pour réduire la production de CH₄ dans le rumen.

D'autres stratégies consistent à utiliser des composés anti-méthanogènes qui inhibent directement les méthanogènes ou inhibent les réactions biochimiques impliquées dans la production de méthane (Bozic *et al.*, 2009)

Cependant, une série d'effets secondaires et d'interactions ont été observés, ce qui fait qu'aucune méthode ne semble à ce jour répondre convenablement à sa double problématique de gestion nutritionnelle et environnementale (Miller, 1995, Van Nevel et Demeyer, 1996, Anderson *et al.*, 2008).

Par conséquent, une nouvelle stratégie pour réduire la production de méthane ruminal consiste à fournir des accepteurs d'électrons alternatifs qui consomment plus efficacement les H₂ produits pendant la fermentation afin de rediriger le flux d'électrons de la réduction du dioxyde de carbone en méthane vers la réduction de ces accepteurs des électrons en ammoniacque (Anderson et Rasmussen, 1998; Sar *et al.*, 2005).

Les composés nitreux inhibent la méthanogenèse ruminale *in vitro* jusqu'à 90% (Anderson *et al.*, 2003), tels que le nitroéthane, le 2-nitroéthanol, le 2-nitro-1-propanol et l'acide 3-nitro-1-propionique (Anderson et Rasmussen, 1998, Anderson *et al.*, 2003, 2008, Bozic *et al.*, 2009, Gutierrez-Banuelos *et al.*, 2008), le nitroéthane et le 2-nitro-1-propanol réduisent aussi le CH₄ *in vivo* (Anderson *et al.*, 2006, Gutierrez-Banuelos *et al.*, 2007, Zhang et Yang, 2011). Ainsi, l'éthyl-3-nitrooxy propionate et 3-nitrooxypropanol qui ont montré un potentiel d'utilisation comme additifs antiméthanogènes chez les ruminants (Martínez-Fernández *et al.*, 2013).

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre l'importance de différentes voies métaboliques de H₂ (production et utilisation) dans le rumen, afin de proposer et évaluer de nouvelles stratégies alimentaires pour réduire les émissions de CH₄. Nous avons supposé que la manipulation de la production et de l'utilisation de H₂ permet une réduction plus importante des émissions de CH₄.

Pour faire face à cette hypothèse, le programme scientifique de cette thèse reposait sur différentes approches:

Approche bibliographique : Une analyse visait à étudier la production de méthane et les différents mécanismes de sa réduction. En outre, Une revue de littérature a détaillé les processus biologiques de la production et de la consommation de H₂ dans le rumen.

Approche expérimentale : Nous avons testé *in vitro* l'effet des composés à base de nitrate et de nitrite, ayant différents mécanismes d'action sur le pool d'H₂ du rumen, sur la production de méthane ruminal ; deux nitrocomposés nouvellement synthétisés, ABLE 244 et ABLE 245 et trois autres composés commerciaux: Nitrate (KNO₃), Nitrophénol (NIP) et 5-Nitrobenzimidazol (5NBZ) ont été testés *in vitro*.

Dans la mesure du possible, les fermentations ruminales (paramètres fermentaires et microbiens) ont également été analysées afin d'expliquer les mécanismes d'action des stratégies testées. En ce qui concerne l'analyse du microbiote du rumen, nous sommes principalement concentrés sur les populations produisant le H₂ (les protozoaires). Pour compléter cette approche, nous avons estimé *in vitro*, la distribution de H₂ dans les produits finaux de la fermentation.

Une dernière analyse statistique des résultats globaux a été faite dans la dernière section de ce manuscrit.

Etude
Bibliographique

Chapitre I

I. Le méthane

Le méthane (CH_4) est le plus simple des hydrocarbures de la famille des alcanes. D'une manière expérimentale, le méthane a une structure tétraédrique hautement symétrique, chaque liaison C-H a exactement la même longueur, 1.10 Å ; l'angle entre deux liens est l'angle tétraédrique $109,5^\circ$. Il faut 104 kcal/mole pour casser une des liaisons du méthane (Demirbas, 2010).

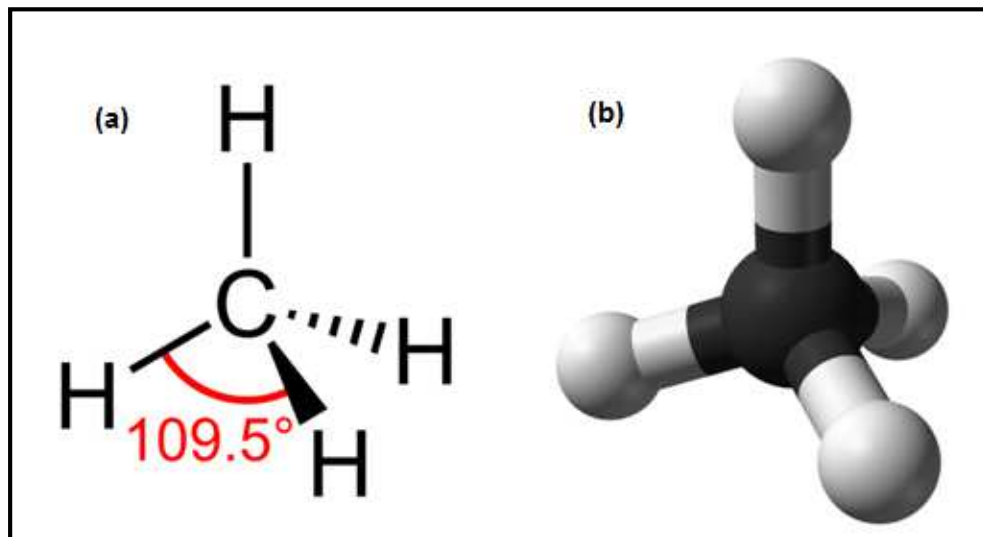


Figure 1. Structure d'une molécule de méthane ; (a) : structure tétraédrique et (b) structure du modèle spatial (Demirbas, 2010).

Il est présent dans l'atmosphère terrestre avec des concentrations variables, tant dans l'espace que dans le temps. Par exemple, il y a 2.5 milliards d'années, sa concentration de surface a pu être plusieurs centaines de fois supérieure en raison de l'activité des archées et de l'absence d'oxydants dans l'atmosphère (André *et al.*, 2014).

Le méthane est le principal constituant du biogaz issu de la fermentation de matières organiques animales ou végétales en absence d'oxygène. Le méthane est ainsi le seul hydrocarbure classique qui peut être obtenu rapidement et facilement grâce à un processus biologique naturel ; il est fabriqué par des bactéries méthanogènes qui vivent dans des milieux anaérobiques.

Aux conditions normales de température et de pression, le méthane est un gaz incolore et inodore. Plus léger que l'air, le méthane en milieu non confiné s'échappe vers la haute atmosphère et n'a pas la tendance des gaz plus lourds que l'air (propane, butane) à former des nuages explosifs. Le méthane est un combustible qui compose jusqu'à 90 % le gaz naturel. Sa température d'auto-inflammation dans l'air est de 540°C (ICSCs, 2014).

Bien que le méthane ne soit pas toxique pour l'être humain, des concentrations supérieures à la valeur de solubilité aux conditions de pression et température correspondantes (approximativement 30 mg/l à 1 atm et 8°C) peuvent générer des risques d'asphyxie et/ou d'explosion (**Vidic et al., 2013**). Ainsi, le CH₄ soit environ 200 fois moins concentré que le CO₂, son potentiel global de réchauffement direct (seules sont prises en compte ses propriétés radiatives) par kg et sur 100 ans, est approximativement 20 fois plus élevé que ce-dernier (**IPCC, 2001**). Le CH₄ intervient, en outre, dans la chimie atmosphérique en affectant les niveaux d'ozone, de vapeur d'eau, de dioxyde de carbone, de monoxyde de carbone et des radicaux hydroxyles OH. Il a donc une action à la fois directe et indirecte sur le climat.

II. L'émission de méthane

Les émissions de méthane ont plusieurs sources naturelle et anthropogénique (**Fig. 2**). L'augmentation de la concentration du méthane dans l'atmosphère est principalement liée à celle des populations, puisque seulement 30% des émissions sont d'origine naturelle. Tandis que les 70% restantes proviennent de sources anthropogènes. Les sources anthropiques de méthane proviennent principalement des activités agricoles telles que l'élevage de bétail et la culture du riz. La décomposition de la matière organique au niveau des décharges produit également du méthane. Ces sources anthropiques représentent environ les 2/3 des émissions totales de ce gaz. Ces sources sont assez bien connues et leur production semble dépassée le potentiel d'utilisation, ce qui provoque l'accumulation du CH₄ dans l'atmosphère. (**Johnson and Johnson, 1995**).

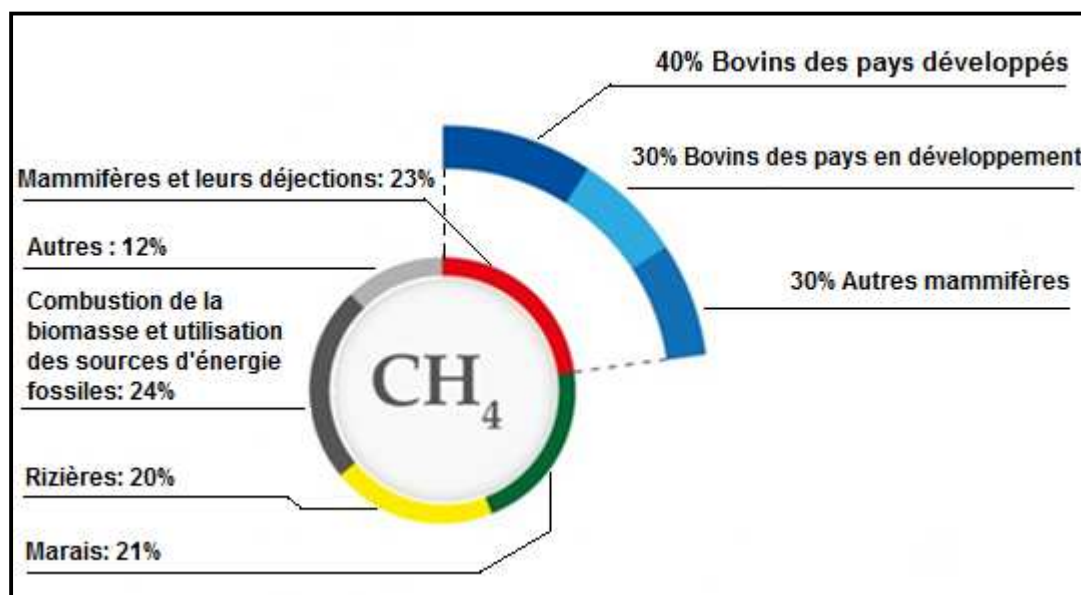


Figure 2. Emission mondiale de méthane par l'agriculture (**Johnson et al., 1991**)

Généralement, les émissions de méthane du secteur agricole représentent le grand pourcentage dont la fermentation entérique (émissions de CH₄ par les ruminants) est la principale source du gaz. Les bovins non laitiers étaient la principale source de CH₄ entérique, suivis par les bovins laitiers, les buffles, les moutons et les chèvres (Fig. 3) (Pickering *et al.*, 2013).

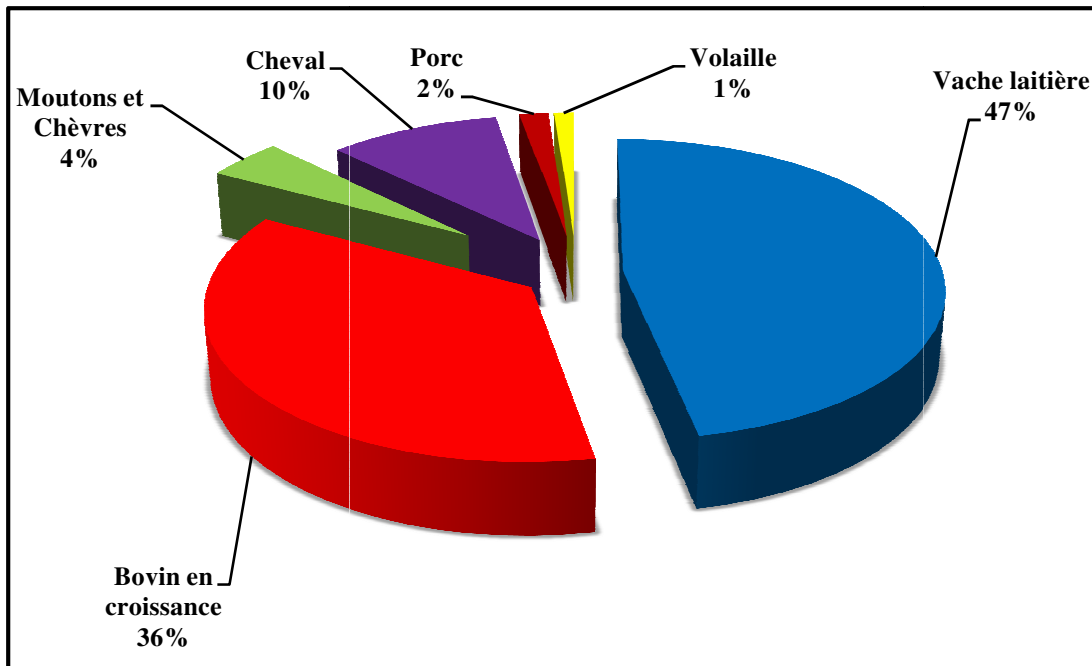


Figure 3. Contribution de différentes espèces animales à l'émission mondiale de méthane entérique (FAOSTAT, 2013 ; Sauvart *et al.*, 2011).

Les plus importants contributeurs régionaux à la production internationale de CH₄ entérique étaient l'Asie et les Amériques (Fig. 8). Il y a eu une augmentation des émissions entériques annuelles dans toutes les régions sauf en Europe et en Océanie (FAOSTAT, 2013).

II.1. L'émission par espèce

II.1.1. Emission de méthane par les petits ruminants

Chez les ruminants, le méthane produit au cours des fermentations digestives est rejeté par éructation dans l'atmosphère ce qui représente à la fois une perte sur la quantité d'énergie fixée par les animaux d'élevage et une contribution à l'effet de serre. (Jouany et Thivend, 2008).

Plus de 87% des CH₄ produits par les moutons ont été estimés dérivés du rumen (Murray *et al.*, 1976), où une population d'*Archaea* méthanogène convertit le H₂ et le CO₂ produits par

une communauté complexe de protozoaires ciliés, de bactéries et de champignons anaérobies au CH₄ (Martin *et al.*, 2010 ; Morgavi *et al.*, 2010).

Les émissions de méthane provenant des petits ruminants contribuent de manière significative à la grande empreinte environnementale de l'agriculture. Le rumen est la principale source de méthane et certaines caractéristiques du microbiote ruminal sont associées, d'une manière ou d'une autre, à la production du méthane (Tapio *et al.*, 2017).

La flore ruminal constitue l'une des particularités de la digestion des ruminants, sa composition varie en fonction des changements des conditions d'environnement pour cette raison celle-ci varie selon les espèces des ruminants mais encore de l'âge. Une véritable symbiose existe entre le ruminant et sa flore ruminal, les flores microbiennes autorisent la digestion de la cellulose et l'apport de protéine d'origine microbienne. Cette symbiose est un équilibre fragile qui peut si l'écosystème ruminal est perturbé se déplacer vers la production de substances toxiques (Guillaume, 2007). La microflore ruminal est constituée de bactéries (10^{10} - 10^{11} cellules/g), de bactériophages (10^7 - 10^9 particules / g), de protozoaires (10^4 - 10^6 cellules / g), de champignons (10^2 - 10^4 cellules / g) et d'archées méthanogéniques (10^9 - 10^{10} cellules / g) (Joblin, 2005).

II.1.1.1. L'anatomie de l'appareil digestif des ruminants

L'appareil digestif s'étend de la bouche à l'anus, il comprend le tube digestif et ses annexes. Le tube digestif des ruminants est composé de différentes parties ; la cavité buccale, le pré-estomac, l'estomac et les intestins (le petit et gros intestin) (Fig. 4).

a) La cavité buccale

La nourriture se retrouve dans la bouche des ruminants, où elle est mastiquée une première fois afin de réduire la longueur des fibres de l'herbe ou du foin. Lorsqu'ils mangent, les ruminants mastiquent très peu et avale leur nourriture presque «tout rond». La bouche joue un rôle dans :

- La réduction de la dimension des particules, ce qui facilite l'attaque des fibres pendant la fermentation microbienne.
- La production de la salive et la production de *tampons* dans la salive (bicarbonates et phosphates) qui neutralisent les acides produits par la fermentation microbienne et ainsi favorisent la digestion des fibres et la croissance microbienne grâce au maintien d'une acidité neutre dans le rumen.

b) L'estomac

C'est la portion digestive comprise entre l'oesophage et l'intestin. Elle occupe les 3/4 de la cavité abdominale. Elle est constituée de quatre compartiments: le rumen (panse), le réseau (réticulum), le feuillet (omasum), la caillette (abomasum) qu'est considérée comme l'estomac vrai). Le volume et le poids de l'estomac varient avec le niveau d'ingestion, la composition de la ration et le comportement alimentaire (**Church, 1976**).

b.1) Panse ou rumen

Il occupe la partie gauche de l'abdomen. C'est un sac volumineux représentant 85 à 90% du volume de l'estomac et de 70 à 75% du volume totale de l'appareil digestive. (**Soltner, 1994**). La paroi du rumen est formée d'une tunique musculaire qui constitue l'essentiel de sa masse. Ce sont les contractions de ces muscles qui assurent le brassage continu des aliments. Le rumen est tapissé d'une muqueuse assurant l'absorption des nutriments solubles. Les différentes poches du rumen communiquent par un bourrelet de deux saillies qui est la goutte oesophagienne (**Gulter, 1975**).

b.2) Réseau ou réticulum

Il est déposé en avant de la panse, contre le diaphragme. Sa paroi intérieure est tapissée d'alvéoles ressemblant à des rayons d'abeilles recouvertes de papilles cornées. Ces alvéoles augmentent la surface de contact avec les aliments. Ils jouent un rôle majeur dans la circulation et le tri, ne laissant passer vers le feuillet que les particules alimentaires suffisamment fragmentées, les autres particules étant retenues dans la panse où elles subiront la rumination et la dégradation microbienne (**Devendra, 1978**). C'est la raison pour laquelle le rumen et le feuillet sont considérés comme un seul organe appelé réticulo-rumen.

b.3) Feuillet ou omasum

C'est un réservoir grossièrement sphérique, plus volumineux que le réseau. Sa paroi intérieure est tapissée de très nombreuses lamelles muqueuses. Semblables aux feuilles d'un livre, d'où son nom. Ces lamelles, déposées parallèlement au passage des aliments.

Il permet le recyclage de l'eau et de certains minéraux, tels que le sodium et le phosphore, qui sont absorbés dans le sang et retournent dans le rumen via la salive. Le feuillet est un organe de transition entre le rumen et l'abomasum qui ont des modes de digestion très différents.

Cependant, le feuillet n'est pas un organe essentiel. En fait, il est absent chez les chameaux, les lamas et les alpacas (pseudo-ruminants) (**Gouet et Thivend, 1986**).

b.4) Caillette ou abomasum

Elle est de forme allongée, repliée en crêtes spiralées. L'épithélium liminal est constitué de cellules sécrétrices qui produisent du mucus, de l'acide chlorhydrique et de la pepsine. Elle se termine par le pylore qui la relie au duodénum. Il secrète un acide fort et de nombreuses enzymes digestives. Chez les non-ruminants, les aliments ingérés y arrivent directement et y sont digérés. Par contre, le matériel qui entre dans l'abomasum d'un ruminant provient du rumen. Les produits de la fermentation ruminale qui passent dans la caillette sont donc composés de particules alimentaires résiduelles, de certains sous-produits de la fermentation bactérienne, et d'une masse microbienne (bactéries, protozoaires) qui a crû et s'est multipliée dans le rumen (Soltner ,1994).

c) Les intestins

L'intestin grêle qu'est divisé en duodénum, jéjunum et iléon. Sa muqueuse est riche en villosités qui constituent une surface d'absorption et de sécrétion. Son développement dépend de l'alimentation et de l'espèce, et le gros intestin ; formé d'un réservoir allongé: Le caecum (0,75m), le colon (9m) qui s'enroule en spirale et d'une poche ovoïde allongée se terminant par l'anus qu'est le rectum (Soltner, 1994).

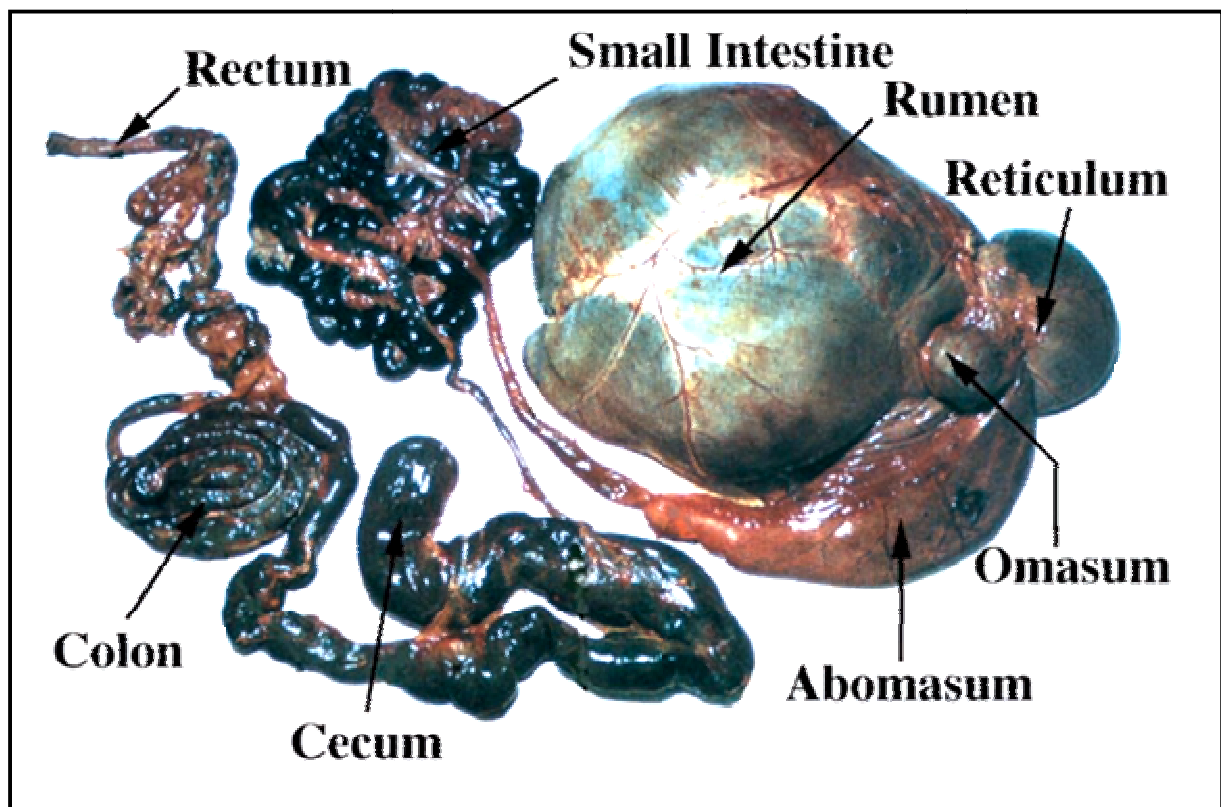


Figure 4. Tube digestif des ruminants (Russel et Rynchlik, 2001).

II.1.1.2. Les paramètres physico-chimiques du rumen**a) La teneur en eau**

La teneur en eau du contenu ruminal est comprise entre 85 et 90%. L'eau, apportée par les aliments, l'eau de boisson et la salive, est le support des molécules en solution et des particules en suspension avec lesquelles elle constitue la phase liquide du rumen. Celle-ci est caractérisée par une pression osmotique comparable à celle du sang et comprise entre 200 et 300 mOsm/L chez l'animal sain. L'eau du rumen représente une masse importante en quantité et elle peut être utilisée, le cas échéant, comme réserve pour l'organisme (**Brugère, 1983**).

b) La température

La température ruminale est sensiblement supérieure à la température corporelle, elle est comprise entre 39°C et 41°C. Elle peut atteindre 41°C lorsque les fermentations sont très intenses mais aussi chuter de plusieurs degrés après ingestion de grandes quantités d'eau froide (**Brugère, 1983**).

c) L'anaérobiose

Le milieu ruminal est caractérisé par des conditions d'anaérobiose vraie. Les apports d'oxygène sont faibles (déglutition, diffusion à partir des vaisseaux des parois) mais des souches de bactéries aérobies facultatives le font vite disparaître (**Bouazza, 2014**). Les espèces bactériennes diffèrent selon leur sensibilité à l'oxygène. Les espèces reconnues pour être anaérobies strictes sont *Selenomonas ruminatium*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Lachnospira multiparus*, *Clostridium haemolyticum* et quelques espèces du genre *Treponema* (**Loesche, 1969**). Les espèces anaérobies modérées incluraient celles qui sont capables de croître en présence d'un pourcentage d'oxygène allant de 2 à 8% (**Loesche, 1969**). D'autre part, des souches de bactéries aérobies facultatives peuvent faire disparaître l'oxygène qui rentre dans le rumen (**Zened, 2011**).

d) Le pH et le pouvoir tampon

Il est généralement admis que le pH optimal du rumen se situe dans une fourchette comprise entre 6 et 7. Le pH du milieu ruminal est la résultante des productions acides, des tampons salivaires et des tampons propres de la ration (**Giger-Reverdin et al., 2002**). Les mesures du pH faites dans les conditions de terrain conduisent souvent à établir des gammes beaucoup plus larges allant des valeurs parfois inférieures à 5 (état d'acidose) à des valeurs supérieures à 7,5 (état d'alcalose). De telles déviations du pH qui sortent de la zone dite de normalité, sont

la conséquence de déviations fermentaires générées elles-mêmes par des déséquilibres alimentaires (Sauvant *et al.*, 1999).

e) Le potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel redox (Eh) d'un rumen sain et en fonctionnement est négatif et varie de -150 mV à -260 mV lorsqu'il est normalement mesuré par rapport à l'électrode standard à hydrogène (Marden *et al.*, 2005). Les micro-organismes du rumen maintiennent le caractère très réducteur de ce milieu par leurs activités fermentaires (Baldwin et Emery, 1960). Les valeurs négatives du Eh enregistrées dans le rumen traduisent le caractère hautement réducteur de ce milieu appauvri en oxygène, bien que quelques auteurs (Hillman *et al.*, 1985) aient mis en évidence la présence d'air ou d'oxygène dans le rumen, qui pénètre lors de l'ingestion des aliments, lors de la mastication mérycique et avec l'eau de boisson.

II.1.1.3. Les bactéries ruminales

Les bactéries ruminales forment le groupe le plus diversifié dans le rumen, capables d'utiliser les fibres, l'amidon, les protéines et les sucres (Denman *et al.*, 2015). Parmi les phylums bactériens trouvés, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et les *Proteobactéries* sont les plus abondants dans le rumen (Henderson *et al.*, 2015). Les bactéries fibrolytiques, en particulier *Ruminococcus* et plusieurs *Eubacterium spp.* (*Firmicutes*), sont des bons producteurs de H₂. D'autre part, le genre *Fibrobacter*, ne produit pas de H₂, tandis que *Bacteroidetes* sont des utilisateurs des H₂ (Stewart *et al.*, 1997).

L'analyse du microbiote ruminal a identifié trois «ruminotypes» différents qui semblent être associés à des variations de la production de méthane par les moutons (Kittelmann *et al.*, 2014) ; les bactéries cellulolytiques, les bactéries amylolytiques et les bactéries à base de lactate.

Les bactéries cellulolytiques : ou (digestives) sont des bactéries dont leur membranes ont la capacité de dégrader la cellulose qui sont partager de nombreuses genres bactériens appartient principalement aux *Firmicutes*, *Bacteroidetes* et aux *Actinobacteria* dont le genre *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Bacteriodes*, *Bacillus*, *Fibrobacter*, *Cytophaga*, *Provetalla*, *Butyrivibrio*, *Eubacterium* et *Ruminococcus* (Galzer, 2007). Mais d'un point de vue fonctionnel, elles peuvent être divisées en trois groupes : les bactéries anaérobies dont la grande partie est proche au *Clostridium* et également *Ruminococcus*, *Fibrobacter* et *Butyrivibrio*, et les bactéries cellulolytiques aérobie à enzyme extracellulaires appartenant au groupe des Gram positif qui comprend *Cellulomonas* (Ransam *et al.*, 2012).

D'autre part, le développement d'une communauté cellulotique 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 à répétés sur 3 périodes a montré une adaptation progressive de la flore cellulolytique au pH acide (Silberberg *et al.*, 2008).

Les bactéries amylolytiques : Les espèces représentatives de ce groupe sont : *Selenomonas ruminantium* et *Streptococcus bovis* (Jouany, 1994), Les principaux substrats fermentés par *S. bovis* sont l'amidon, certains glucides simples (maltose, sucrose, glucose, fructose, galactose, mannose, lactose), mais pas la cellulose et le principal produit de ce type de fermentation est le lactate (Hungate, 1966).

D'autres espèces bactériennes sont capables de dégrader l'amidon, notamment *Ruminobacter amylophilus*, *Succinomonas amylolytica*, *Selenomonas ruminantium* ou encore *Prevotella ruminicola*. Ainsi, *Prevotella ruminicola*, anciennement *Bacteroides ruminicola*, possède deux sous-espèces présentant une activité amylolytique : *P. ruminicola* subsp. *ruminicola* et *P. ruminicola* subsp. *brevis*. La sous-espèce *ruminicola* est exigeante en hémine et elle est divisée en 8 biovars alors que la sous-espèce *brevis*, non exigeante en hémine, est divisée en 3 biovars (Euzéby, 2006).

Les bactéries à base de lactate : Certaines bactéries, telles que *Streptococcus bovis*, produisent un acide fort appelé acide lactique. *Megasphaera elsdenii* utilise de l'acide lactique pour se développer. Cela aide à nettoyer le rumen un peu et augmenter le pH du rumen, aidant à la croissance de la fibre digesteurs intolérants à l'acide (Hook *et al.*, 2010).

II.1.1.4. Les Archées

Il existe deux voies principales pour la méthanogenèse dans le rumen, toutes deux effectuées par les archées. La voie hydrogéotrophique convertit le H₂ et le CO₂ produits par les protozoaires, les bactéries et les champignons en CH₄ (McAllister *et al.*, 2015 ; Martin *et al.*, 2010). Une deuxième catégorie de substrat pour la méthanogenèse est les groupes méthyle, tels que ceux présents dans les méthylamines et le méthanol (Poulsen *et al.*, 2015 ; Kittelmann *et al.*, 2013). Les méthylamines sont dérivées de la glycine bêtaïne (de la betterave) et de la choline (à partir des membranes végétales), tandis que le méthanol dérive de l'hydrolyse des groupes latéraux méthanoliques dans les polysaccharides végétaux.

Les archées hydrogéotrophes les plus courantes proviennent du genre *Methanobrevibacter* (Janssen, 2008). D'autres genres hydrogéotrophes importants comprennent *Methanosphaera*,

Methanimicrococcus et *Methanobacterium*. Les méthylophiles moins abondants (*Methanosarcinales*, *Methanosphaera*, *Methanomassiliicoccaceae*) peuvent utiliser des méthylamines et du méthanol, et il existe des archées (*Methanosarcinales*) qui produisent du méthane via la voie acéticlastique (**Morgavi et al., 2010**).

Intuitivement, *Archaea* devrait être le groupe microbien qui est le plus étroitement lié aux émissions de méthane. Cependant, certaines études n'ont montré aucune corrélation avec leur abondance globale alors que dans d'autres, la corrélation était faible. **Morgavi et al., 2012 ; Zhou et al., 2011 ; Danielsson et al., 2012** n'ont trouvé aucune correspondance entre le nombre de méthanogènes et les émissions de méthane provenant des vaches laitières lorsqu'elles sont mesurées à l'aide de la métagénomique et des techniques PCR. **Shi et al., (2014)** a formé une conclusion similaire chez le mouton.

D'autres observations concernant la communauté archaïque, parfois appelée archéome, comprennent celles de **Pitta et al., (2016)**, qui a constaté que l'abondance archaïque augmentait chez les bovins souffrant de ballonnements, et **Pei et al., (2010)**, qui a découvert des archées associées à l'épithélium du rumen. Dans le premier cas, la teneur en CH₄ du gaz n'a pas été mesurée, de sorte qu'il n'est pas clair l'impact du gonflement sur la méthanogénèse. Dans ce dernier cas, la découverte a été surprenante car la paroi du rumen est considérée comme une interface aérobie/anaérobie et l'abondance relative d'O₂ pourrait être considérée comme supprimant la croissance des méthanogènes extrêmement sensibles à l'O₂ (**Tapio et al., 2017**).

II.1.1.5. Les protozoaires

Les protozoaires sont des organismes eucaryotes cellulaires. On distingue 02 types dans le rumen : les flagellés et les ciliés. Les ciliés représentent près de la moitié de la biomasse microbienne et leur concentration varie de 10⁴ à 10⁶ cellules /ml. Les ciliés appartiennent à deux groupes les *Holotriches* et les *Entodiniomorphes*, parmi les premiers on distingue les genres : *Isotricha* et *Dasytricha* (famille des *Isotrichidae*), mais pour les *Entodiniomorphes* ont distingués les genres : *Entodinium*, *Diplodinium*, *Epidinium*, *Ophryoscox*, *Polyplastron* et *Eudiplodinium* qui sont les plus fréquents (**Jouany et al., 1994**)

Les protozoaires ruminants sont intimement impliqués dans la méthanogénèse, par leur production abondante de H₂ (**Newbold et al., 1995**). Plusieurs études ont suggéré une corrélation entre l'abondance des protozoaires et des émissions de méthane (**Newbold et al., 2015**), tandis que d'autres pas (**Morgavi et al., 2012**).

Ils sont impliqués dans la méthanogenèse par leur forte production de butyrate et d'acétate, deux acides gras volatils (AGV) dont la biosynthèse libère respectivement 2 et 4 moles de H₂, par mole de glucose fermenté (**Sauvant et al., 2011**).

La défaunation (l'élimination des ciliés du rumen) a donc été étudiée par rapport à la production de méthane. Bien que, dans certains cas, les résultats de la défaillance sur les émissions de CH₄ n'aient pas été encourageants (**Hegarty et al., 2008**).

II.1.1.6. Les champignons

Les champignons du rumen du phylum *Neocallimastigomycota* (**Hibbett et al., 2007**), suscitent un intérêt grandissant depuis quelques années. Leur forte activité cellulolytique *in vitro* et le fait qu'ils colonisent abondamment les tissus ligno-cellulosiques *in vivo* laissent supposer qu'ils jouent un rôle important dans la dégradation des parois végétales (**Fonty et al., 1988**).

Les champignons anaérobies, comme les protozoaires, produisent des quantités abondantes de H₂, ainsi que du CO₂, du formiate et de l'acétate comme produits métaboliques finaux (**Gruninger et al., 2014**). Six genres fongiques ont été détectés dans le rumen ; *Anaeromyces*, *Caecomyces*, *Cyllamyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* et *Piromyces*. (**Koetschan et al., 2014**), mais des recherches moléculaires récentes suggèrent l'existence de plusieurs nouveaux taxons avec des fonctions encore à comprendre. Les méthanogènes se trouvent en étroite association avec les hyphes fongiques (**Bauchop, 1981**).

II.1.1.7. Les virus

Ils sont représentés par les bactériophages dont la densité est de 10⁷ à 10⁸ virions par gramme de contenu ruminal (**Klieve et Swain, 1993**). Une activité lytique a été mise en évidence à l'égard de plusieurs espèces bactériennes comme *Streptococcus bovis* (**Iverson et Millis, 1977**) ou *Bifidobacterium thermophilum* (**Matteuzzi et Sozzi, 1971**). Des phages filamenteux tempérés et virulents ont également été observés dans diverses espèces bactériennes (**Klieve et al., 1991**). Une espèce bactérienne peut devenir sous dominante à la suite d'une infection par un phage virulent. Elle peut alors être remplacée au sein de sa niche écologique par une autre espèce bactérienne, non sensible aux phages.

II.1.1.8. Biotransformation des constituants de la ration dans le rumen**a) Dégradation des protéines alimentaires**

Les protéines fournissent les acides aminés nécessaires pour le maintien des fonctions vitales, la croissance, la reproduction et la lactation. Les animaux non-ruminants ont besoin d'acides aminés préformés dans leur ration. Par contre, grâce aux microbes présents dans le rumen, les ruminants possèdent la capacité de synthétiser les acides aminés à partir d'azote non-protéique. Les protéines alimentaires sont dégradées par les micro-organismes du rumen d'abord en acides aminés et ensuite en ammoniac et acides gras branchés (**wallace et Cotta, 1988**) (**Fig. 5**).

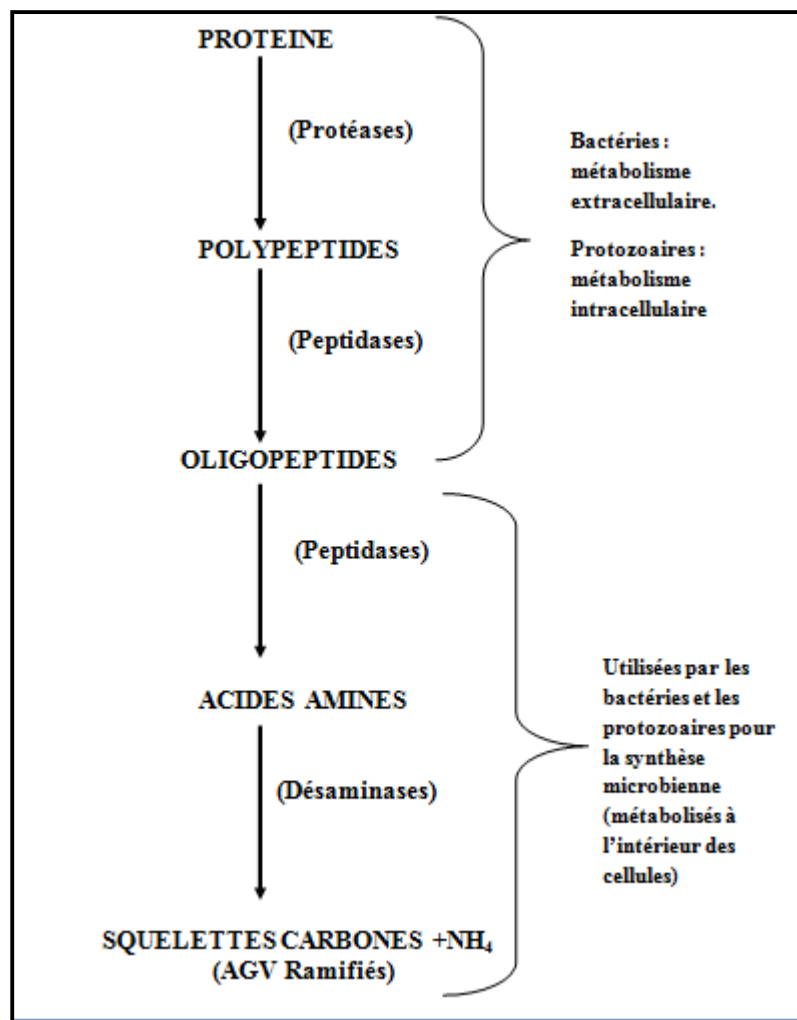


Figure 5. Dégradation de protéines dans le rumen (**Jouany, 1994**).

L'activité protéolytique dans le rumen dépend essentiellement de la densité de la population microbienne. La vitesse d'hydrolyse des protéines alimentaires est fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, comme leur solubilité ou leurs structures primaire,

secondaire et tertiaire (Jouany *et al.*, 1995). Les traitements technologiques que les matières premières peuvent subir, le tannage (Zelter *et al.*, 1970) ou des traitements thermiques (Colonna *et al.*, 1995), peuvent également modifier les vitesses d'hydrolyse des protéines.

b) Dégradation des lipides

Les rations de ruminants contiennent généralement de l'ordre de 3 à 5 % de lipides dans la MS, c'est-à-dire relativement peu par rapport aux teneurs en glucides et en matières azotées. Le rumen est le siège d'une lipolyse intense et rapide; les lipides alimentaires sont hydrolysés par les microorganismes du rumen, ce qui permet la production de glycérol et d'acides gras libres (Lourenço *et al.*, 2010). Le glycérol formé est rapidement fermenté en AGV, alors que les acides gras insaturés sont fortement remaniés par les microorganismes du rumen (Fig. 6). En outre, les microorganismes du rumen sont capables de synthétiser les lipides *de novo*, en utilisant comme substrats les acides gras à chaîne courte produits comme produits final du métabolisme des acides aminés. Ces activités d'hydrolyse, d'hydrogénation et de synthèse *de novo* de lipides microbiens dans le rumen contribuent grandement à la composition caractéristique des lipides tissulaires des ruminants (Harfoot, 1978).

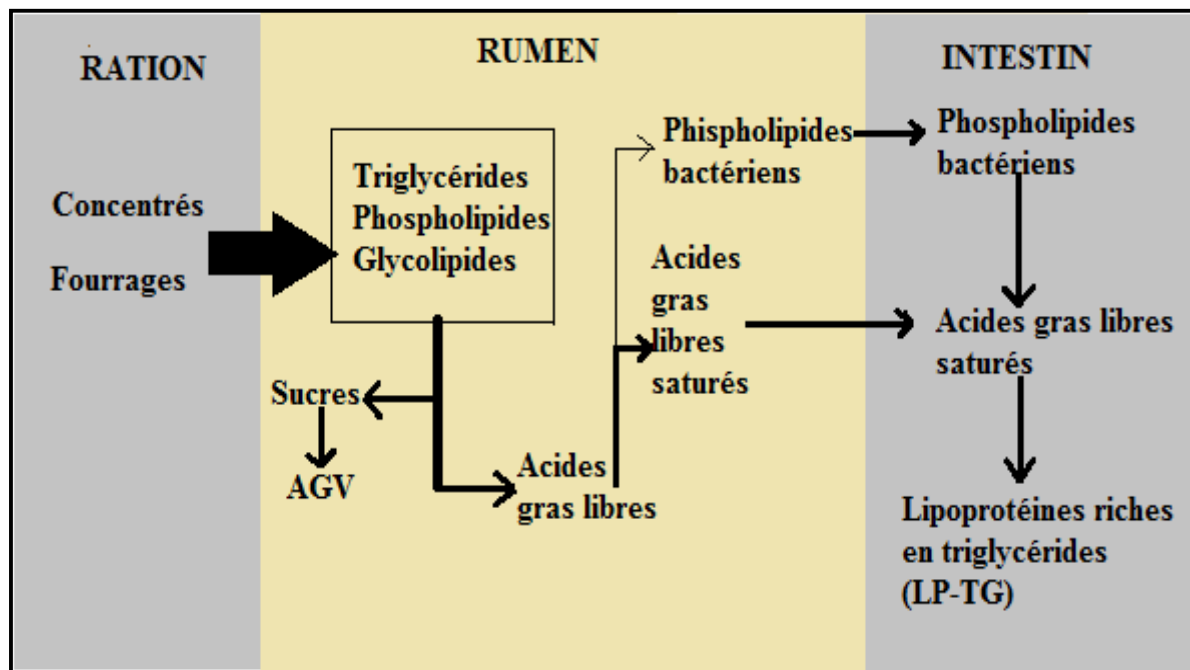


Figure 6. Métabolisme des lipides dans le rumen (Jenkins *et al.*, 2008).

c) Dégradation des glucides.

La dégradation des glucides fournit de l'énergie sous forme d'ATP utilisé par les microorganismes. Le profil de référence évoqué plus haut correspond à près de 2 mol ATP/mol AGV, ce rapport varie largement selon les voies fermentaires. Ainsi, il apparaît que la prise en compte de la production de CH₄ améliore nettement le rendement énergétique de la synthèse des AGV à nombre pair de C, et réduit celui de la synthèse des AGV à nombre impair de C (Sauvant *et al.*, 2011).

La dégradation des glucides dans le rumen s'effectue en deux phases : l'hydrolyse, puis la fermentation (Fig. 7). La phase d'hydrolyse consiste en la dégradation des polymères glucidiques en oses à 5 ou 6 atomes de carbone. Cette hydrolyse est réalisée par les enzymes produites par les microorganismes. Les oses ainsi produits sont ensuite fermentés par les microorganismes par le processus de glycolyse en molécules à 3 atomes de carbone (acide pyruvique). A partir de l'acide pyruvique, plusieurs voies métaboliques sont alors possibles aboutissant à la formation des AGV et du lactate (Russell et Wallace, 1988).

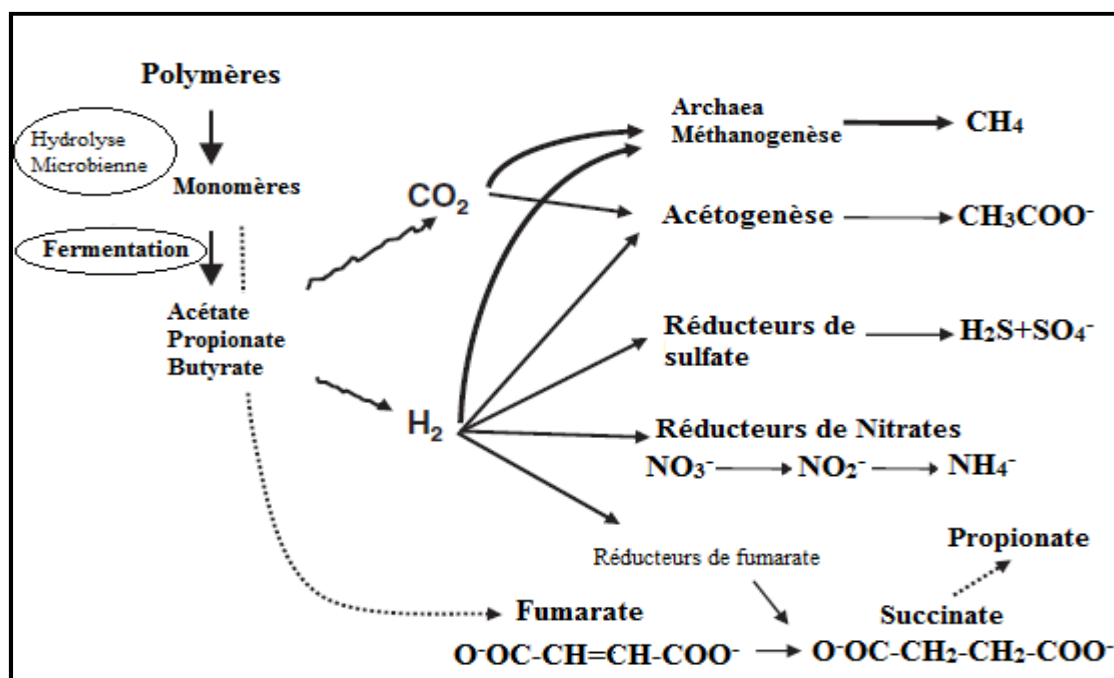


Figure 7. Métabolisme des glucides dans le rumen (Morgavi *et al.*, 2010).

II.1.2. Emission de méthane par les bovins

Chez toutes les espèces animales, les processus digestifs conduisent à l'émission de quantités très variables de méthane. Les ruminants, et parmi eux les bovins, produisent des quantités relativement importantes de méthane, en raison de l'abondance de la population microbienne dans le rumen et de son activité, nécessaire à la digestion des végétaux consommés. (Vermorel, 1995).

Une première estimation des quantités de méthane entérique produites par les animaux d'élevage a été proposée par Vermorel *et al.* (2008) sur la base des effectifs animaux de 2007. Elles s'élèvent à 1,41 millions de tonnes de CH₄ soit 35,25 millions de tonnes d'équivalent CO₂ dont plus de 90 % produits par les bovins.

Les vaches laitières constituent une catégorie spécifique dont les émissions peuvent être assimilées dans un premier temps à celles nécessaires à la production de lait. Les vaches laitières représentent 34% des émissions de méthane des bovins (IPCC, 2006). Au sein de ces émissions imputables à l'élevage bovin, la fermentation entérique est le plus important poste d'émission (environ 70 %) comparativement à la gestion des déjections qui sont responsables d'environ 30 % de ces émissions (Gerger *et al.*, 2013).

L'émission de méthane d'une vache laitière est comprise entre 140 et 160 m³ par an pour une production laitière variant de 3 400 à 6 500 kg. La quantité de méthane émise en moyenne par kg de lait passe de 41 à 25 litres pour cette même plage de production. L'émission de méthane d'une vache allaitante est en moyenne de 120 m³/an. Celle des bovins en croissance se situe entre 56 et 78 m³/an selon la vitesse de croissance et le type de production. En revanche, l'émission de méthane par kg de carcasse produite diminue lorsque la vitesse de croissance augmente ; elle se situe entre 0,32 et 0,49 m³/kg pour les bovins de races laitières et entre 0,58 et 1,04 m³/kg pour les bovins de races bouchères si on inclut la production de méthane de la mère pendant un an. (Vermorel, 1995).

II.1.3. Emission de méthane par les volailles

Une grande variété d'espèces microbiennes colonise les intestins des animaux monogastrique comme les volailles, y compris *Bacteriodes spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Enterococcus spp.*, *Eubacterium spp.* et *Lactobacillus spp.* La plupart de ces microorganismes hydrolysent les polysaccharides en acides gras volatils à chaîne courte (AGV), en hydrogène et en dioxydes de carbone comme produits de fermentation primaires (Wolin *et al.*, 1997). Certains produits finis de fermentation tels que l'hydrogène sont utilisés par un deuxième

groupe de microorganismes (c'est-à-dire des méthanogènes) pour produire du méthane (**Woese *et al.*, 1990**).

Des études *in situ* et *in vitro* ont démontré que différents types de substrats influencent sur la production de méthane dans le caecum de poulet (**Marounek *et al.*, 1999**). En outre, l'âge des oiseaux peut être un (Marounek *et al.*, 1998). En mesurant l'hybridation fluorescente *in situ*, des méthanogènes ont été trouvés à partir d'échantillons de poussins très jeunes (**Zhu *et al.*, 2003**). Cependant, seule une souche de méthanogène (*Methanogenium sp.*) a été isolée jusqu'à présent des excréments de poulet (**Miller *et al.*, 1986**).

II.1.4. Emission de méthane par les porcs

Dans un contexte mondial, les 12 millions de porcs du Danemark contribuent avec 1,3% de la population mondiale de porcs. Le nombre principal de cochons est en Asie (59,6%) où la population porcine principale reste en Chine (47,8% de la population mondiale de porcs). (**FAOSTAT, 2009**).

La fermentation entérique est le processus digestif par lequel les hydrates de carbone sont décomposés par des microorganismes en molécules simples pour l'absorption dans la circulation sanguine de l'animal. La majorité des glucides sont digérés par des enzymes endogènes dans l'intestin grêle du porc, mais la fraction de fibres alimentaires sera fermentée principalement dans les intestins inférieurs, ce qui entraîne la production d'acides gras à chaîne courte (acide acétique, propionique et butyrique), des gaz (dioxyde de carbone (CO₂), de l'hydrogène (H₂) et du méthane (CH₄)), de l'urée et de la chaleur (**Jensen et Jørgensen, 1994**).

Le principal contributeur alimentaire à l'émission entérique de CH₄ à tous les poids vifs des porcs est la concentration alimentaire de fibres, alors qu'aucune graisse alimentaire ou protéine n'a eu d'impact significatif sur les émissions de CH₄. Le manque d'effet de la graisse alimentaire sur l'émission de CH₄ est dû à une très grande digestibilité de la graisse dans l'intestin grêle (**Jørgensen *et al.*, 2011**).

II.2. L'émission de méthane par région

L'émission du méthane varie considérablement par région (**Fig. 8**). Cette variation est expliquée par la distribution de ruminants ou monogastriques dans la production animale totale, et par les différences dans les intensités d'émission pour chaque produit, entre régions. L'Amérique latine est le plus haut niveau d'émissions (près de 1,3 gigatonnes de GES), grâce à une importante production de bœuf spécialisé.

Avec la production animale la plus élevée et les intensités d'émission relativement élevées pour les bœufs et les porcs, l'Asie de l'Est a le deuxième niveau d'émissions le plus élevé (plus de 1 gigatonnes). L'Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest ont des sommets d'émissions de GES similaires (plus de 0,6 gigatonnes).

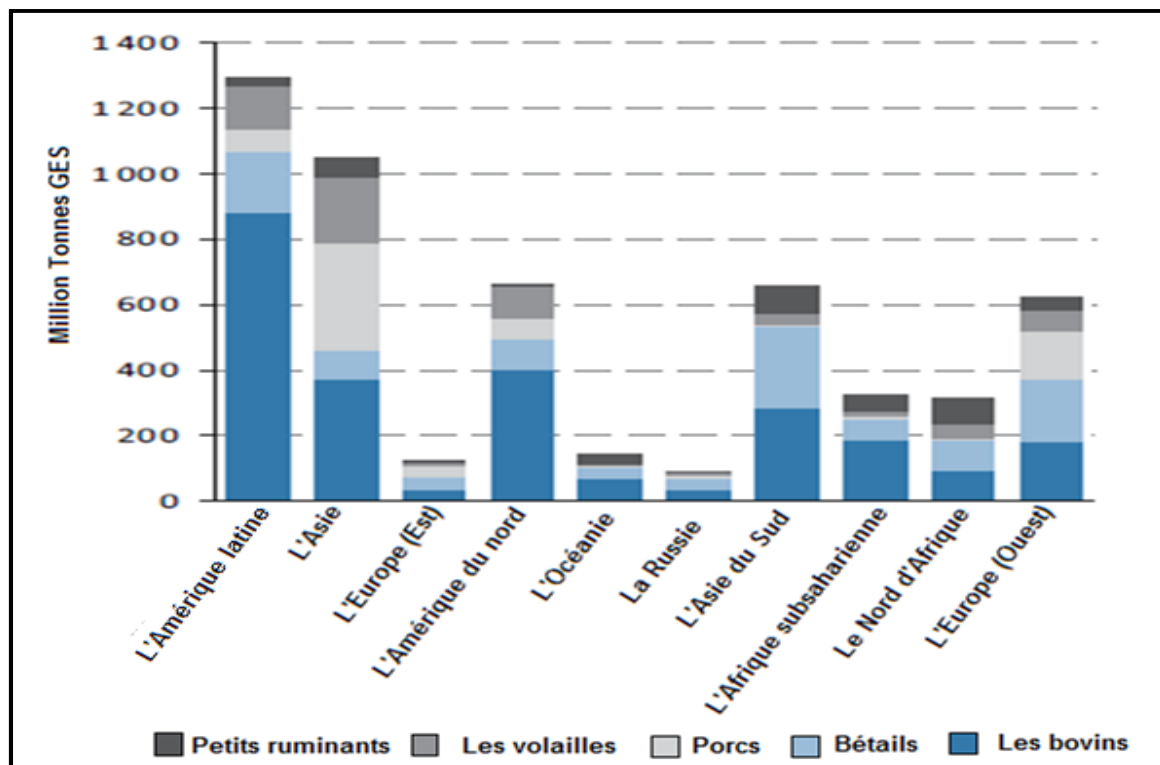


Figure 8. L'émission de GES par région (Gerger *et al.*, 2013).

Cependant, les modèles d'émission sont différents. En Amérique du Nord, près de deux tiers des émissions proviennent de la production des bovins qui ont des intensités d'émission élevées. En Amérique du Nord, les intensités d'émission pour les volailles et le porc sont inférieures à celles de l'Europe occidentale parce que la région dépend généralement de l'alimentation avec une plus faible intensité d'émission. Les émissions totales du secteur Asie du Sud sont au même niveau que l'Amérique du Nord et l'Europe de l'Ouest. Les ruminants apportent une grande influence en raison de leur forte intensité d'émission. Pour la même raison, les émissions dans l'Afrique subsaharienne sont importantes (Gerger *et al.*, 2013).

II.3. Le secteur de l'élevage en Algérie

En Algérie, la production animale joue un rôle important dans l'économie nationale en pourvoyant en produits d'origine animale la consommation locale et l'exportation (Mayouf et Arbouche, 2014). L'élevage concerne les ovins, les caprins, les bovins et les camelins.

La structure des élevages varie selon les zones agro-écologiques, elle est dominée par l'élevage bovin (72%) dans la zone du Tell littoral, par l'association ovins/bovins dans les zones céréalières et sub-littorales, les ovins en zones steppiques (75%) et les camelins en zones sahariennes (56%). Les besoins alimentaires de ce cheptel sont estimés pour l'année 2001 à 10,5 milliards d'unités fourragères (**Adem et Ferrah, 2002**).

III. Les facteurs influençant la production du méthane

Plusieurs facteurs peuvent influencer la production du méthane dans le rumen, Certains sont liés à la ration (type, quantité), d'autres sont liés à l'animal.

III.1. Influence du régime alimentaire sur la production de CH₄

Les pertes d'énergie sous forme de CH₄ augmentaient avec la digestibilité du régime. Cet accroissement dépend toutefois des caractéristiques des ingrédients du régime. Par exemple, le broyage des fourrages diminue leur temps de séjour dans le rumen, ce qui réduit la digestibilité des parois végétales et la production de CH₄ (**Blaxter et Clapperton, 1965**).

D'autre part, la proportion de l'énergie brute perdue sous forme de CH₄ était réduite avec l'augmentation de la prise alimentaire, c'est-à-dire du niveau de production et de la vitesse de passage des particules dans les compartiments du système digestif (**Beever, 1993**).

III.2. Influence de type de substrat (ration de base de l'animal)

Le type d'alimentation influe grandement sur la quantité de méthane produite par l'animal. Lorsque les quantités ingérées augmentent et que l'alimentation est riche en concentré (donc pauvre en parois végétales) ou en acides gras polyinsaturés (acide linoléique), les pertes d'énergie sous forme de méthane diminuent. L'intensification animale permet donc de réduire sensiblement la production de méthane par kg de lait. Mais tous les concentrés n'ont pas le même effet sur la production de méthane. Ainsi, les concentrés riches en amidon (orge, blé, maïs) ont un effet dépressif sur la méthanogénèse plus important que les concentrés riches en parois digestibles (pulpes de betterave) (**Blaxter et Clapperton, 1965**).

Chez la vache laitière, le remplacement des pulpes de betteraves (70% de la ration) par de l'orge a entraîné une diminution de 34% des pertes d'énergie sous forme de méthane. Il se trouve que l'amidon est à l'origine d'une orientation des fermentations ruminales vers la formation de propionate qui mobilise l'hydrogène métabolique et diminue la production de méthane (**Martin et al., 2006**). En outre, l'addition importante ou la substitution de concentré à un fourrage entraîne une diminution de la digestion des parois végétales dans le rumen et donc de la méthanogénèse. Les pertes énergétiques sous forme de méthane sont relativement

constantes pour des niveaux d'apport de concentré faibles, mais elles chutent au-delà de 40% de concentré dans la ration.

III.3. Influence de la vitesse de fermentation

Il semblerait que la diminution du temps de séjour des aliments dans le rumen soit l'un des leviers importants de la diminution de la quantité produite de méthane d'origine entérique. De fait, le broyage des fourrages permettrait d'augmenter la digestibilité de ceux-ci et donc de diminuer leur temps de séjour dans le rumen. De même, une ingestion d'une quantité plus importante d'aliments réduit leur temps de séjour dans le rumen et augmente la production de lait faisant ainsi diminuer la quantité de méthane émise par litre de lait (malgré une augmentation d'émissions par animal) (**Hacala et al., 2006**).

III.4. Influence du taux de protozoaires dans le rumen

La variation de la méthanogenèse est liée à des populations microbiennes ruminales différentes, dont la nature pourrait être déterminée par la cinétique de salivation et, donc, de vidange du rumen. Le pH et l'activité des protozoaires sont également deux paramètres de la cinétique et du volume du contenu du rumen (**Demeyer et Fievez, 2000**).

La population de protozoaires peut varier énormément entre animaux nourries avec la même ration. avec des taux de protéines issus de protozoaires variant de 0,01 à 5,73 mg.ml⁻¹ dans le rumen de 22 vaches en lactation, nourries avec la même ration distribuée ad libitum (**Teather et al., 1984**).

La présence de protozoaires est associée à des taux de méthanogenèse importants et un renouvellement élevé des protéines microbiennes dans le rumen, mais ils assurent aussi une limitation des productions d'AGV et donc de chute du pH, en raison du stockage temporaire de glucides solubles et d'amidon (**Nagaraja et al., 1992**). Il n'est donc pas surprenant que les tentatives récentes d'estimation de la méthanogenèse par l'animal soient sujettes à une variabilité considérable, principalement déterminée par le taux des protozoaires ruminants, des différences de composition et de quantité d'aliment ingérée et des caractéristiques particulières de l'animal.

IV. Méthodes de mesure de l'émission de méthane**IV.1. Les modes d'expression de la production de CH₄**

La production du méthane est exprimée dans des unités très variables : en énergie (kcal ou MJ), en volume ou en masse. De plus, la base d'expression varie très largement, ainsi, le CH₄ produit peut être exprimé par animal, ou par kg de poids vif pour pouvoir comparer bovins, ovins et caprins entre eux (**Sauvant *et al.*, 2006**), ou par unité de produit élaboré (kg de lait, carcasse, viande...).

Cette diversité d'unités et surtout de modes d'expression de la production de CH₄ peut soulever la question de l'interprétation des résultats publiés. En effet, selon l'expression, des conclusions peuvent être contradictoires ou prêter à une interprétation erronée, voire risquée. Par exemple, les ruminants dont le potentiel de production est faible, recevant une ration pauvre produisent bien moins de CH₄ par animal que les ruminants à potentiel de production élevé et alimentés avec des rations riches. En revanche, ils produisent plus de CH₄, exprimé par unité de produit ou bien de quantités ingérées (**Sauvant *et al.*, 2011**).

IV.2. Techniques de mesure de l'émission de CH₄

Différentes méthodes ont été développées dans le but de quantifier les émissions de méthane des ruminants. Les méthodes les plus connues sont la calorimétrie indirecte, la technique du traceur d'hexafluorure de soufre et la technique de production de gaz *in vitro*.

IV.2.1. Calorimétrie indirecte

Les mesures des émissions de CH₄ des ruminants ont été mises en évidence en utilisant des techniques de calorimétrie indirecte, qui basent sur le calcul de la consommation d'énergie par la consommation d'oxygène et l'expiration du CO₂ (**Blaxter, 1989**). En revanche, la calorimétrie directe détermine la dépense énergétique d'un animal en mesurant directement la production de chaleur.

L'utilisation prédominante des calorimètres a consisté à mesurer l'échange gazeux dans le cadre des mesures de l'équilibre énergétique, la perte de CH₄ étant une partie nécessaire de cette procédure. Il existe différents modèles de calorimètres, ils peuvent être des calorimètres fermés ou à circuit ouvert, les systèmes à circuit ouvert étant les plus courants (**Pinares-Patiño et Clark, 2008**). Les systèmes de circuit ouvert impliquent le flux continu d'air extérieur circulant autour de la tête, de la bouche et du nez de l'animal et bien mélangé à l'intérieur, l'air est collecté. La différence entre la quantité de CH₄ dans l'entrée et la sortie de l'air permet de déterminer les émissions de CH₄. En revanche, dans les systèmes en circuit

fermé, les absorbants de CO₂ maintiennent la circulation de l'air, la qualité (l'humidité et la température) et la concentration de CO₂. Ainsi, le circuit fermé ne doit pas avoir de fuite d'air pour assurer une mesure précise des émissions de gaz. Un inconvénient particulier de la technique de la respiration en circuit fermé est que malgré le conditionnement, des émissions gazeuses ne peuvent être mesurées que pour de très courtes périodes, car les animaux risquent de ne plus avoir d'oxygène (**Ibáñez Sanchis, 2015**).

Plusieurs techniques de calorimétrie indirecte peuvent être distinguées ; telles que les chambres de fermentation, les boîtes de tête ou les hottes ventilées et les masques faciaux.

- *Chambres respiratoires ou chambres entières d'animaux*: l'animal est placé dans une chambre à circuit ouvert pendant plusieurs jours, les entrées (alimentation et oxygène) et les sorties (excrétion, CO₂ et CH₄) sont bien mesurées (**Miller et Koes, 1988**). La chambre doit être bien scellée (**Annexe 1**), cela garantit qu'aucune perte de CH₄ n'aura lieu. Le mouvement des animaux et le comportement normal devraient être fournis autant que possible, mais un certain degré de contrainte est nécessaire dans la chambre.

Cette technique permet à effectuer des mesures précises des émissions, y compris le CH₄ provenant des fermentations ruminal, mais il existe des difficultés à dériver des valeurs applicables aux ruminants de pâturage, ainsi il peut y avoir une restriction du mouvement des animaux.

- *Coffres de tête ou hottes ventilées*: Un capot ventilé pourrait également être utilisé pour quantifier les émissions de CH₄ (**Takahashi et al., 1999**). Cette technique implique l'utilisation d'une boîte hermétique qui entoure la tête de l'animal (**Annexe 1**).

Un manchon ou un drap pourrait être placé autour du col de l'animal pour minimiser les fuites d'air. La boîte doit être suffisamment grande pour permettre à l'animal de se déplacer de manière illimitée et permet d'accéder à l'alimentation et à l'eau.

L'avantage principal de cette technique est le coût relativement inférieur rapport à une chambre entière d'animaux. Comme pour la chambre, l'utilisation d'un capot nécessite également un animal restreint et entraîné

- *Masques faciaux*: Ces masques peuvent également être utilisés pour quantifier la production de CH₄ (**Liang et al., 1989**). Le principe de l'utilisation de la façade est le même que celui de la chambre et du capot.

En raison de la variation quotidienne normale des émissions, les mesures d'émission de CH₄ par cette technique sont difficiles et, par conséquent, les mesures à court terme peuvent entraîner des résultats erronés (**Johnson et Johnson, 1995**).

IV.2.2. Technique du gaz traceur SF₆

La technique SF₆ a d'abord été développée par **Johnson *et al.*, 1994**, le SF₆ est un gaz fréquemment utilisé en raison de sa détection facile et de sa grande inertie chimique. C'est une méthode souvent utilisée comme référence par rapport à d'autres techniques, elle repose sur le principe de la dilution d'un gaz traceur inerte introduit dans le rumen, capable de se mélanger aux autres gaz issus des fermentations (CH₄, CO₂) (**Popova, 2011**).

Le gaz traceur SF₆ est introduit dans le rumen à l'aide d'une capsule perméable (**Annexe 1**), dont la vitesse de diffusion est préalablement déterminée *in vitro* (**Martin *et al.*, 2008**).

La méthode du rapport de concentration avec un gaz traceur implique d'émettre le gaz traceur SF₆ de telle manière qu'il se mélange bien aux CH₄ émis par le lisier. Les rapports des taux d'émission de SF₆ et des GES sont identiques aux rapports des concentrations du traceur et des GES. Puisque le flux d'émission de traceur est contrôlé et connu, les flux d'émission des GES peuvent être calculés (**Pinares-Patiño et Clark, 2008**).

Le SF₆ (pur à 99.5%) est libéré à un débit précis à l'aide d'un débitmètre massique et enregistré par un système d'acquisition de données automatisé. Un chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'un détecteur à capture d'électrons mesure les concentrations en SF₆, CH₄, N₂O et CO₂ aux points de mesure. Les concentrations mesurées, la concentration en gaz traceur et le débit du gaz traceur au point d'injection sont utilisés pour calculer des taux d'émission de CH₄ (**Boadi *et al.*, 2002; Vlaming *et al.*, 2007**).

IV.2.3. Technique de production de gaz *in vitro*

Cette technique a été développée par **Menke *et al.*, 1979**, par l'utilisation d'un système de seringues afin de mesurer le volume de gaz produit *in vitro*. Le principe de base de cette technique est de fermenter les aliments dans des conditions de laboratoire contrôlées en utilisant le microbiote ruminal naturel, et les fermenteurs avec un mélange de fluide de rumen, de tampon et de minéraux sont incubés à 39°C pendant une certaine période de temps, typiquement 24, 48, 72, 96 ou 144 h (**Storm *et al.*, 2012**).

La quantité de gaz total produite pendant l'incubation est mesurée et sa composition est analysée, pour obtenir des données sur la production *in vitro* de méthane. Dans le même temps, il est possible de déterminer la dégradation *in vitro* des aliments, ce qui permet de déterminer la digestibilité et le taux de réduction du méthane.

IV.2.4. Le détecteur laser de méthane (LMD)

Il s'agit d'une technique de mesure relativement récente : ce laser fonctionne sur le principe de la spectroscopie. L'appareil mesure la concentration de CH₄ dans le volume situé entre le point ciblé par le laser et lui-même. Les résultats sont fournis par l'appareil en partie par million (ppm) (**Chagunda et al., 2009**). Pour réaliser les mesures, il faut donc se placer à la tête de l'animal et pointer avec le laser la zone où l'on souhaite faire le prélèvement (**Chagunda, 2013**).

De nombreuses mesures peuvent être effectuées rapidement sur un grand nombre d'animaux. La méthode est peu invasive et permet de se déplacer facilement de ferme en ferme. En évitant le contact entre l'opérateur et l'animal, ce système garantit une certaine sécurité de la personne qui prend les mesures.

Enfin, sur les mesures réalisées jusqu'à présent, le système semble donner des résultats d'une fiabilité équivalente aux chambres respiratoires, sans toutefois présenter l'ensemble des avantages de ces dernières (**Chagunda, 2013**).

Cette technique a comme inconvénients :

Les mesures sont loin d'être continues. La durée d'échantillonnage est très réduite, de l'ordre de quelques secondes. Or, la vache n'a pas une éructation continue. Il manque encore des informations sur le nombre de mesures qu'il faut réaliser avec ces appareils sur les animaux pour avoir une répétabilité suffisante (**Chagunda, 2013**).

De plus, chacun peut pointer la zone qu'il veut. Aucune standardisation stricte du procédé n'est réellement possible. Enfin, très peu d'études ayant utilisé le LMD ont été réalisées jusqu'à présent (**Chagunda, 2013**).

V. Le méthane et l'effet de serre

L'élevage de ruminants (bovins, ovins, caprins) exerce une influence sur le climat à travers l'émission de gaz à effet de serre (GES).

L'augmentation de la quantité de gaz à effet de serre est devenue un sujet mondial important en raison de leurs effets sur le réchauffement climatique et par conséquent sur le changement climatique. Les effets de ces émissions sont bien observés et continueront de croître à l'échelle régionale et mondiale dans les années à venir.

Les gaz à effet de serre sont un groupe de composés capables de piéger la chaleur dans l'atmosphère. Ces gaz absorbent et émettent des rayonnements dans la gamme infrarouge thermique et sont la cause fondamentale de l'effet de serre.

Les gaz à effet de serre affectent considérablement la température de la Terre, ce qui réduit la surface de la Terre plutôt que si elle n'était pas présente. Trois GES sont émis dans le cadre des activités liées à l'élevage de ruminants, et plus largement en agriculture : le dioxyde de carbone (CO_2), le méthane (CH_4) et le protoxyde d'azote (N_2O).

L'accumulation des gaz à effet de serre prend de nombreuses années pour quitter l'atmosphère. Le dioxyde de carbone, le méthane, l'oxyde nitreux sont tous des gaz bien mélangés dans l'atmosphère. Ils ne réagissent pas aux changements de la température ou de la pression de l'air et ne doivent donc pas être éliminés facilement comme de l'eau qui se condense pour devenir de la pluie ou de la neige. Leur longue durée de vie atmosphérique leur permet d'avoir un effet durable sur le réchauffement climatique et le changement climatique. La vapeur d'eau, d'autre part, a un temps de séjour de quelques jours. C'est une composante très active du système climatique qui réagit rapidement aux changements de conditions en condensant en pluie ou en neige ou en évaporant pour revenir à l'atmosphère. Ainsi, l'impact de l'effet de serre est principalement diffusé à travers la vapeur d'eau, et il agit comme un retour rapide, ce qui augmente le réchauffement fourni par les gaz à effet de serre (O'Mara, 2011).

Bien que sa concentration dans l'atmosphère soit très inférieure à celle du CO_2 , le méthane contribue à environ 16% des émissions mondiales de gaz à effet de serre. L'oxyde nitreux et les gaz fluorés sont responsables de 10% des émissions totales et le CO_2 est responsable de 74% de l'émission (Fig. 9).

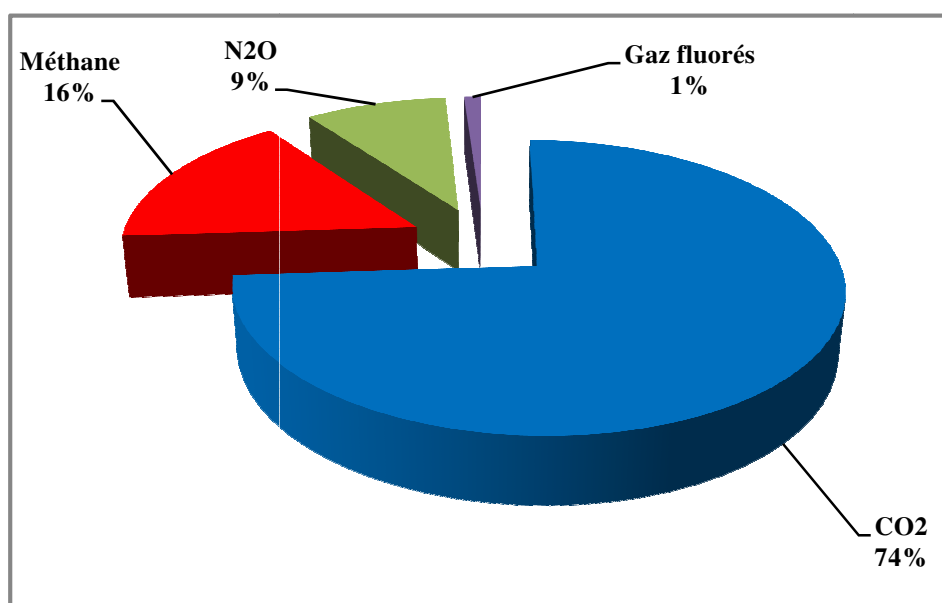


Figure 9. Les gaz responsables de l'effet de serre (Sanchis, 2015).

Les niveaux de CH₄ ont augmenté de façon spectaculaire au cours des 200 dernières années, il augmente de 1,3% par an pendant la majeure partie du 20^{ème} siècle jusqu'au début des années 1990 (**Blake et Rowland, 1988**).

Le méthane (CH₄) possède un pouvoir de réchauffement environ 20 fois plus élevé par unité de poids que celui du dioxyde de carbone (CO₂). Cet effet est amplifié par le fait que le méthane contribue à la production d'ozone (dans les basses couches) et de vapeur d'eau (dans la basse stratosphère), deux autres gaz à effet de serre. En retour, le climat influence aussi le cycle du méthane, notamment via les surfaces de zones inondées et les processus d'émissions biogéniques, qui dépendent fortement des conditions climatiques (**Seguin et Soussana, 2008**).

Outre son action directe évidente sur l'effet de serre, le méthane joue un rôle plus insidieux à travers plusieurs influences indirectes :

- Son utilisation comme combustible dégage du dioxyde de carbone et de la vapeur d'eau (CH₄ + 2O₂ → CO₂ + 2H₂O), qui sont deux gaz à effet de serre très importants.
- Les océans peuvent stocker de grandes quantités de méthane et de dioxyde de carbone : ce sont des puits de carbone. Cependant les quantités qu'il peut stocker sont, bien entendu, limitées et plus il stocke de méthane et moins il pourra stocker de dioxyde de carbone. Ce problème est préoccupant car avec une élévation des températures, la solubilité du méthane dans l'eau va diminuer. De plus, les scientifiques suspectent qu'au-delà d'une certaine température limite, les courants océaniques entraînant des eaux de surface vers les profondeurs ne cessent complètement. Or c'est justement les parties inférieures des océans qui représentent les plus grands puits de carbone (**Wahlen, 1993**).

Chapitre II

Les produits de ruminants constituent une partie importante de l'alimentation humaine. La demande de produits de ruminants devrait augmenter en raison de l'augmentation de la population humaine et de sa richesse croissante. La production de viande et de lait de ruminants est associée à un impact environnemental relativement important par rapport aux autres produits d'origine animale. Ceci est, en grande partie, causé par la production du méthane par les ruminants, un gaz à effet de serre, pendant la digestion de leurs aliments (**Sander, 2011**). Le méthane est produit dans le rumen par les *Archaea* méthanogènes à partir de l'hydrogène issu de la fermentation des glucides. La voie biochimique de l'acétate produit de l'hydrogène, alors que celle du propionate en consomme, ce qui explique la relation positive entre la production de méthane et le rapport acétate/propionate du rumen (**Sauvant et al., 2011**).

De nombreuses stratégies alimentaires ont été proposées pour réduire la production de méthane chez les ruminants, bien que la plupart d'entre elles n'aient été pas testées *in vitro*.

I. La réduction du méthane par l'utilisation des additifs

La réduction des émissions de méthane (CH₄) entérique représente un intérêt nutritionnel et environnemental. L'utilisation d'additifs alimentaires est une alternative pour réduire l'émission brute de CH₄ par les ruminants (diminution d'environ 10 % des émissions de CH₄, **Doreau et al. 2011**).

I.1. Les antibiotiques et les additifs chimiques

La vaccination des animaux contre les *Archaea* méthanogènes permettrait de diminuer la production de CH₄ sans altérer la digestion, la performance animale ou la qualité des produits (**Wright et al., 2004**). Il s'agit d'une stimulation du système immunitaire de l'animal afin de produire des anticorps antiméthanogènes qui *via* la salive rejoindront le rumen où ils inhiberont les *Archaea*.

Le «monensin» et le «lasalocide», sont une catégorie d'antibiotiques dotés de propriétés spécifiques (stimulation du transport actif des cations et réduction de la production d'ATP) qui se traduisent par une toxicité *vis-à-vis* des bactéries à gram positif (**Jouany 1994**), ils sont cités comme un moyen possible de réduire les émissions de méthane (**Moran et al., 2011**).

Cette réduction est le résultat indirect d'une diminution de la production d'ions d'hydrogène. Un autre antibiotique promoteur de croissance, la flavomycine, a montré une certaine

efficacité *in vivo* pour réduire la production de méthane dans un essai de courte durée (Wang *et al.*, 2009).

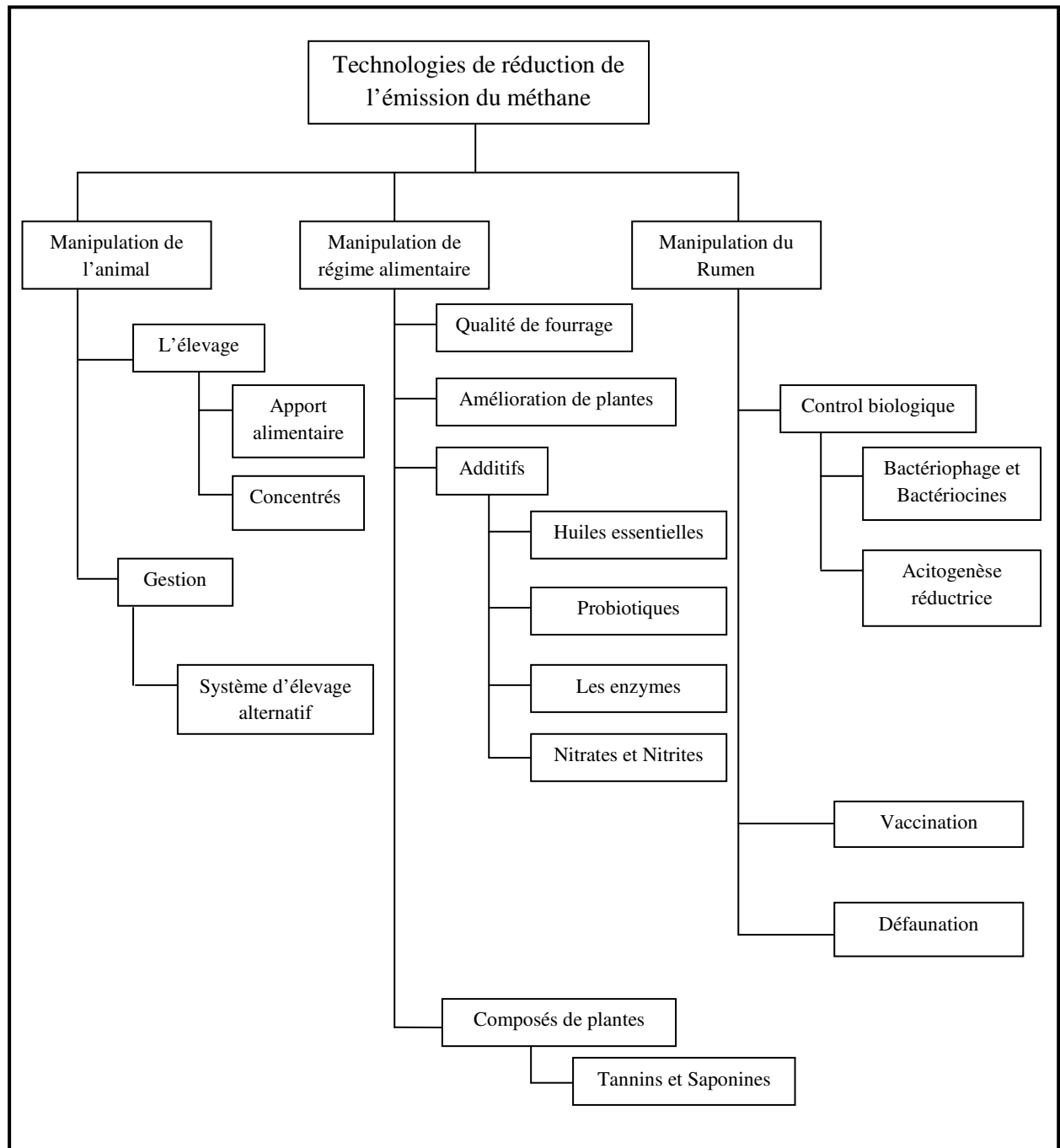


Figure 10. Schéma résumant les stratégies de réduction du méthane chez les ruminants (Rira, 2015).

Cependant, une certaine adaptation des microorganismes méthanogènes aux ionophores est un point important à prendre en compte afin de prévoir l'efficacité d'un antibiotique à long terme. En effet, une reprise totale de la production de CH₄ a été observée après deux semaines de traitement aux ionophores chez des bovins recevant une ration riche en concentrés (**Rumpler et al., 1986**). Egalement, la formulation de molécules «universelles» nécessite encore des recherches. Une autre difficulté de cette stratégie est la production d'une réponse immunitaire adéquate, ainsi que le mode d'administration des vaccins ou des anticorps dans le rumen en conditions d'élevage.

I.2. Les extraits de plantes

Certaines plantes ou extraits de plantes peuvent en effet modifier l'orientation des fermentations ruminales par leurs propriétés bactéricides et avoir des effets voisins de ceux obtenus avec les antibiotiques (**Busquet et al., 2005**). Contrairement aux antibiotiques et aux additifs chimiques, ce type de produit bénéficie d'une bonne image en raison d'une origine naturelle.

Ces dernières années, l'exploration de phyto-molécules bioactives en tant qu'additifs alimentaires naturels a reçu une grande attention de la part des nutritionnistes et des microbiologistes du rumen pour modifier favorablement les fermentations (**Patra et Saxena 2011**). Un grand nombre de molécules végétales, telles que les saponines, les tannins, de même que les huiles essentielles ont sollicité l'intérêt des chercheurs par leur capacité à inhiber la méthanogenèse, améliorer le métabolisme des protéines et la productivité animale (**Jouany et Morgavi, 2007**).

II. La réduction du méthane par manipulations de l'écosystème microbien

II.1. La défaunation

L'élimination des protozoaires du rumen permet à la fois de diminuer la production d'hydrogène et de supprimer la fraction d'archaea méthanogènes fixée à la surface et dans les cellules des protozoaires ciliés, ce qui explique la baisse de la méthanogenèse de 30 à 40 % généralement observée après la défaunation du rumen (**Vermorel et Jouany, 1989**).

Cependant, des études récentes conduites à l'INRA ont montré que l'effet de la défaunation sur la production de méthane disparaît après une longue période (environ 12 mois). En outre, la défaunation améliore la digestion de l'azote mais diminue celle des parois végétales (**Martin et al., 2006**).

Sur un plan pratique, la défaunation peut être obtenue à l'aide d'agents chimiques doués de pouvoir tensio-actif puissant, d'extraits de plantes riches en saponines, ou de certains acides gras. Il est vraisemblable que les agents chimiques ou les saponines utilisées pour défauner ne seront pas autorisés compte tenu de leur toxicité potentielle à l'égard des animaux et de leur possible transfert dans les produits animaux destinés à la consommation humaine (**Martin et al., 2006**).

Les voies d'approche les plus prometteuses pour réduire la production ruminal de CH₄ consisteraient à rechercher de nouveaux produits doués d'activité antiméthanogéniques ou à favoriser la formation d'accepteurs d'électrons autres que CO₂ ou le formate, ou à agir dans le sens d'une réduction de la population de protozoaires. Cette réflexion globale sur la contribution des ruminants à l'effet de serre doit tenir compte du fait que ces animaux jouent un rôle essentiel dans l'équilibre de notre écosystème en transformant l'importante biomasse végétale mondiale en protéines animales (viande et lait principalement) qui constituent la base de l'alimentation humaine. Cet aspect doit contrebalancer les aspects négatifs liés à la production de méthane et à ses conséquences (**Angela et al., 2000**).

II.2. Les agents biologiques

L'effet des probiotiques sur la production de méthane est difficile à apprécier car les résultats bibliographiques sont variables. Certains auteurs ont mis en évidence une diminution de la méthanogenèse chez les animaux traités par *Aspergillus oryzae* ou par *Saccharomyces cerevisiae* ; d'autres que n'ont pas observé d'effet ou ont noté une augmentation de la production de méthane (**Takahashi et al., 1997**).

Il faut cependant préciser que peu d'études ont été entreprises sur les probiotiques avec l'objectif ciblé de réduire la méthanogenèse. Leur faible coût, permet d'envisager leur utilisation dans le cas où leur efficacité est démontrée. L'ajout des bactéries acétogènes dans le rumen (*Peptostreptococcus productus*) stimule la voie d'acétogenèse réductrice à la condition stricte que les bactéries méthanogènes aient été préalablement inhibées par l'ajout de probiotique (*Lactobacillus plantarum*) (**Nollet et al., 1997**).

Une compétition existe entre les bactéries méthanogènes et acétogènes pour l'utilisation de l'hydrogène dans le rumen et les méthanogènes sont toujours dominantes.

La faible affinité des acétogènes pour l'hydrogène en comparaison de celle des méthanogènes d'un part, et leur caractère hétérotrophe qui les incite à utiliser d'autres sources de carbone

que le CO₂ d'autre part, sont à l'origine de la faible contribution des acétogènes à la fixation de l'hydrogène ruminal (**Martin *et al.*, 2006**).

Bien que le rumen soit un milieu fortement anaérobie, des bactéries capables d'oxyder le méthane ont pu en être isolées. La part de CH₄ naturellement oxydé dans le rumen ne représente que 0.2 à 0.5 % du méthane produit et la possibilité de l'augmenter reste faible (**Kajikawa *et al.*, 2003**).

Une technique de vaccination de ruminants contre les méthanogènes a été développée en Australie au cours des 5 dernières années. Elle a permis de réduire de 8% la production de méthane sans effet négatif apparent sur les animaux (**Wright *et al.*, 2004**). Le vaccin ne serait toutefois efficace que sur une fraction des archae méthanogènes et l'effet à long terme n'est pas connu.

III. La réduction du méthane par modification du système d'élevage

Les émissions de méthane par kg de matière sèche ingérée varient selon les différents types de fourrages à base d'herbe (herbe fraîche, ensilage, foin). En fait, les fourrages les plus digestibles émettent plus par kg de matière sèche ingérée que les fourrages les moins digestibles, mais ils fournissent également plus de nutriments énergétiques (acides gras volatils).

L'augmentation du niveau d'ingestion des animaux réduit le temps de séjour des aliments dans le rumen, ainsi que la part de la digestion de la matière organique dans le rumen et, de ce fait, la méthanogenèse (**Vermorel, 1995**).

III.1. Proportion de concentrés

La production relative de méthane (en % de l'énergie ingérée) décroît lorsque le niveau alimentaire s'accroît ou lorsque la digestibilité de la ration est améliorée. Plusieurs études ont montré que la production relative de méthane entérique diminue lorsque la proportion de concentrés augmente dans la ration (**Martin *et al.*, 2008**). Pour sa part, l'ensilage de maïs entraîne généralement des émissions légèrement plus faibles que les fourrages à base d'herbe, en raison d'une teneur en amidon plus élevée (**Doreau *et al.*, 2011**).

L'augmentation du pourcentage de concentré dans la ration entraîne une diminution de la production de méthane, en grande partie liée à l'augmentation de la part de propionate dans le mélange d'acides gras volatils. La diminution est curvilinéaire, d'autant plus importante que le pourcentage de concentré s'accroît (**Sauvant *et al.*, 2011**). Même si elle est sensible au-delà

de 50% de concentré, c'est à partir de 80% de concentré dans la ration qu'elle est systématiquement très marquée.

III.2. Apport des lipides

L'enrichissement en lipides de la ration est une voie nutritionnelle prometteuse pour réduire les émissions de méthane. La raison la plus évidente est que les lipides, quels qu'ils soient, ne fournissent pas de substrat pour la production de méthane dans le rumen, contrairement à la fermentation des glucides auxquels ils se substituent (**Doreau et al., 2011**).

Les lipides présentent l'avantage de ne pas modifier le pH ruminal et de pouvoir diminuer la méthanogenèse (**Jouany, 1994**). L'inhibition de la méthanogenèse dépend de la nature et de la quantité de lipides ajoutés, cette action est la plus prononcée avec les acides gras saturés à chaîne moyenne (12 et 14 carbones) comme l'huile de coprah ou l'huile de palmiste, et avec un acide gras polyinsaturé, l'acide linoléique (18 carbones et 3 doubles liaisons) présent dans la graine de lin (**Popova et al., 2011**).

Le lin, contenant des acides gras polyinsaturés, a un effet marqué pour réduire le méthane dans de nombreux essais ; chez des moutons, un apport de lin a diminué la production de CH₄ de 38% à l'entretien recevant une ration de foin supplémentée avec 5% d'huile de lin (**Czerkowski et al., 1966**).

Des sources lipidiques autres que le lin contribuent aussi à baisser la production de méthane, bien qu'en moyenne l'amplitude soit moindre qu'avec le lin. D'ailleurs certains auteurs estiment que l'efficacité des lipides pour réduire le méthane ne dépend pas significativement de la source de lipides, malgré une action différente sur les microbes du rumen (**Grainger et Beauchemin, 2011**).

III.3. Additifs alimentaires

La composition alimentaire a une grande influence sur la quantité de méthane produite par les ruminants (**Ellis et al., 2008**). Les pertes de méthane peuvent varier de 2 à 12% de l'énergie brute ingérée par l'animal (**Johnson et Johnson, 1995**).

Dans de nombreuses études, il a été démontré que l'addition de graisses alimentaires réduit la production de méthane par les ruminants (**Jordan et al., 2006 ; Machmüller, 2006 ; Martin et al., 2008**). Cependant, une méta-analyse récente (**Eugene et al., 2008**), a montré que l'ajout de graisses alimentaires diminuera également la proportion de matière organique fermentescible dans l'alimentation, ce qui réduira donc, les émissions de méthane.

D'autre part, les variations de digestibilité n'expliquent pas toutes les différences entre fourrages. L'introduction des légumineuses a permis une diminution de 10% de la production de CH₄ par kg de poids sur des bovins viande pâturant une prairie composée de 70% de luzerne et 30% de graminées ou de 100% de graminées (McCaughey *et al.*, 1999).

Certaines plantes, extraits de plantes et huiles essentielles donnent souvent des résultats positifs dans des essais *in vitro* de la réduction du méthane ; les saponines sont des molécules présentes dans les plantes entraînant une diminution des protozoaires, par suite de l'atteinte à l'intégrité de leurs membranes cellulaires, et sont donc susceptibles de réduire la production de méthane (Goel et Makkar, 2012). Il semble donc prématuré de proposer les saponines comme levier d'action pour réduire le méthane. Autres constituants secondaires des plantes, les tanins ont été évoqués lorsqu'ils sont distribués sous forme de fourrages. Mais des extraits de tanins sont également utilisés, et peuvent se révéler efficaces (Doreau *et al.* 2011).

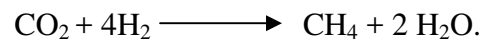
La saponine est un composé végétal appartenant à la famille des glycosides triterpénoïdes et des stéroïdes que l'on retrouve entre autres dans le *Yucca schidigera* sous forme stéroïdienne (Francis *et al.*, 2002). Dans une étude menée par Goel *et al.* (2012), des réductions des émissions de CH₄ allant jusqu'à 50 % ont été rapportées. La saponine agit sur la perméabilité des membranes cellulaires microbiennes en causant leur destruction par la formation de complexes avec le cholestérol (Cheeke, 2001). Elle attaque particulièrement et plus efficacement les protozoaires et peut agir comme agent de défaunation à fortes doses (Szumacher-Strabel et Cieslak 2010; Sirohi *et al.* 2013). Cependant, lors d'une expérience menée en condition *in vivo* chez le bovin laitier, aucun effet significatif sur les émissions de CH₄ n'a été observé lorsque des concentrations de *Yucca schidigera* allant jusqu'à 45 g/kg de MS ont été administrées (Holtshausen *et al.*, 2009). L'adaptation de la microflore à la saponine, qui serait en partie attribuée à la capacité de certaines bactéries à dégrader ce composé, pourrait en être la cause (Patra et Saxena 2010; Bodas *et al.*, 2012).

Les tannins sont des polymères polyphénoliques au poids moléculaire relativement élevé (Patra et Saxena 2010; Cieslak *et al.*, 2013), dont les effets inhibiteurs sur la production de CH₄ se font via une réduction directe des méthanogènes ou une limitation de la production d'ions hydrogène (Hook *et al.*, 2010). Woodward *et al.* (2004) ont observé des diminutions de 13 % des émissions de CH₄ chez le bovin laitier lorsque des doses de tannins condensés (2,62 g/100g de MS) provenant de lotier étaient ingérées. Wischer *et al.* (2012) ont évalué les effets de 10 extraits de tannins sur la production de CH₄ et ont noté des réductions allant de 8 à 28 %. De plus, Jayanegara *et al.* (2009) établissent une relation négative entre l'activité

métabolique des tannins et les concentrations de CH₄ produites en condition *in vitro*. Toutefois, en utilisant un extrait de quebracho au taux de 2 % de la MS ingérée, **Beauchemin et al. (2007)** n'ont noté aucun effet significatif sur la réduction de la production de CH₄.

IV. La réduction du méthane par manipulation du pool d'hydrogène

Dans le rumen, le microbiote ruminal trouve leur énergie sous forme d'ATP par des réactions de déshydrogénation libérant de l'hydrogène (H₂). Dès sa production, H₂ est utilisé par les archaea méthanogènes, un groupe microbien distinct des Eubactéries, pour réduire le CO₂ en CH₄ selon l'équation suivante:



La méthanogenèse est essentielle pour une performance optimale du rumen en évitant l'accumulation de H₂ qui inhiberait les fermentations. Par conséquent, l'hydrogène (H₂) et les archaea méthanogènes sont les deux paramètres déterminants de la production de CH₄ dans le rumen.

Les premières études ont démontré que le taux de production de méthane était directement proportionnel au taux d'absorption d'hydrogène par le liquide du rumen (**Czerkawski et al., 1972**).

La relation directe entre la pression partielle de l'hydrogène et la méthanogenèse suggère que l'accent de la recherche devrait justement passer de la méthanogenèse aux facteurs affectant la disponibilité de l'hydrogène dans le rumen.

L'hydrogène de la synthèse du méthane se produit dans trois états essentielles dans le rumen, ceux-ci étant l'hydrogène gazeux (H₂), les cofacteurs réduits (tels que le NADH et le NADPH), et comme protons libres. Alors que le gaz hydrogène s'accumule rarement à des concentrations supérieures à 1%, l'hydrogène sous toutes ses formes est un régulateur central de la fermentation ruminale (**Czerkawski, 1986**).

Une nouvelle voie pour réduire le méthane est l'addition de nitrate de calcium dans la ration. Le nitrate se transforme en nitrite puis en ammoniac dans le rumen, et utilise ainsi l'hydrogène. Jusqu'à présent cet additif s'est révélé efficace dans 100% des essais réalisés sur l'animal (**Nolan et al., 2010 ; Hulshof et al., 2012**).

Plusieurs auteurs ont pensé que la toxicité du nitrite (un intermédiaire de la réduction de nitrate) est la cause principale de la réduction de la méthanogènes, plutôt que la concurrence pour H₂ de la réduction du nitrate ou du nitrite, était responsable de l'inhibition observée de la

production de CH₄ (**Zhenming et al., 2012**). La conversion de nitrates en ammoniac est compétitive vis-à-vis de la méthanogenèse.

D'autre part, certaines bactéries sont capables d'oxyder l'hydrogène en utilisant des sulfates, des nitrates ou d'autres composés azotés ; la proportion, normalement faible, de ces bactéries dans la microflore ruminale, augmente en présence de leur substrat de prédilection.

L'utilisation de sulfates présente le risque de formation d'hydrogène sulfuré toxique, mais un essai in vitro récent a montré que les microorganismes sulfato- réducteurs pouvaient diminuer la production de méthane sans perturber la digestion et sans accroître la production d'hydrogène sulfuré (**Paul et al., 2011**).

Récemment, on rapporte qu'une supplémentation en 3-nitrooxypropanol réduirait les émissions de CH₄. Cette molécule, développée par la firme néerlandaise DSM Nutritional Products, exercerait une activité inhibitrice sur les archées méthanogènes du rumen en inhibant la méthyl-coenzyme M (**Reynold et al., 2014**). En effet, au cours d'une expérience, ces auteurs ont noté des réductions de la production de CH₄, de l'ordre de 6,6 et 9,8 % lorsque des doses de 500 et 2 500 mg/jour ont été ajoutées respectivement. Selon une autre étude, lorsque des doses de 40, 60 et 80 mg/kg de 3-nitrooxypropanol étaient intégrées dans la ration, les auteurs ont noté des diminutions des émissions de CH₄ de 25, 31 et 32 % respectivement (**Hristov et al., 2015**). Toujours selon la même étude, on ne notait aucun effet significatif sur la prise alimentaire et la production laitière.

Chapitre III

I. La production de l'hydrogène ruminal

Dans le rumen, le dihydrogène (encore appelé hydrogène ou H₂) est produit par des bactéries, des protozoaires et des champignons pendant la fermentation des aliments. Ce processus est essentiel car il permet de réduire les produits pour être utilisés dans d'autres réactions fermentatives.

Deux réactions d'oxydoréduction sont impliquées dans la production de H₂. Durant la première réaction (1), le produit réduit (*Prod*) est oxydé grâce à une ferrédoxine (*Fed*) et dans la deuxième (2), la *Fed* réduite est oxydée conduisant à la synthèse des H₂ (Popova, 2011).

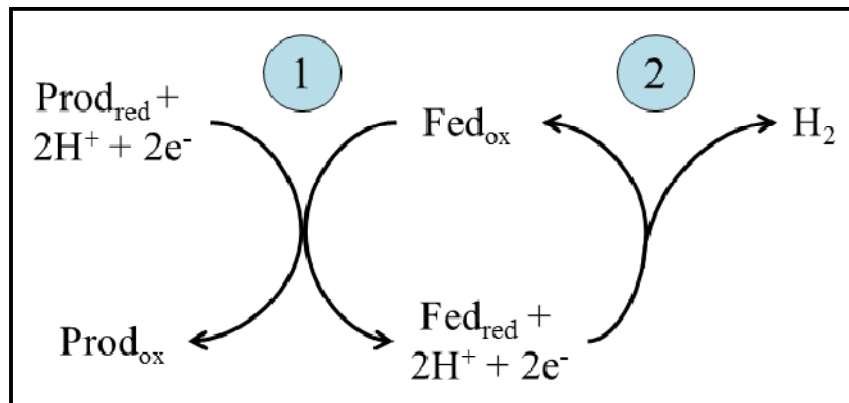
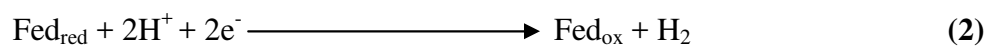
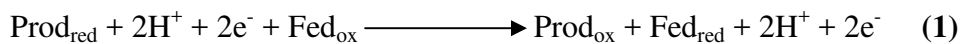


Figure 11. Les réactions d'oxydoréduction impliquées dans la production des H₂. (Hegarty et Gerdes, 1999 in Popova, 2011)

(*Prod_{red}* = produit réduit, *Prod_{ox}* = produit oxydé, *Fed_{ox}* = ferrédoxine oxydée et *Fed_{red}* = ferrédoxine réduite)

La production de l'H₂ se fait donc, en trois sections ; la réduction de la ferrédoxine dans le rumen, l'oxydation de la ferrédoxine et la production de H₂, et la solubilisation et la condensation des H₂.

I.1. La réduction de la ferrédoxine dans le rumen.**I.1.1. Distribution bactérienne et production des ferrédoxines**

Les ferrédoxines sont des protéines de fer-soufre de faible poids moléculaire, qui sont largement distribuées dans la nature (Spiro, 1982). Parmi les ferrédoxines les plus fréquentes figurent les ferrédoxines [2Fe-2S] (Matsubara et Saeki, 1991). Des protéines caractérisées

par la liaison de deux atomes de fer avec deux atomes de soufre inorganique. [2Fe-2S] ferrédoxines jouent des rôles dans un certain nombre de processus biologiques importants en tant que médiateurs de transfert d'électrons; En outre, certaines ferrédoxines ont également des fonctions catalytiques (**Johnson, 1994**).

Deux classes de ferrédoxines sont distinguées ; ceux des plantes et des cyanobactéries qui fonctionnent dans la photosynthèse et ceux provenant de bactéries et de vertébrés (**Eastabrook et al., 1973**). Les protéines de chaque classe possèdent de nombreuses caractéristiques communes, y compris la fonction, la structure primaire et les caractéristiques spectroscopiques (**Matsubara and Hase, 1983**).

Les ferrédoxines sont isolées à partir d'une large gamme de sources, y compris des bactéries (*Escherichia coli*, *Paracoccus denitrificans*, des microorganismes anaérobies (*Clostridium pasteurianum* (**Crouse et al., 1994**) et les mammifères (*Homo sapiens*) (**Ferreira et al., 1994**).

Dans le rumen, les ferrédoxines sont présentes dans les archées méthanogènes (**Thauer et al., 1977**), dans plusieurs genres de bactéries telles que *Ruminococcus*, *Selenomonas*, *Megasphaera* et *Desulfovibrio* (**Michel et Macy, 1990**), dans les protozoaires (**Paul et al., 1990**) et dans le champignon anaérobie *Neocallimastix spp.* (**Rees et al., 1998**).

Ces organismes contiennent une organelle caractéristique appelée hydrogénosome qui sont des organites liés à la membrane et n'ont été signalés que chez quelques eucaryotes unicellulaires anaérobies ou micro aérophiles, dont la fonction métabolique est la conversion du pyruvate à l'acétate via l'acétyl-CoA avec phosphorylation au niveau du substrat et production d'hydrogène moléculaire (**Muller, 1993**).

La décarboxylation oxydante du pyruvate est réalisée dans ces organites par une oxydoréductase pyruvate-ferrédoxine et les électrons libérés par cette conversion sont par conséquent transférés dans une hydrogénase pour la production d'hydrogène moléculaire (**Momcilo et al., 1996**).

La production de ferrédoxine réduite dans le rumen se fait durant la fermentation des carbohydrates et/ou durant la fermentation des protéines.

I.1.2. La réduction de ferrédoxine par fermentation des hydrates de carbone

Les glucides (dans le rumen) sont hydrolysés par plusieurs enzymes exogènes microbiennes qui agissent en synergie pour générer du glucose ou du xylose. La fermentation ultérieure de ces deux produits conduit à la production des AGV, qui sont la principale source d'énergie pour les ruminants (**Ariza et al., 2001**).

Chez les procaryotes, la fermentation du glucose génère principalement de l'acétate, du butyrate et du propionate, tandis que chez les eucaryotes, l'acétate et le butyrate sont principalement synthétisés (**Williams et Coleman, 1997**).

La production de ferrédoxine réduite (Fed_{red}) pendant la fermentation du glucose est différente selon les AGV produits. Chez les procaryotes (**Fig.12**) la production de deux moles d'acétate ou d'une mole du butyrate à partir du glucose génère 8 et 4 moles de Fed_{red} , d'autre part, la production de propionate nécessite 4 moles de Fed_{red} .

Tandis que, chez les eucaryotes (protozoaires et champignons (**Fig.12**), la production de deux moles d'acétate à partir d'une mole de glucose conduit à la production de 8 ou 12 moles de ferrédoxine réduite et la formation d'une mole butyrate génère 4 moles de Fed_{red} . Sachant que le ratio acétate / propionate / butyrate / valérate est d'environ 66: 19: 11: 4 dans le rumen, il est clair que la fermentation du glucose en AGV entraîne une production importante de ferrédoxine réduite (**Sauvant et al., 2011**).

Les eucaryotes réduisent directement le pyruvate en acétyl-CoA, qui est ensuite transformé en acétate ou butyrate (**Yarlett et al., 1985**). La conversion d'une mole de pyruvate à une mole d'acétyl-CoA est effectuée par une oxydoréductase pyruvate-ferrédoxine en réduisant deux moles de ferrédoxines.



Cette réaction est directe car aucun transporteur d'électrons tels que des cytochromes ou des coenzymes n'est requis entre le pyruvate et la Fed (**Müller et al., 2012**).

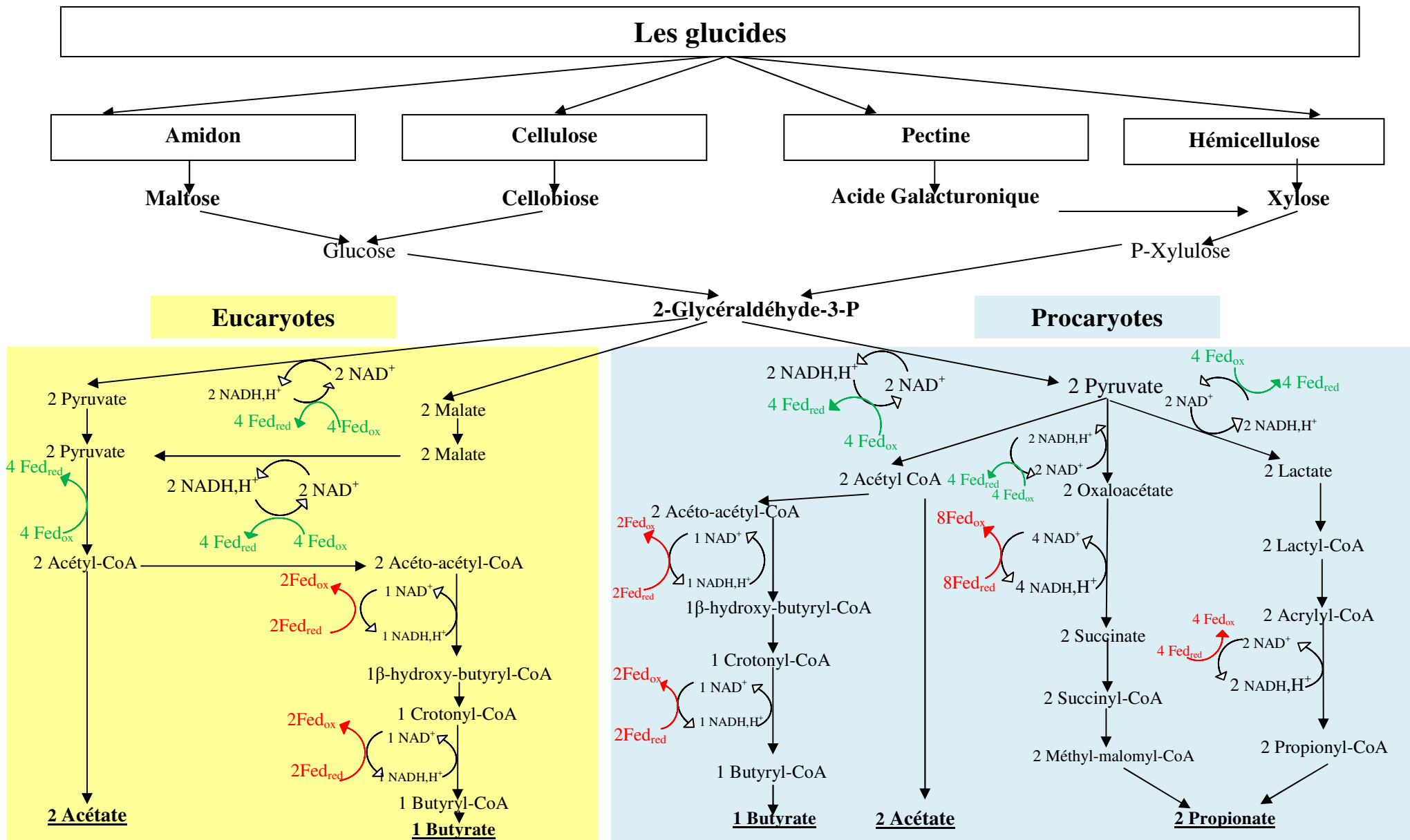


Figure 12. Voie de fermentation du glucose chez les procaryotes et les eucaryotes dans le rumen (Fonty *et al.*, 1995 ; Prescott *et al.*, 2010 ; Guyader, 2015).

I.1.3. La réduction de ferrédoxine par fermentation des protéines

Les protéines fournissent les acides aminés nécessaires pour le maintien des fonctions vitales, la croissance, la reproduction et la lactation. Au cours de la fermentation microbienne des acides aminés, la réduction de ferrédoxine peut avoir lieu (**Fig. 13**).

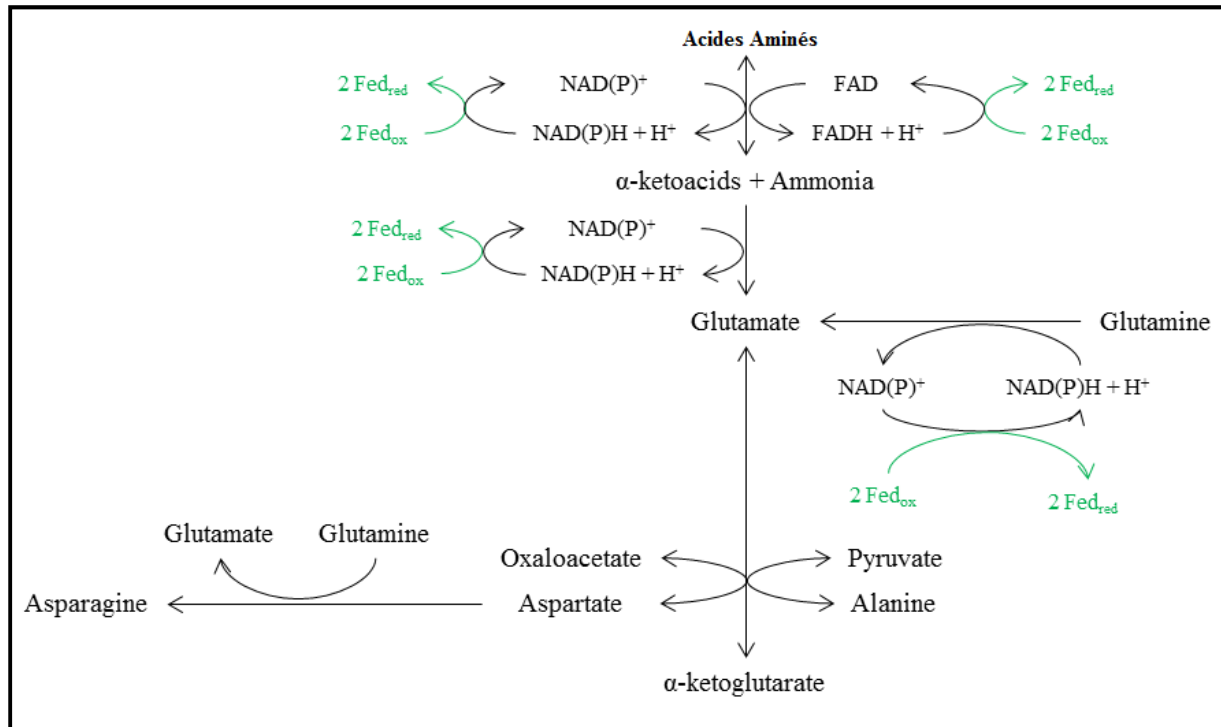


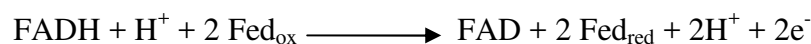
Figure 13. Fermentation microbienne des acides aminés dans le rumen: exemple de la glutamine et de l'asparagine, qui servent de substrats pour la synthèse microbienne de tous les autres acides aminés. (**Wu, 2013**)

Les réactions menant à la production de ferrédoxines réduites sont en vert Fed_{ox} = ferrédoxine oxydée et Fed_{red} = ferrédoxine réduite.

La réduction de la ferrédoxine à partir des coenzymes se déroule dans la membrane cytoplasmique des procaryotes du rumen et dans le cytosol ou dans l'hydrogénosome des eucaryotes. La réaction est réalisée par une coenzyme déshydrogénase qui capte les électrons des coenzymes réduites lors de la fermentation des aliments vers la Fed oxydée. La réaction catalysée par la NAD (P) H déshydrogénase est:



Et la réaction catalysée par la FADH déshydrogénase est:



Dont : NAD (P) H + H⁺ et FADH + H⁺ sont les coenzymes réduites, Fed_{ox} est le Fed oxydée, NAD⁺ et FAD sont les coenzymes oxydées, Fed_{red} est le Fed réduite.

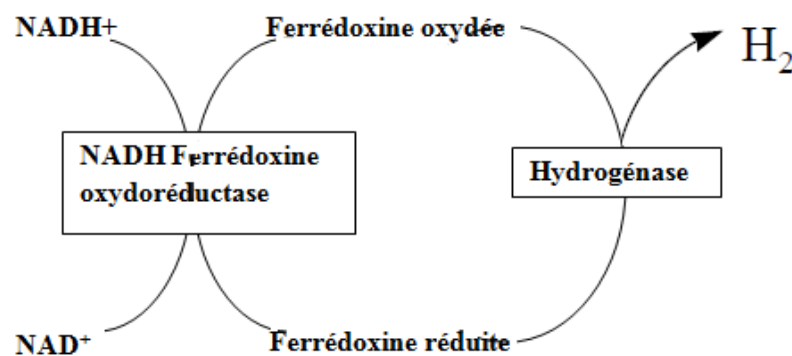
Comme le potentiel de réduction standard de NAD et FAD est plus positif que celui de Fed, les NAD(P)H et FADH déshydrogénases ne sont actives que dans le sens de la réduction de la Fed, et la direction inverse est fortement inhibée par NAD(P)H,H⁺ ou FADH,H⁺ (**Gottschalk, 1986**).

La réduction des Fed permet de générer de nouveau des coenzymes sous formes oxydées, et comme la concentration de coenzymes est fixée dans le rumen, ce processus est essentiel pour laisser les fermentations se poursuivre (**Hegarty et Gerdes, 1999**). À notre connaissance, très peu d'informations existent sur la concentration de coenzymes dans le rumen. En effet, la concentration en coenzymes est difficile à mesurer car elles sont rapidement métabolisées et leur dosage nécessite une extraction de la cellule suivie d'une purification. Dans une expérience *in vivo*, la concentration de NAD analysée à partir de cellules de pastilles du liquide ruminal de vaches laitières nourries avec un régime alimentaire à base d'avoine était 2.29 µM (**Abdouli et Schaefer, 1986**).

I.2. la production des H₂ par l'oxydation de la ferrédoxine

L'hydrogène ruminal est libéré par des enzymes hydrogénases agissant sur la ferrédoxine réduite (**Hegarty et Gerdes, 1999**).

Les hydrogénases sont présentes dans un grand nombre de procaryotes (**Schwarz et Friedrich, 2003**) et d'eucaryotes (**Müller *et al.*, 2012**). Ils sont responsables de la réduction ou de l'oxydation de H₂:



La direction de cette réaction est réversible, elle dépend du potentiel redox de l'environnement (**Vignais et Colbeau, 2004**).

I.2.1. Rôles des hydrogénases

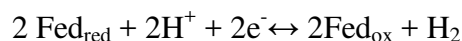
Les hydrogénases bactériennes qui réduisent les protons en H₂ sont des chaînes polypeptidiques simples (**Van Dijk et al., 1979**) ou des enzymes à sous-unités multiples (**Sawers, 1994**) qui peuvent contenir des agrégats fer / soufre et du nickel.

La plupart des hydrogénases sont des métallo-enzymes. Leur site catalytique est constitué d'un hétéro-dimère qui est un complexe protéique constitué de deux sous-unités différentes. La première sous-unité est l'amas sulfurique [Fe₂-S₂, Fe₃-S₄ ou Fe₄S₄] qui est responsable du transport des électrons vers la seconde sous-unité, ou site actif (**Beinert et al., 1997**).

Les hydrogénases ont été purifiées et détectées dans plusieurs espèces bactériennes du rumen telles que *Bacteroides clostridiiformis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium limosum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Megasphaera elsdenii*, *Ruminococcus albus* et *Ruminococcus flavefaciens* (**Van Dijk et al., 1979**). Chez les protozoaires du rumen (**Paul et al., 1990**) et les champignons (**Yarlett et al., 1986**), les enzymes hydrogénases sont principalement localisées à l'intérieur des hydrogénosomes.

L'anaérobiose du rumen offre de bonnes conditions pour la production et l'activité des hydrogénases, car l'oxygène affecte négativement la plupart des activités des hydrogénases (**La Penna, 2010**). En effet, l'O₂ réagirait avec le site actif de l'enzyme, créant un superoxyde qui pourrait être libéré seulement en présence d'un accepteur d'électrons avec un potentiel de réduction standard plus élevé.

Les hydrogénases sont responsables de l'oxydation de deux moles réduites de ferrédoxine en donnant une mole d'H₂ (**Gottschalk, 1986**):



Au cours de la fermentation des hydrates de carbone ; la production d'une mole d'acétate ou d'une mole butyrate à partir d'une mole de glucose génère 2 moles de H₂ tandis que une mole de H₂ est nécessaire pour produire une mole de propionate (**Sauvant et al., 2011**). Comme les eucaryotes fermentent préférentiellement le glucose que l'acétate et le butyrate, ils sont considérés comme d'importants producteurs d'H₂ (**Williams et Coleman, 1997**).

I.2.2. Classification des hydrogénases

Les hydrogénases peuvent être classées en trois classes selon les atomes métalliques de leur site actif (Vignais et Colbeau, 2004).

a) **Les hydrogénases à fer [Fe-Fe] :** se sont des monomères, ne sont constituées que de la sous-unité catalytique. Ce type d'enzyme se trouve dans les procaryotes anaérobies, tels que les *Clostridia* et les réducteurs de sulfate (Atta et Meyer, 2000), et dans les eucaryotes inférieurs (Voncken *et al.*, 2002). Les [Fe-Fe]-hydrogénases sont le seul type d'hydrogénase à avoir été trouvé chez les eucaryotes, et elles se trouvent exclusivement dans les hydrogénosomes et les plus petites de ces hydrogénases (environ 45-48 kDa) ont été trouvés dans les algues vertes (Vignais et Billoud, 2007).

Les sous-unités catalytiques des [Fe-Fe]-hydrogénases, contrairement à celles des enzymes contenant du Ni, varient considérablement en taille. Outre les domaines contenant le site actif (cluster H), ces hydrogénases comprennent souvent des domaines supplémentaires, qui acceptent les clusters Fe/S (Atta et Meyer, 2000).

Le cluster H est constitué d'un centre bi nucléaire [Fe-Fe] lié à un cluster (4Fe/4S) par une cystéine. Les ligands non protéiques, CN⁻ et CO, sont attachés aux atomes de fer du centre Fe bi nucléaire (Fig. 14 A). Les atomes de Fe partagent également deux ligands de soufre pontant d'un petit atome de cinq molécule, éventuellement une molécule de di (thiométhyl) amine, HN-(CH₂-S⁻)₂.

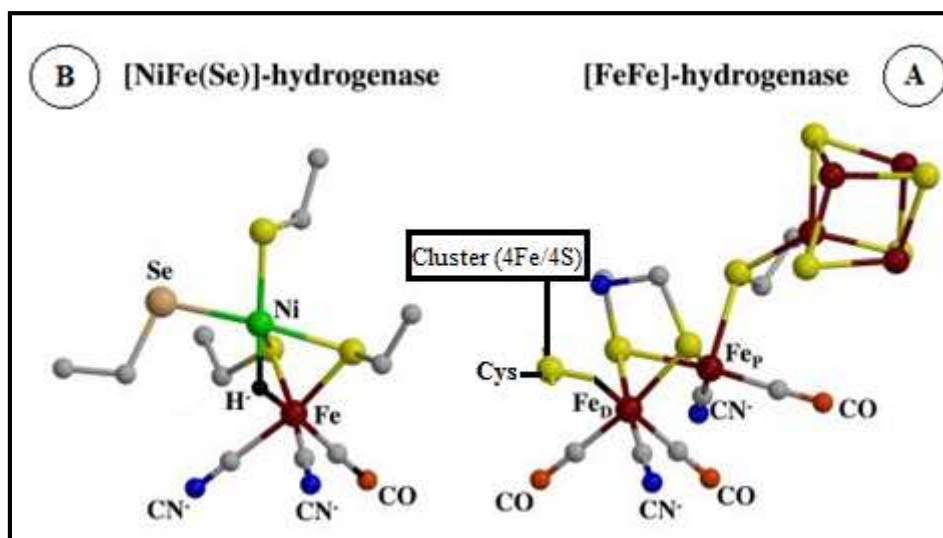


Figure 14. Structure du site actif de [Fe-Fe] et [Ni-Fe]-hydrogénases (Vignais et Billoud, 2007).

(A) [Fe-Fe]-Hydrogénase ; (B) [Ni-Fe]-Hydrogénase.

b) Les hydrogénases [Ni-Fe] : La [Ni-Fe]-hydrogénase est taxonomiquement plus largement distribuée que la [Fe-Fe]-hydrogénase (**Tab. I**). Des [Ni-Fe]-hydrogénases représentatives ont été isolées à partir de divers micro-organismes et caractérisées de manière biochimique (**Ogata et al., 2009**). Ces enzymes sont constituées d'au moins deux sous-unités (**Fig. 14 B**), la grande sous-unité contenant le site catalytique et la petite sous-unité contenant trois amas de fer-soufre. Sur la base de la comparaison des motifs de séquence qui coordonnent le site actif, les [Ni-Fe]-hydrogénases peuvent être séparées en quatre groupes fonctionnels distincts qui correspondent en général à leur rôle physiologique putatif (**Vignais et al., 2001**).

Ces hydrogénases sont divisés en quatre groupes. Le premier groupe rassemble des hydrogénases respiratoires responsables de l'oxydation des H₂ couplée à la réduction des accepteurs d'électrons (NO₃⁻, SO₄²⁻, CO₂, O₂). Les hydrogénases du second groupe sont responsables de l'activation de l'expression des gènes structuraux de l'hydrogénase (**Barz et al., 2010**). Le troisième groupe d'hydrogénases est associé aux coenzymes déshydrogénases chargées de la réduction de H₂ et de l'oxydation des cofacteurs réduits (NAD (P) H, H⁺). Le quatrième et le dernier groupe d'hydrogénases sont principalement impliqués dans l'élimination d'équivalents réducteurs produits lors de l'oxydation du monoxyde de carbone ou du formiate (**Vignais et Billoud, 2007**).

c) Les hydrogénases sans cluster fer-soufre : Longtemps appelées hydrogénases sans métal (metal free hydrogenases). Ce ne sont pas à proprement parler des hydrogénases car elles n'utilisent pas de protons pour produire de l'hydrogène. Cependant, les nombreuses similitudes avec les hydrogénases lui confèrent cette dénomination (**Shima et al., 2004**). Ce type des hydrogénases ne se trouve que chez certaines *Archaea* méthanogènes (**Zirngibl et al., 1992**) et catalysent la réduction réversible de la méthylène-tétrahydropptérine en présence des H₂ en méthylène-tetra-hydropptérine (**Fig. 15**), étape intermédiaire réduction du CO₂ en méthane (**Thauer et al., 1996**).

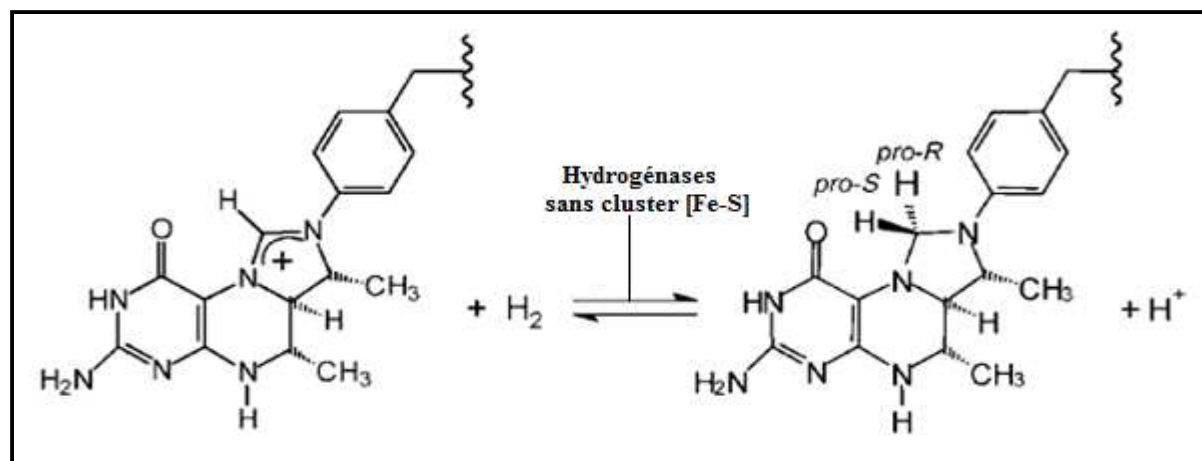


Figure 15. Réaction catalysée par les hydrogénases sans cluster fer-soufre (Shima *et al.*, 2004).

Tableau I. Distribution taxonomique des [Fe-Fe] et [Ni-Fe]-hydrogénases dans 2912 génomes de *Bacteria* et *Archaea* (Peters *et al.*, 2015).

Domaine	Phylum	Nombre total de génomes	Nombre de génomes avec homologie	
			[Fe-Fe]-hydrogénase	[Ni-Fe]-hydrogénase
Archaea	<i>Crenarchaeota</i>	50	0	22
	<i>Euryarchaeota</i>	110	0	70
	<i>Korarchaeota</i>	1	0	1
	<i>Nanoarchaeota</i>	1	0	0
	<i>Thaumarchaeota</i>	5	0	0
Bacteria	<i>Acidobacteria</i>	7	0	4
	<i>Actinobacteria</i>	301	8	72
	<i>Aquificae</i>	14	0	13
	<i>Armatimonadetes</i>	2	0	0
	<i>Bacteroidetes</i>	94	9	12
	<i>Caldiserica</i>	1	0	0
	<i>Chlamydia</i>	109	0	0
	<i>Chlorobi</i>	11	0	10
	<i>Chloroflexi</i>	24	11	20
	<i>Chrysiogenetes</i>	1	0	1
	<i>Cyanobacteria</i>	79	0	43
	<i>Deferribacteres</i>	4	0	4
	<i>Deinococcus-Thermus</i>	21	0	1
	<i>Dictyoglomi</i>	2	2	2
	<i>Elusimicrobia</i>	1	0	1
	<i>Fibrobacteres</i>	2	0	0
	<i>Firmicutes</i>	622	160	86

<i>Fusobacteria</i>	11	2	0
<i>Gemmatimonadetes</i>	1	0	1
<i>Ignavibacteriae</i>	2	2	0
<i>Nitrospirae</i>	4	1	2
<i>Planctomycetes</i>	8	0	1
<i>Proteobacteria</i>	1240	28	497
<i>Spirochaetes</i>	65	20	0
<i>Synergistetes</i>	5	2	3
<i>Tenericutes</i>	89	0	0
<i>Thermodesulfobacteria</i>	2	1	2
<i>Thermotogae</i>	18	18	1
<i>Verrucomicrobia</i>	5	1	2

I.3. Solubilisation et condensation des H₂

L'hydrogène produit diffuse à travers la membrane cytoplasmique cellulaire dans le rumen sous forme dissoute. La vitesse de diffusion dépend de la physiologie des cellules microbiennes (taille et forme des cellules) et de la concentration externe en H₂; plus la concentration de H₂ dissous externe est élevée, plus la vitesse de diffusion de H₂ hors de la cellule est faible. Ceci maintient un gradient équilibré entre la cellule et son environnement

En raison de la forte volatilité de l'hydrogène et de son temps de renouvellement élevé (0,08s) (**Smolenski et Robinson, 1988**), le dosage des concentrations en H₂ dissous n'est pas facile. Dans la littérature, deux études ont réussi à mesurer les concentrations des H₂ dissous *in situ* dans le rumen. Dans le premier (**Hillman et al., 1985**), le H₂ dissous diffusait dans une électrode à oxygène placée dans le rumen. La concentration en hydrogène a été déterminée par un spectromètre de masse. Dans le second (**Smolenski et Robinson, 1988**), H₂ dissous a été absorbé par un gaz porteur (hélium) qui passe à travers une sonde immergée dans le rumen. Le mélange gazeux a ensuite été chauffé afin de séparer l'hélium de H₂, et la concentration en l'hydrogène a été déterminée par un chromatographe en phase gazeuse.

D'autres méthodes développées sont basées sur l'analyse point par point par chromatographie en phase gazeuse du gaz extrait du jus du rumen. Le fluide ruminal a été prélevé dans une seringue et la concentration en H₂ peut être déterminée par deux méthodes; soit le H₂ sera gazéifié en chauffant l'échantillon ou en injectant l'échantillon dans une solution basique (**Robinson et al., 1981**); soit, L'azote (N) sera diffusé dans l'échantillon et, après la collecte du

gaz supérieur, la concentration en H₂ est déterminée selon la dilution de N (**Wang et al., 2014**).

Deux facteurs induisent des variations de concentrations des H₂ dissous: la composition du régime alimentaire et le temps d'alimentation (**Janssen, 2010**). Les concentrations de H₂ dissous ont augmenté de 2 à 3 heures après l'allaitement en raison de l'augmentation de la fermentation (**Wang et al., 2014**). Cette élévation de post-alimentation est d'autant plus importante que les régimes sont riches en aliments rapidement et facilement fermentescibles (par exemple, des régimes riches en céréales).

Cependant, l'étude ruminale *in vitro* de (**Wang et al., 2014**) a montré qu'une augmentation des concentrations de H₂ dissous n'est pas nécessairement liée à une augmentation de H₂ gazeux. Dans cette étude, les auteurs ont conclu que le transfert de H₂ de la phase liquide du rumen vers la phase gazeuse du rumen peut être affecté par le coefficient de diffusion de ce gaz et par l'efficacité de mélange de ce compartiment digestif. Ensuite, H₂ peut s'accumuler dans certaines parties du rumen, limitant la possibilité de calculer les concentrations en H₂ gazeux à partir des concentrations en H₂ dissous mesurées dans une partie du rumen, et *vice versa*. Cela souligne également l'importance de la mesure *in vivo* des concentrations de H₂ dans les deux phases. Néanmoins, une telle expérience n'a toujours pas été réalisée.

II. L'utilisation de l'hydrogène dans le rumen

Des quantités non négligeables d'hydrogène moléculaire sont générées à travers les réactions fermentaires, cet hydrogène est associé à des molécules spécifiques de transport (le couple $\text{NADH}_2 \leftrightarrow \text{NAD} + \text{H}_2$ étant le plus connu). Ce surplus potentiel d'hydrogène doit être utilisé à travers différentes voies métaboliques, appelées puits d'hydrogène, résumées dans la **Fig. 16**.

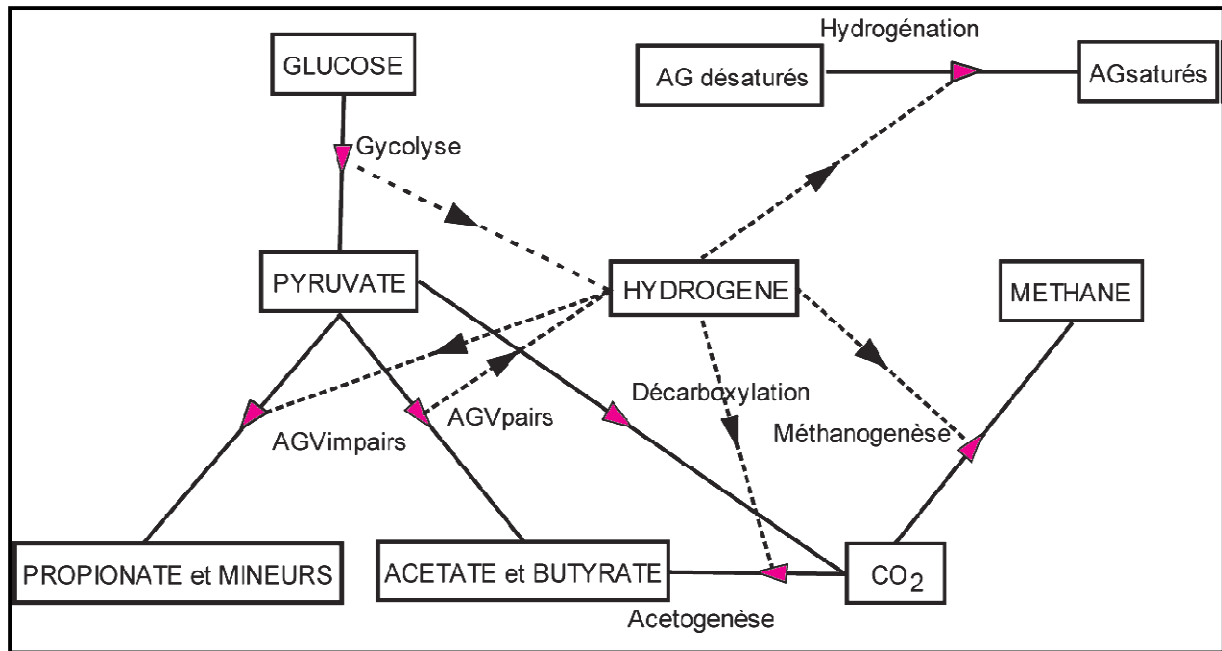


Figure 16. Les principales voies métaboliques de production et d'utilisation de l'hydrogène dans le rumen (Sauvant *et al.*, 2011).

II.1. L'utilisation de l'hydrogène dans la production du méthane

La production de méthane est la principale voie utilisant H_2 (Mills *et al.*, 2001) ont estimé que 80% du H_2 produit serait utilisé pour cette voie, en supposant que la méthanogénèse utilise l'excès de H_2 qui n'a pas été utilisé par d'autres voies utilisant H_2 . Dans le rumen, les méthanogènes utilisent le H_2 comme source d'énergie pour leur croissance tout en produisant du CH_4 .

Les mécanismes microbiens sous la production de CH_4 impliquent le transfert inter-espèce des H_2 entre les producteurs de H_2 et les méthanogènes (Wolin *et al.*, 1997). L'exemple le plus étudié de ce transfert est la relation symbiotique entre les méthanogènes et les protozoaires (Ushida et Jouany, 1996, Vogels *et al.*, 1980) ; les méthanogènes sont positionnés sur les protozoaires pour réduire la distance de diffusion de H_2 de l'hydrogénosome. Ces méthanogènes associés aux protozoaires seraient responsables de 9 à 25% de la méthanogénèse dans le liquide ruminal (Ushida et Jouany, 1996). Une analyse récente de (Morgavi *et al.*, 2010) a mis en évidence une relation positive entre les protozoaires et les émissions de CH_4 : une réduction de 0,12 \log_{10} cellules protozoaires / ml réduirait le CH_4 de 1g / kg de matière organique. Les espèces d'*Entodinium* étaient le genre protozoaire contribuant le plus aux émissions de CH_4 , suivi par *Epidinium caudatum*. *Polyplastron* a eu la contribution la plus faible (Newbold *et al.*, 1995).

II.2. L'utilisation de l'hydrogène dans la synthèse des acides gras volatils

Parmi les principaux produits terminaux de la fermentation ruminale sont les acides gras volatils (AGV). La synthèse des acides gras volatils est responsable de 19 à 33% de l'absorption de H₂ (**Fig. 17**) (**Mills *et al.*, 2001**). Les AGV les plus représentés sont l'acide acétique en C2, l'acide propionique en C3 et l'acide butyrique en C4, le ratio molaire acétate : propionate : butyrate étant généralement de l'ordre de 65 : 20 : 15 (**Bergman, 1990**). L'acide valérique en C5 et l'acide caproïque en C6, se rencontrent également, mais en proportions nettement inférieures (de 1 à 4 %) (**Jouany *et al.*, 1995**).

Les AGV quittent la cellule pour rejoindre le liquide ruminal par simple diffusion ou *via* un système de perméases (**Russel et Gahr, 2000**). Ils sont ensuite absorbés à travers l'épithélium ruminal, avec une efficacité d'autant plus grande que la chaîne carbonée est longue, vraisemblablement par diffusion passive des acides non dissociés d'une part, mais aussi et surtout sous forme anionique (**Russel et Gahr, 2000**). Les AGV étant en effet des acides faibles ($pK \leq 4.8$) et le pH du rumen se rapprochant de la neutralité, ceux-ci sont principalement présents sous forme d'anions (acétate, propionate et butyrate) plutôt que sous forme d'acides (acétique, propionique et butyrique) (**Bergman, 1990**).

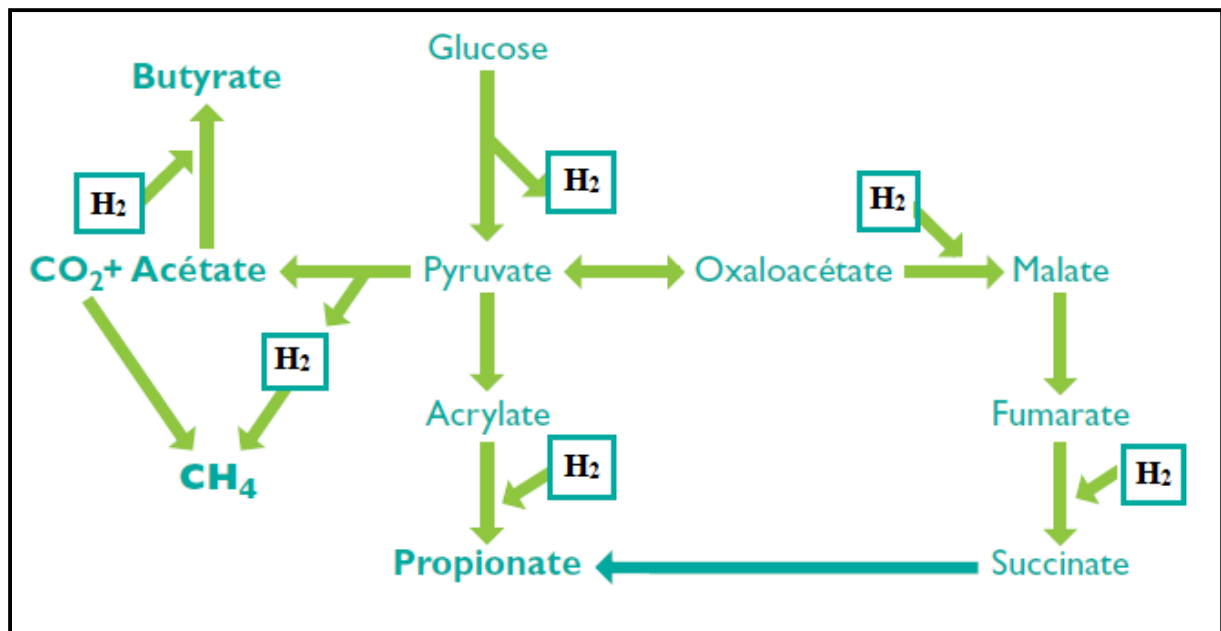


Figure 17. Voies métaboliques d'utilisation de l'hydrogène au cours de la production des AGV dans le rumen (**Jouany, 2009**).

Les proportions des différents AGV produits sont principalement fonction de la nature du régime. En effet, les microorganismes du rumen sont caractérisés à partir des substrats qu'ils sont capables de dégrader et/ou de fermenter.

Les nutriments présents dans la ration conditionnent donc la nature des microorganismes du rumen, qui orientent la production des AGV selon leur métabolisme respectif. Les rations riches en fourrages favorisent ainsi la production d'acétate au détriment du propionate, tandis que les rations riches en amidon diminuent la synthèse de l'acétate et favorisent celle du propionate. La production d'acide butyrique est, quant à elle, augmentée lors de régimes contenant des ingrédients riches en sucres solubles, tels que les betteraves (saccharose) ou le lactosérum (lactose) (**Jouany *et al.*, 1995**).

Bien que véritables déchets du métabolisme bactérien, les AGV constituent pour le ruminant une source majeure d'énergie, puisqu'ils procurent 60 à 80 % de l'énergie totale dont il a besoin (**Russel et Gahr, 2000**). Ainsi, une fraction importante des AGV absorbés est directement métabolisée par les tissus épithéliaux du rumen. Cette consommation est estimée approximativement à 30 % de l'acétate, 50 % du propionate et 90 % du butyrate produits dans la lumière ruminale.

Cette théorie est actuellement remise en question par **Kristensen (2005)**, qui a montré que l'épithélium ruminal ne métabolisait pas l'acétate et seulement une faible proportion du propionate absorbé (5 à 10 %). Il s'agirait plutôt d'une utilisation de l'acétate par les bactéries ruminales dans leurs voies anaboliques. L'épithélium ruminal serait tout de même le siège d'une importante métabolisation du butyrate et du valérate (45 à 85 %), alors que les autres viscères drainés par la veine porte utiliseraient quant à eux l'acétate artériel comme substrat pour leur métabolisme énergétique, à raison de ± 30 % de l'acétate absorbé par l'épithélium ruminal. Les AGV non métabolisés à ce niveau sont quant à eux déversés dans la circulation veineuse pour rejoindre le foie (**Bergman, 1990**).

II.3. La synthèse de la biomasse microbienne

Les bactéries et les protozoaires sont composés de 6,23 atomes d'hydrogène/100 g de cellules (**Tab. II**) (**Reichl et Baldwin, 1975**). Ensuite, H₂ est essentiel pour la synthèse microbienne, mais leur niveau d'exigence est variable dans la littérature. Par conséquent, afin d'évaluer précisément la quantité de H₂ utilisée pour la synthèse de la biomasse microbienne, il sera nécessaire de standardiser les méthodes de calcul.

Tableau II. Composition de la biomasse bactérienne (Reichl et Baldwin, 1975)

	Protéines	Acides nucléiques	Polysaccharides	Lipides
Bactéries (mole/100g de cellules)	0.474	0.028	0.124	0.019
Hydrogène (atomes/ mole)	7.59	12	10	55.8

La variabilité inter-expérimentale des besoins en H₂ pour la croissance microbienne peut également provenir du niveau de carence en nutriments dans les régimes alimentaires. En effet, lorsque la teneur en protéines brutes du régime alimentaire est faible, les microbes doivent utiliser une source de l'azote non protéique (NPN), ce qui augmente l'efficacité de la croissance microbienne et ensuite l'absorption de H₂ (Leng, 2014).

II.4. Hydrogénation des acides gras polyinsaturés

L'hydrogénation est une réaction chimique qui consiste en l'addition d'une molécule de dihydrogène (H₂) à un autre composé. Cette réaction est habituellement employée pour réduire ou saturer des composés organiques.

Les matières grasses ingérées par les ruminants subissent dans le rumen une hydrolyse rapide et le plus souvent quasi totale, suivie d'une hydrogénation importante des acides gras polyinsaturés de type C 18:2 n-6, et surtout 18:3 n-3. Ces acides gras, particulièrement ceux de la famille des n-3, entraînent fréquemment des perturbations de la digestion ruminale des glucides (Bauchart *et al.*, 1985). Ces constatations ont conduit à préconiser l'emploi de matières grasses soit saturées ou mono-insaturées, soit «protégées» de l'hydrogénation dans le rumen. Une diminution de l'hydrogénation pourrait avoir comme conséquences, outre la réduction des éventuels effets négatifs des lipides sur le fonctionnement du rumen, une modification de la composition des acides gras absorbés et donc des acides gras du lait. Aussi est-il important de pouvoir juger de la capacité d'une source lipidique à être hydrogénée dans le rumen (Doreau *et al.*, 1989).

Etude
Expérimentale

I. Matériel chimique

La réduction du méthane ruminal a été testée *in vitro* par l'utilisation des produits à base de nitrate et de nitrite. Cinq produits chimiques sont testés; dont trois produits commerciaux : les nitrates (**KNO₃**), le Nitrophénol (**NIP**) et 5-Nitrobenzimidazole (**5-NBZ**). Les deux autres produits sont synthétisés par cristallographie : 13-(4-nitrophenyl)-3,4-dihydro-2H-indazolo [1,2-b] phthalazine-1,6,11 (2H, 13H)-trione (**ABLE 244**) et 16-(4-nitrophenyl)-1,16-dihydrophthalazino [2',3':1,2] pyrazolo [4,3-a] carbazole-9,14 dione (**ABLE 245**).

I.1. Les produits commerciaux

I.1.1. Les Nitrates

Le nitrate est un composant commun de la protéine brute dans une variété d'aliments consommés par les ruminants. Dans certaines conditions, une grande variété de plantes peut accumuler des quantités de nitrate. En plus des aliments du bétail, certaines mauvaises herbes qui habitent habituellement les pâturages ou les champs de culture peuvent également accumuler des nitrates. Les céréales et les concentrés protéiques contiennent rarement des concentrations appréciables de nitrates (**Fjell et al., 1991**).

Le nitrate n'est pas distribué uniformément dans les plantes. Par exemple, les nitrates sont typiquement plus hauts dans les tiges, plus bas dans les feuilles (plus d'activité nitrate réductase) et extrêmement bas dans les graines (**Pfister, 1988**).

Les nitrates peuvent être présents dans les pâturages utilisés par les ruminants de façon continue. Dans des conditions de croissance normales, les concentrations de nitrate sont faibles et insignifiantes par rapport à la quantité d'azote fermentescible nécessaire pour que les microbes digèrent efficacement la biomasse dans le rumen. Ce n'est que dans des conditions particulières que les nitrates deviennent suffisamment élevés pour être proches des besoins en azote fermentescible du rumen, mais même dans ce cas, ils représentent rarement un pourcentage élevé de la protéine brute totale dans les aliments (**Wright et Davison 1964**). Lorsque les nitrates sont présents dans les aliments et deviennent toxiques, ils sont généralement associés à des niveaux excessifs de protéines brutes dans l'alimentation et à des concentrations élevées d'ammoniac dans le rumen des animaux qui consomment le fourrage. Cependant, même à des niveaux élevés de protéines dans un régime, la recherche montre clairement que les nitrates consommés par les moutons dans les régimes riches en protéines brutes sont convertis en ammoniac dans le rumen fournissant de l'azote fermentable pour la croissance microbienne (**Lewis 1951**).

Le nitrate est généralement considéré comme un composé nocif dans l'alimentation des ruminants en raison de son potentiel d'induction de la méthémoglobinémie et du fait qu'il est cancérigène (**Sinderal et Milkowski 2012**). Il a récemment attiré l'attention en tant qu'accepteur d'électrons dans le rumen, ce qui pourrait réduire les émissions de méthane entérique provenant des ruminants. Plusieurs études *in vivo* ont confirmé l'efficacité de l'administration de nitrate sur la réduction des émissions de méthane entérique sans entraîner de signes cliniques de toxicose (**Nolan et al., 2010 ; Li et al., 2012**).

Cependant, **Lee et Beauchemin (2014)** ont montré que l'énergie métabolisable fournie par les émissions de méthane réduites n'est probablement pas utilisée pour la production animale. Le potentiel de toxicité du nitrate (nitrite) peut être réduit en adaptant progressivement les animaux au nitrate. Cependant, la procédure de cette adaptation doit être standardisée. Bien que, des nitrates supplémentaires ont également été proposés comme source d'azote non protéique (NPN) pour les ruminants à la place de l'urée.

I.1.2. Le Nitrophénol

Les nitrophénols (NPs) sont des composés aromatiques nitrés constituées de cycles benzéniques, substitué par un groupe hydroxyle (-OH) ainsi que par un ou plusieurs groupes nitro (-NO₂). Ceux-ci comprennent les mononitrophénols, les halonitrophénols, les polynitrophénols, les méthylnitrophénols et les aminonitrophénols (**Pankaj Kumar et al., 2014**), (**Fig. 18**).

Ces composés sont largement utilisés pour la fabrication de colorants, médicaments, pesticides, herbicides et fongicides (**Pankaj Kumar, 2012 ; Ju et Parales, 2010**). Les NPs ont été déversées dans l'environnement en grandes quantités par le biais d'utilisations agricoles, d'applications médicales et d'activités domestiques. Ces composés ont été détectés dans les sols agricoles, les eaux souterraines, les eaux de surface, les eaux pluviales et les boues actives (**Schwarzbauer et al., 2004 ; Rubio et al., 2012**).

Les composés nitroaromatiques sont également des métabolites bioactifs présents dans les plantes et les champignons. La 1-nitroaknadinine est un alcaloïde de *Stephania sutchuenensis*, une plante chinoise traditionnelle utilisée pour soulager les maux de gorge (**Wang et al., 1994 ; Liu et al., 1997**). Des recherches sur la truffe de carotte, *Stephanospora caroticolor*, ont révélé que la chloronitroarène stephanosporine et son produit de décomposition, le 2-chloro-4-nitrophénol, sont les composés responsables de la pigmentation orange vif et peuvent être dissuasifs contre la prédation (**Lang et al., 2001**).

Les produits chimiques contenant un groupe nitro sont également importants dans la signalisation cellulaire et dans la stimulation des réponses comportementales. Le nitrophénol et le 4-méthyl-2-nitrophénol, qui sont présents sous forme de métabolites du rumen, sont des phéromones qui permettent aux tiques de s'agréger et de se fixer aux mammifères (**Donze et al., 2004**).

Les expériences de **Smith et al. (1988)** sur des rats mâles exposés pendant 2 semaines à une concentration de 2 mg de nitrophénol; montrent que jusqu'à cette concentration il n'y avait aucune altération histopathologique dans l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et le caecum. D'autre part, aucune étude n'a été trouvée concernant les effets cancérogènes chez l'homme ou l'animal suite à une exposition par inhalation au nitrophénol ou à un de ses dérivés.

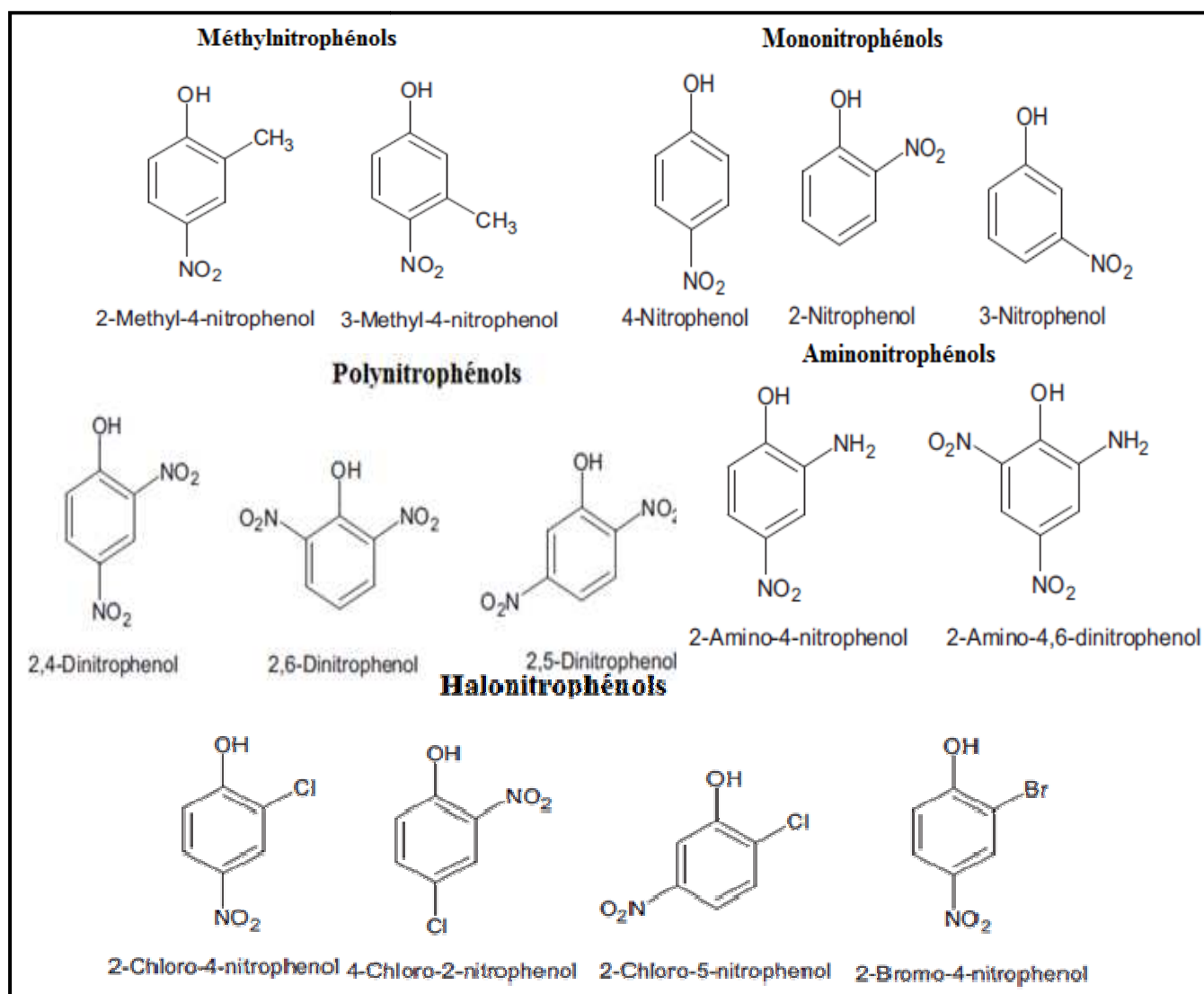


Figure 18. Structures chimiques de différents nitrophénols (**Pankaj Kumar et al., 2014**).

I.1.3. Le 5-Nitrobenzimidazol

Le benzimidazole est un composé hétérocyclique aromatique résultant de la fusion d'un cycle de benzène et d'un cycle imidazole. Les composés partageant cette structure sont appelés benzimidazoles. La structure de la molécule avec la numérotation classique des atomes et leurs coordonnées internes sont montrées dans la **Fig. 19**.

Les dérivés de benzimidazole comprennent des classes prometteuses de composés hétérocycliques qui présentent une gamme d'activités biologiques (**Sabrina-Rahman et al., 2017**)

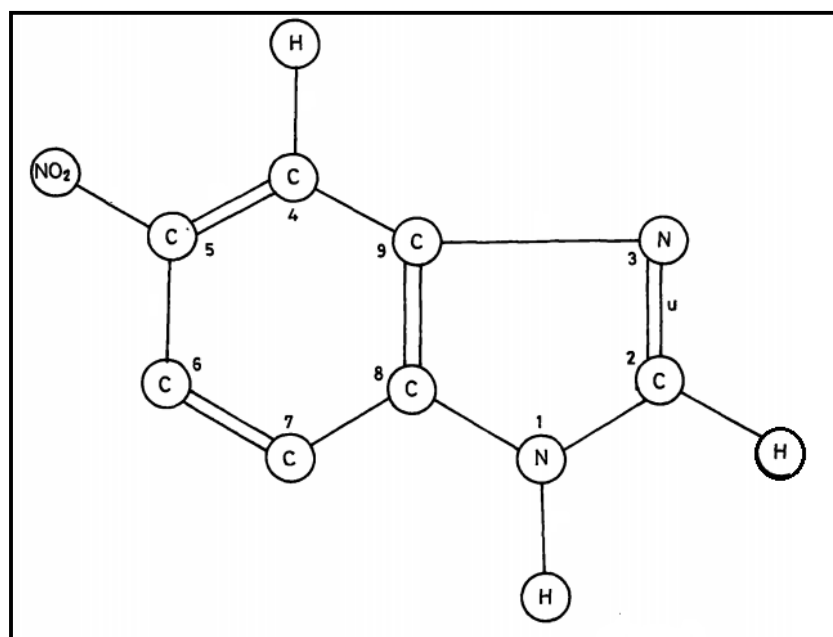


Figure 19. Structure moléculaire de 5-Nitrobenzimidazol (**Katarzyna et al., 2012**).

Plusieurs études ont appliqué sur le benzène et de ses dérivés vu leur importance biologique et pharmaceutique (**Prabakaran et Mohan, 1991**). Les dérivés nitro des benzimidazoles ont trouvé de larges applications dans diverses branches de la médecine, de la technologie et de l'agriculture. Depuis longtemps, ils ont été utilisés comme radio-sensibilisateurs, anesthésiques, anticancéreux, colorants, plastifiants, liquides ioniques, pesticides, herbicides et régulateurs de croissance des plantes (**Larina et Lopyrev, 2005**).

Différentes études ont révélé que les dérivés du benzimidazole présentent un intérêt considérable en tant qu'agents antimicrobiens (**Ates-Alagoz, 2016**) et anticancéreux (**Yadav et al., 2016**). Cependant, le criblage antitumoral *in vitro* des benzimidazoles en direction des lignées cellulaires cancéreuses a démontré que ces composés sont les analogues les plus puissants vis-à-vis de toutes les lignées cellulaires testées (**El-Gohary et Shaaban, 2017**).

I.2. Les produits de synthèse

La cristallographie de petites molécules est une technique qui emploie un cristal unique de diffractométrie de rayons X pour déterminer la structure tridimensionnelle des molécules. La technique implique l'utilisation de la cristallographie pour étudier les problèmes qui sont essentiellement de nature chimique et fournit des mesures exactes et précises de dimensions moléculaires d'une manière qu'aucune autre méthode ne peut approcher. Cristallographie chimique peut être appliquée à des composés chimiques et de grand intérêt biologique, y compris: de nouveaux produits chimiques de synthèse, les catalyseurs, produits pharmaceutiques et produits naturels (Bordet, 2008).

Au cours des dernières années, la synthèse de nouveaux composés hétérocycliques a suscité un grand intérêt en raison de leur large applicabilité. Les composés hétérocycliques sont très répandus dans la nature et sont essentiels à la vie. Parmi une grande variété de composés hétérocycliques, les hétérocycles à groupement phthalazine présentent un intérêt car ils présentent certaines activités pharmacologiques et biologiques (Sayyafi *et al.*, 2008).

Les phthalazines condensées, contenant deux atomes d'azote de tête de pont dans un système cyclique condensé, présentent un intérêt particulier et un travail important a été consacré à leur synthèse. On a rapporté que de nombreux dérivés de phthalazine condensés présentaient un large éventail d'activités biologiques; notamment anticancéreux, antimicrobiens, anti-inflammatoires et antioxydants (Lamera *et al.*, 2017).

Dans ce cadre, nous avons envisagé l'élaboration de nouveaux composés associant différents hétérocycles. Des nitrocomposés nouvellement synthétisés ont été synthétisés au niveau de laboratoire de cristallographie (Université de Constantine, Algérie) (Fig.20).

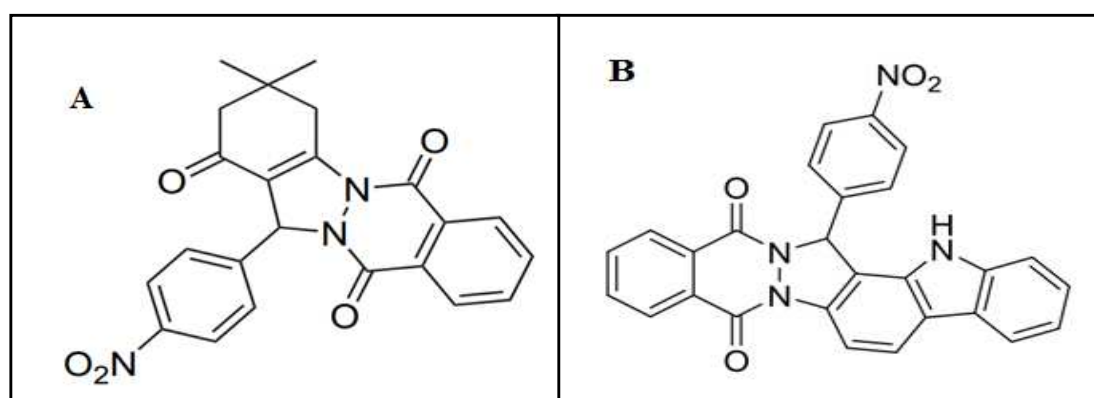


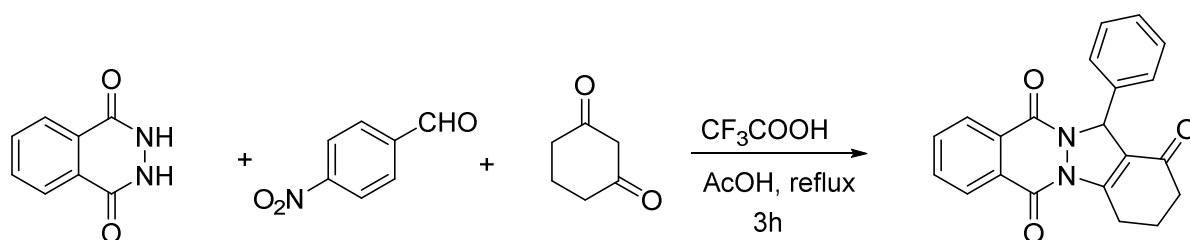
Figure 20. Structure chimique de ABL 244 (A) (Sayyafi *et al.*, 2008) et de ABL 245 (B)

(Lamera *et al.*, 2017).

I.2.1. ABLE 244

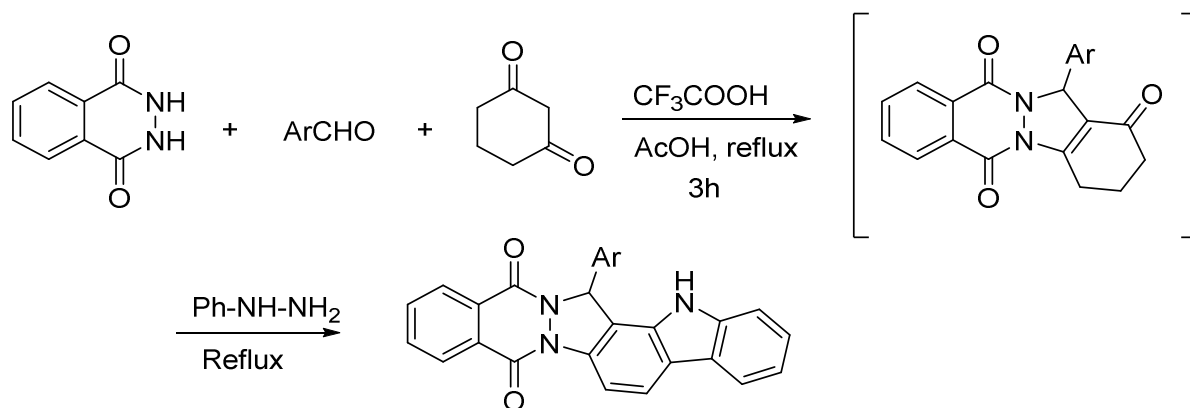
Le 13-(4-nitrophényl)-3,4-dihydro-2H-indazolo [1,2-b] phtalazine- 1,6,11 (2H, 13H) -trione (ABLE 244) (**Fig. 20A**) a été préparée selon la procédure modifiée (**Sayyafi *et al.*, 2008**) via la réaction multi-composants de phtalhydrazide (1 mmol), 1,3 cyclohexadione (1,05 mmol) et 4-nitrobenzaldéhyde (1,05 mmol) au reflux de l'acide acétique et en présence d'une quantité catalytique de l'acide trifluoroacétique.

La réaction est illustrée dans le schéma suivant:



I.2.2. ABLE 245

Le 16-(4-nitrophényl)-1,16-dihydrophthalazino [2',3':1,2] pyrazolo [4,3-a] carbazole-9,14 dione (ABLE 245) (**Fig. 20B**) a été obtenue en deux étapes par une réaction « *one pot* » selon la procédure décrite par (**Lamera *et al.*, 2017**). Cette réaction s'effectue au reflux d'acide acétique et en présence d'acide trifluoroacétique. Après la conversion totale du phtalhydrazide, en présence de 1.05 équivalent du 1,3-cyclohexadione et 1 équivalent du 4-nitrobenzaldéhyde, en dérivé 1*H*-indazolo [1, 2-b] phtalazine-1,6,11(2*H*,13*H*)-trione 1 (suivie par CCM), 1.7 équivalent du phénylhydrazine sont ajoutés au mélange réactionnel, ce qui donne accès au phtalazino [2',3':1,2] pyrazolo [4,3-a] carbazole, correspondant avec un rendement de 80% (selon la réaction suivante).



II. Matériel biologique

II.1. Les animaux utilisés

Toutes les procédures expérimentales et de gestion impliquant des animaux ont été réalisées par du personnel qualifié en stricte conformité avec les directives espagnoles (RD 1201/2005 du 10 octobre 2005) pour la protection expérimentale des animaux à l'Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Les protocoles expérimentaux ont été approuvés (1er octobre 2012) par le Comité d'éthique pour la recherche animale à l'Unité de nutrition animale.

Les expériences sont réalisées sur neufs chèvres (Murciano-Granadina), âgés de 12 mois, ayant un poids moyen de $(37,8 \pm 5,73 \text{ kg})$ et munis de fistules permanentes de 50 mm de diamètre (**Fig. 21**). Elles ont eu un accès libre à l'eau et ont été nourries deux fois par jour (09:00 et 16:00 h), un régime constitué de foin de luzerne de 15 à 20 cm et d'avoine dans une proportion de 60:40 (**Tab. III**).

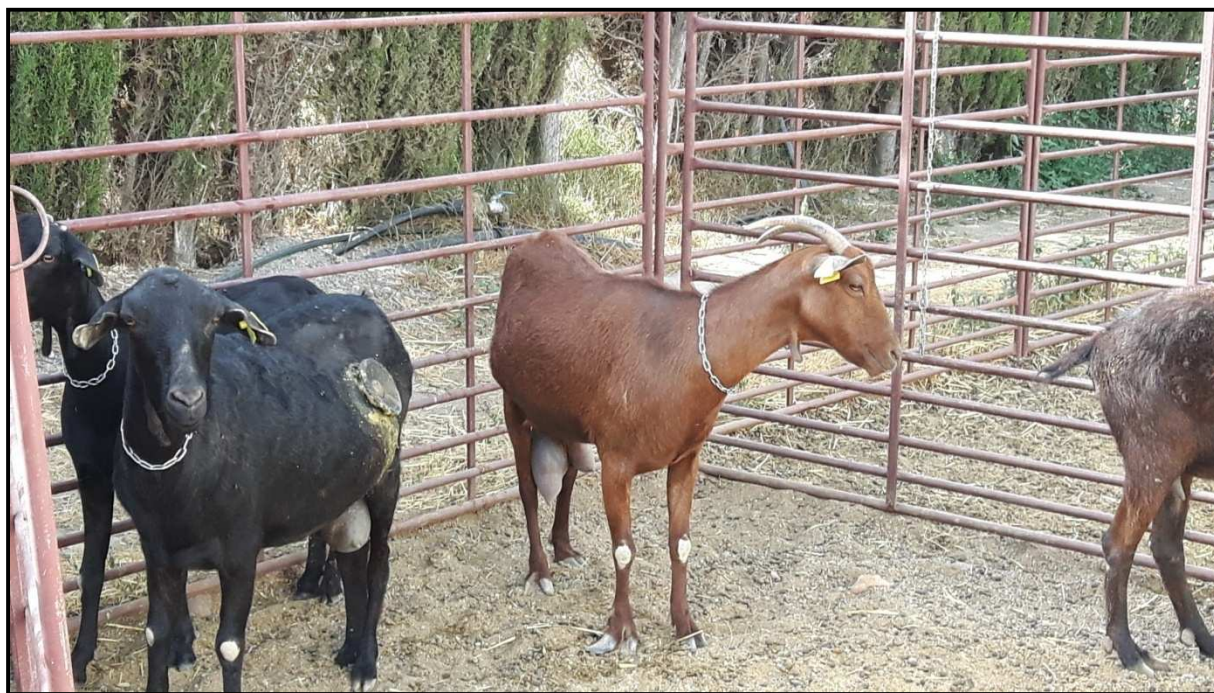


Figure 21. Chèvres fistulées servant pour les études *in vitro*

Les animaux ont été soignés et manipulés conformément aux directives espagnoles sur la protection expérimentale des animaux (décret royal 53/2013 sur la protection des animaux utilisés à des fins d'expérimentation ou à d'autres fins scientifiques) conformément à la directive européenne correspondante (2010/63 / UE).

Tableau III. Composition chimique du foin de luzerne et de l'avoine (g / kg de matière sèche).

	Luzerne	Avoine
Matière sèche (MS) (g/kg de matière fraîche)	907	912
Matière organique (MO)	875	975
Protéine brute*	193	103
NDF	517	263
ADF	334	67.4
ADL	103	13.2
Extrait d'éther 9.4 19.9	9.4	19.9
Energie brute, MJ / kg de MS	18.5	21.1

*Protéines brute = $N \times 6.25$.

II.2. L'échantillonnage

Le jus de rumen a été recueilli des chèvres canulées avant l'alimentation matinale. Il est acheminé du lieu d'élevage au laboratoire dans des thermos préalablement chauffés à 39°C et saturés de CO₂.

Au laboratoire, le jus ruminal est bien mélangé, puis filtré à travers deux couches de bande à gaz stériles et barboté avec du CO₂ à 39°C, à fin de l'utiliser comme inoculum pour les différentes manipulations *in vitro* (production de gaz, méthane, acides gras volatiles et concentrations de protozoaires ruminales).

III. Méthodes

III.1. Fermentation *in vitro*

La technique de production de gaz *in vitro* est une simulation de la dégradation des aliments par les microorganismes dans le rumen. Elle a été, à l'origine, développée par **Menke *et al.* (1979)** puis modifiée par **Menke et Steingass (1988)**. C'est une technique rapide, simple et peu coûteuse, elle se base sur la mesure de la production de gaz (méthane et gaz carbonique) qui sont les produits fermentaires essentiels, résultant de la dégradation microbienne, en plus des gaz libérés à partir du système tampon, induit par la production des acides gras volatils

(Blümmel et Orskov, 1993). Cette technique permet aussi le suivi de la cinétique de la fermentation microbienne.

Les tests d'effets des produits nitreux sur la production du méthane ruminal ont été réalisés par culture en batch (Theodorou *et al.*, 1987) dans des flacons Wheathon d'une capacité de 120ml (Fig.22).

Le milieu de culture consistait en une salive artificielle (Menke et Steingass, 1988), contenant les solutions macro et micro minérales est préparée selon les compositions décrites dans les **tableaux IV et V**. La solution de résazurine et la solution tampon bicarbonate sont préparées selon la procédure décrite par (Van Soest *et al.*, 1966). Le milieu est maintenu à 39°C et saturée en CO₂. L'Oxygène du milieu est réduit par l'ajout d'une solution réductrice contenant de la cystéine-HCl et Na₂S, selon la procédure décrite par (Van Soest *et al.*, 1966).

La solution est barbotée avec un flux continu du CO₂, ce qui entraîne la réduction de la salive artificielle indiquée par le virage de la couleur du rose au transparent (Krishnamoorthy *et al.*, 1991) (Annexe. 3).

Tableau IV. Préparation des solutions de la salive artificielle (Theodoreau *et al.*, 1994)

Solution	Composition	Quantité
Solution des éléments majeurs	Na ₂ HPO ₄	5.7 g
	KH ₂ PO ₄	6.2 g
	MgSO ₄ ×7H ₂ O	0.6 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution des éléments traces	CaCl ₂ ×2H ₂ O	13.2 g
	MnCl ₂ ×4H ₂ O	10.0 g
	CoCl ₂ ×6H ₂ O	1 g
	FeCl ₂ ×6H ₂ O	0.8 g
	Eau distillée	100 ml
Solution tampon	NaHCO ₃	35 g
	(NH ₄) HCO ₃	4 g
	Eau distillée	1000 ml
Solution de Resazurine	C ₁₂ H ₆ NO ₄	100 mg
	Eau distillée	100 ml
Solution réductrice	Na ₂ S×7H ₂ O	285 mg
	NaOH (1N)	2 ml
	L-Cystéine	285 mg.
	Eau distillée	47.5 ml

Tableau V. Composition de la salive artificielle selon (Theodoreau *et al.*, 1994)

Solution	Volume (ml)
Solution micro minérale	4,80
Solution tampon	950
Solution macro minérale	950
Resazurine	4,80
Solution réductrice	190



Figure 22. Système de fermentation en batch (flacons Wheathon).

A cette étape, le jus de rumen est ajouté dans le milieu dans la proportion (1V/3V) ; Chaque flacon de culture *in vitro* contenait 30 ml de milieu et 10 ml de liquide ruminal frais et contenant 300 mg de foin d'avoine et les additifs nitreux (KNO₃, NIP, 5-NBZ, ABLE 244 et ABLE 254) avec différentes concentrations : 0, 2, 8 et 12 µM.

Les flacons de culture ont été immédiatement bien fermés avec des bouchons en butyl, puis sertis avec une capsule en aluminium (Fig.22) et incubés sans agitation (Wang *et al.*, 2000) à 39°C pendant 24 h.

III.2. Analyse quantitative de la phase gazeuse et mesure de pH

La production de gaz de chaque flacon (65 flacons : 5 additifs \times 4 concentrations différentes \times 3 répétitions + 5 Blancs) a été déterminée après 2, 6, 12 et 24h d'incubation à l'aide d'un Pression-mètre (Wide Range 840065) (**Fig. 23**), muni d'une sonde. Un système de seringues graduées munies d'une valve à trois voies est utilisé d'une part pour permettre la mesure de la pression en millilitre et, d'autre part, pour permettre le prélèvement d'un échantillon de gaz en vue de son analyse chromatographique pour déterminer le volume de méthane produit.

Par la suite, les bouteilles sont placées dans un bain à glace afin d'interrompre la fermentation et sont ouverts pour mesurer le pH de leur contenu à l'aide d'un pH-mètre (pH mètre HI 4521-02).



Figure 23. Pression-mètre

III.3. Analyse et mesure de méthane

Après 24 h d'incubation, un échantillon gazeux (environ 5 ml) a été prélevé dans un tube sous vide (Terumo Europe NV, Leuven, Belgique) pour déterminer le $[\text{CH}_4]$ produit de 12 à 24 h par chromatographie en phase gazeuse selon (**Chaves *et al.*, 2006**), avec un chromatographe en phase gazeuse HP Hewlett 5890 Packard (Waldbronn, Allemagne) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne de polyéthylèneglycol réticulé HPINNOWAX (25m \times 0,2mm \times 0,2 μ m, Teknokroma, Madrid, Espagne).

Le gaz porteur était le N_2 et les pics ont été identifiés et quantifiés en utilisant une courbe standard réalisée en injectant différents volumes de CH_4 pur à 99,9% avant et après l'injection

des échantillons. Des échantillons de 0,5 ml de gaz ont été injectés en utilisant une seringue Sample-Lock® de 1 ml (Hamilton, Reno, NV, USA)

III.4. Analyse qualitative et quantitative des acides gras volatiles

Les acides gras volatils détectés sont l'acide acétique (C2), l'acide propionique (C3), l'acide butyrique (C4), l'acide isovalérique (Ci5), l'acide valérique (C5) et l'acide isobutyrique,

La composition et la teneur des acides gras volatils, présents dans le jus de rumen et produits par la fermentation, sont déterminées par chromatographie en phase gazeuse selon la technique décrite par **Arco-Pérez *et al.* (2017)**. La CPG utilisée est une CPG HP Hewlett 5890 Packard (Waldbronn, Allemagne).

L'injecteur permet la vaporisation de l'échantillon avant son introduction dans une colonne capillaire. Les AGV sont séparés selon leur coefficient de partage entre la phase mobile et la phase stationnaire. Les solutés, détectés par ionisation de flamme, sortent par ordre croissant de leur poids moléculaire. Un intégrateur relié au détecteur du chromatographe calcule les surfaces des pics qui sont proportionnelles à la quantité des composés.

III.4.1. Conditions chromatographiques

La température de l'injecteur et du détecteur FID étaient de 260°C et de 275°C, respectivement. La température de la colonne a été maintenue à 100°C pendant 1 minute, augmentée à 150°C / min jusqu'à 160°C. La pression du gaz vecteur est fixée à 0,5 bar.

III.4.2. Préparation des échantillons

Après 24 heures d'incubations, les flacons sont placés dans un bain à glace afin d'interrompre la fermentation. Après refroidissement un échantillon de 0.8 ml est prélevé dans des tubes epindorff de 2 ml, préalablement libellées, et mélangé avec 0.5 ml de solution d'étalon interne.

Les tubes sont centrifugés à 4000 Tpm à 4 °C pendant 20 minutes avec une centrifugeuse (Hettich Zentrifugen Universal 30RF). A l'aide des pipettes pasteur, les surnageant sont transférés dans des viales préalablement libellés puis ils sont soumis à l'analyse chromatographique.

III.4.3. Préparation des étalons

❖ L'étalon interne

0.8 g de l'acide crotonique et 2 g du réactif métaphosphorique sont pesés puis introduits dans une fiole jaugée de 250 ml. Ce mélange est dissout et ramener au trait de jauge avec une solution HCl (0,5N).

❖ L'étalon mère

Les quantités de standard sont pesées selon le schéma suivant:

Acide acétique: 3 g.

Acide propionique: 1 g.

Acide butyrique: 1 g.

Acide iso butyrique: 0,3g.

Acide valérique: 0,3g.

Acide iso valérique: 0,3g.

Dans une fiole jaugée de 1000 ml, ces quantités de standards sont introduites avec une quantité suffisante d'eau distillée, puis il faut compléter au trait de jauge avec le même solvant (**Boufennara, 2012**).

❖ L'étalon fille

Pour chaque substrat et dans trois tubes epindorff de 2 ml, préalablement libellées, 0,8 ml sont introduits de la solution étalon interne avec 0,8 ml de la solution mère étalon.

Les tubes sont centrifugés à 4000 Tpm et à 4°C pendant 20 minutes. A l'aide des pipettes pasteur, les surnageant sont transférés dans des viales préalablement libellés, ils sont ensuite soumis à l'analyse chromatographique.

III.4.4. Dosage chromatographique

1 ml d'échantillon, préalablement centrifugé, est additionné de 0,1 ml de la solution d'étalon interne et deux gouttes d'acide métaphosphorique. Après homogénéisation, les flacons sont disposés sur le plateau du passeur et un volume fixe d'échantillon (0,25 à 1µl) (**Arco -Pérez et al., 2017**) est injecté en tête de colonne et élué dans les conditions de température et de pression définies précédemment.

En sortie de colonne, les pics, détectés lors de l'étalonnage, permettent de connaître la surface des pics de l'étalon, de calculer la concentration molaire de chacun des composés de l'échantillon par rapport à celle de l'étalon interne selon la formule :

$$Ca = Sa / Se \times Ka$$

Dont : **Ca** est la concentration du composé **a** dans l'échantillon, **Sa** est la surface du pic correspondant au composé **a**, **Se** est la surface du pic correspondant à l'étalon interne, et **ka** le facteur de réponse du composé **a**.

III.5. Comptage des protozoaires

Après 24h de fermentation, le contenu de chaque flacon est mélangé avec la solution MFS (methyl green-formalin-saline) à raison de 50/50 (V/V) ; les cellules sont fixées par le formaldéhyde à 35% et les noyaux sont colorés par le vert de méthyle. Ce mélange, bien homogénéisé, est conservé à l'obscurité pour l'énumération des protozoaires selon la méthode **d'Ogimoto et Imai (1981)**. Les protozoaires ciblés sont les protozoaires ciliés : les *Entodinium* de taille inférieure à 100µm et les *Entodinium* de taille supérieure à 100µm et les holotriches (*Dasytricha* et *Isotricha*). Un profil générique de ces protozoaires est déterminé sous microscope optique à l'objectif ×40, en utilisant une cellule de comptage.

La concentration totale des échantillons en protozoaires ruminiaux est calculée du profil générique obtenu. Chaque échantillon est compté deux fois et si la différence entre les deux résultats est supérieure à 10%, un troisième dénombrement est refait. Les concentrations de protozoaires ont été transformées \log_{10} avant l'analyse statistique.

III.6. La balance d'hydrogène

L'hydrogène produit, l'hydrogène consommé et l'hydrogène récupéré ont été calculés comme décrit dans la méthode de **Goel et al., (2009)**; la récupération d'hydrogène a été calculée par la relation : d'hydrogène consommé / l'hydrogène produit (**Demeyer, 1991**).

L'hydrogène produit comme produits finaux de fermentation et l'hydrogène consommé pour former le méthane ont été déterminés à partir de la quantité et des proportions molaires d'acétate (C2), propionate (C3), butyrate (C4), isovalérate (Ci5) et valérate (C5) et méthane comme décrit dans ce qui suit:

$$H_2 \text{ produit (HP)} = 2 \times C2 + C3 + 4 \times C4 + 2 \times Ci5 + 2 \times C5$$

$$H_2 \text{ utilisé (HU)} = 2 \times C3 + 2 \times C4 + 4 \times \text{méthane} + C5$$

$$H_2 \text{ Récupéré} = (HU / HP) \times 100.$$

IV. Analyses statistiques

L'essai d'incubation a été réalisé en utilisant le fluide ruminal de chacune des trois chèvres pour inoculer les 3 répétitions par traitement (par composé et dose). Les données de production totale de gaz et de CH₄, de AGV et de protozoaires ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics pour Windows, version 23.0, Armonk, New York, USA) par mesures répétées du modèle linéaire général (GLM), y compris les effets fixes de l'interaction composé et dose × additifs nitreux, avec l'animal donneur comme unité expérimentale. La réponse polynomiale à des quantités croissantes de chaque composé a été évaluée en utilisant des contrastes orthogonaux.

Lorsqu'un effet significatif a été trouvé, une comparaison a posteriori des moyennes par composé a été faite en utilisant le test LSD. Les différences ont été déclarées significatives à $P < 0,05$ et considérées comme des tendances vers la significativité à $P < 0,10$.

Résultats
et
Discussion

I. Effets des additifs nitreux sur la fermentation *in vitro*

I.1. Effets des additifs nitreux sur la production de gaz total

Dans le rumen, toute réaction biologique s'accompagne d'une perte d'énergie sous forme de chaleur ou de production de gaz. La digestion des différents arbustes fourragers est associée à une production de gaz d'origine alimentaire, à savoir le dioxyde de carbone (CO₂), éliminé par éructation ou par diffusion directe par la paroi ruminale, et de méthane (CH₄) dont la voie d'élimination est exclusivement l'éructation. La production de gaz dépend essentiellement de la vitesse de dégradation et de la nature des glucides pariétaux caractéristiques de l'arbuste. Elle peut changer aussi d'un milieu ruminal à un autre selon l'espèce.

Les résultats de la production de gaz pour les différents additifs sont consignés dans le **tableau VI** et dans la **Fig. 24**. La production de gaz *in vitro* est significativement différente entre les additifs nitreux et les différentes concentrations (P<0,001).

Après 24 heures d'incubation, ABLE 245 (avec une concentration de 12 µmM) enregistre la plus grande quantité de gaz (343 ml/g MS), il est suivi par ABLE 244 (327 ml/g MS) et 5-NBZ (320 ml/g MS).

Les résultats de la production de gaz pour le Nitrate et le Nitrophénol sont relativement faibles par rapport aux témoins.

En effet, l'ajout de 12 µmM de nitrophénol affiche une valeur de (226ml/g MS), tandis que 8 µmM de nitrate observe une quantité de gaz de (229 ml/g MS) et 12 µmM de cet additif enregistrent une valeur de production de gaz appréciable (166 ml/ g MS).

Cette variation de la production de gaz est associée à la biodégradation des additifs nitreux par le microbiote ruminal et/ ou la solubilité de ces additifs dans la salive artificielle.

En effet, les nitrates et le nitrophénol s'avèrent bien être soluble dans la salive artificielle et bien utilisé par le microbiote ruminal, comparativement aux autres additifs (5-NBZ, ABLE244 et ABLE245).

Le nitrate en tant que source potentielle d'azote et inhibiteur de méthane a été largement étudié. Il est soluble dans l'eau et métabolisée en ammoniacque par les bactéries du rumen dans le rumen (**Lewis, 1951**).

Dans la nature, la plupart des réducteurs de nitrates sont présents dans les Protéobactéries, les Actinobactéries, les *Firmicutes* et les Cyanobactéries (**Bru et al., 2007; Palmer et al., 2012**).

Sur la base d'une analyse approfondie des données de séquençage, **Liping et al., (2015)** ont constaté que les Protéobactéries et les Cyanobactéries étaient linéairement/quadratiquement augmentées avec l'ajout de nitrate spécialement les bactéries du genre *Campylobacter*.

Une réduction de 28% du gaz total a été observée dans les flacons contenant 8 µM et une réduction de 48% avec 12 µM des nitrates, cela revient à la réduction du méthane ruminal après métabolisme du nitrate par les bactéries ruminales. Ceci est prouvé par la plupart des publications qui mentionnent que la production de gaz *in vitro* est positivement influencée par l'ajout des nitrates (**Bozic et al., 2009; Sar et al., 2005a,b; Zhenming et al., 2011; Zhenming et al., 2012; Anderson et al., 2016**).

Dans le rumen, la réduction des nitrates en ammoniac est une étape critique du métabolisme des nitrates. Il est réduit par la nitrate réductase de manière assimilatoire ou dissemblable. Les bactéries ruminales capables de réduire les nitrates *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, *Wolinella succinogenes*, *Campylobacter fetus*, et *Mannheimia succiniciproducens* (**Lin et al., 2013**).

La production de gaz total a diminué de près de 30% ($P < 0,05$) avec 12 µM du Nitrophénol (NIP) comparativement aux cultures témoins (**Fig.24**). Ces résultats indiquent que le NIP affecte négativement la fermentation *in vitro*. Cependant, 5-NBZ, ABLE 244 et ABLE 245 n'ont pas affecté la production de gaz.

Ces nitrocomposés, qui réduisent la production de gaz, peuvent avoir été transformés par des bactéries du rumen; **Kulkarni et Chaudhari (2007)** ont rapporté que la plupart des organismes contiennent des enzymes redox (de nitroréductase), qui transforment des nitro-aromatiques en amines correspondants, par l'addition successive de paires d'électrons donnés par les co-substrats. Les micro-organismes du liquide ruminal ont biocatalysé le nitrophénol pour produire les amines respectives (**Rodríguez et al., 2011**).

Aucun effet sur la production de gaz total n'a été observé ($P > 0,05$) avec ABLE 244 et ABLE 245, probablement parce que la biodégradabilité des produits à longue chaîne par les bactéries est difficile (**Tarayre, 2012**). De même, l'absence d'adaptation des bactéries aux nitro-composés (due à un temps de contact insuffisant) rend leur dégradation difficile (**Mazzeo et al., 2010**).

Tableau VI. Effets des additifs nitreux sur la production de gaz total et du méthane *in vitro*, après 24h d'incubation

		Concentration ($\mu\text{M}\cdot\text{ml}^{-1}$)				SEM	<i>p</i>
	Additifs	0	2	8	12		
Gaz total (ml/g MS)	KNO₃	321 ^a	326 ^a	229 ^{ab}	166 ^b	3.33	0.002
	NIP	321 ^a	327 ^a	275 ^{ab}	226 ^b	3.39	0.009
	5-NBZ	321	320	305	284	3.21	0.546
	ABLE244	321	327	321	321	3.25	0.995
	ABLE245	321	331	323	343	2.60	0.827
CH ₄ (ml/ml)	KNO₃	0.181 ^a	0.156 ^a	0.119 ^{ab}	0.070 ^b	0.01	0.001
	NIP	0.181 ^a	0.183 ^a	0.122 ^{ab}	0.062 ^b	0.01	0.002
	5-NBZ	0.181 ^a	0,158 ^a	0.139 ^{ab}	0.121 ^b	0.01	0.031
	ABLE244	0.181	0.156	0.167	0.156	0.01	0.469
	ABLE245	0.181	0.158	0.162	0.177	0.01	0.954
CH ₄ (ml/g MS)	KNO₃	58.1 ^a	50.8 ^a	27.2 ^{ab}	11.6 ^b	1.26	0.001
	NIP	58.1 ^a	59.8 ^a	33.5 ^{ab}	14.0 ^b	1.36	0.004
	5-NBZ	58.1 ^a	50.5 ^a	42.3 ^{ab}	34.3 ^b	1.21	0.050
	ABLE244	58.1	51.0	53.6	50.0	1.22	0.870
	ABLE245	58.1	52.2	52.3	60.7	1.25	0.822

KNO₃: Nitrate de sodium; *NIP*: Nitrophenol; *5-NBZ*: 5-Nitrobenzimidazol; *ABLE 244* et *ABLE 24*: Produits de synthèse.

S.E.M. : erreur standard des moyennes *a, b, ab*: moyennes dans la même colonne affectées avec des lettres différentes sont significativement différentes ($P < 0,01$).

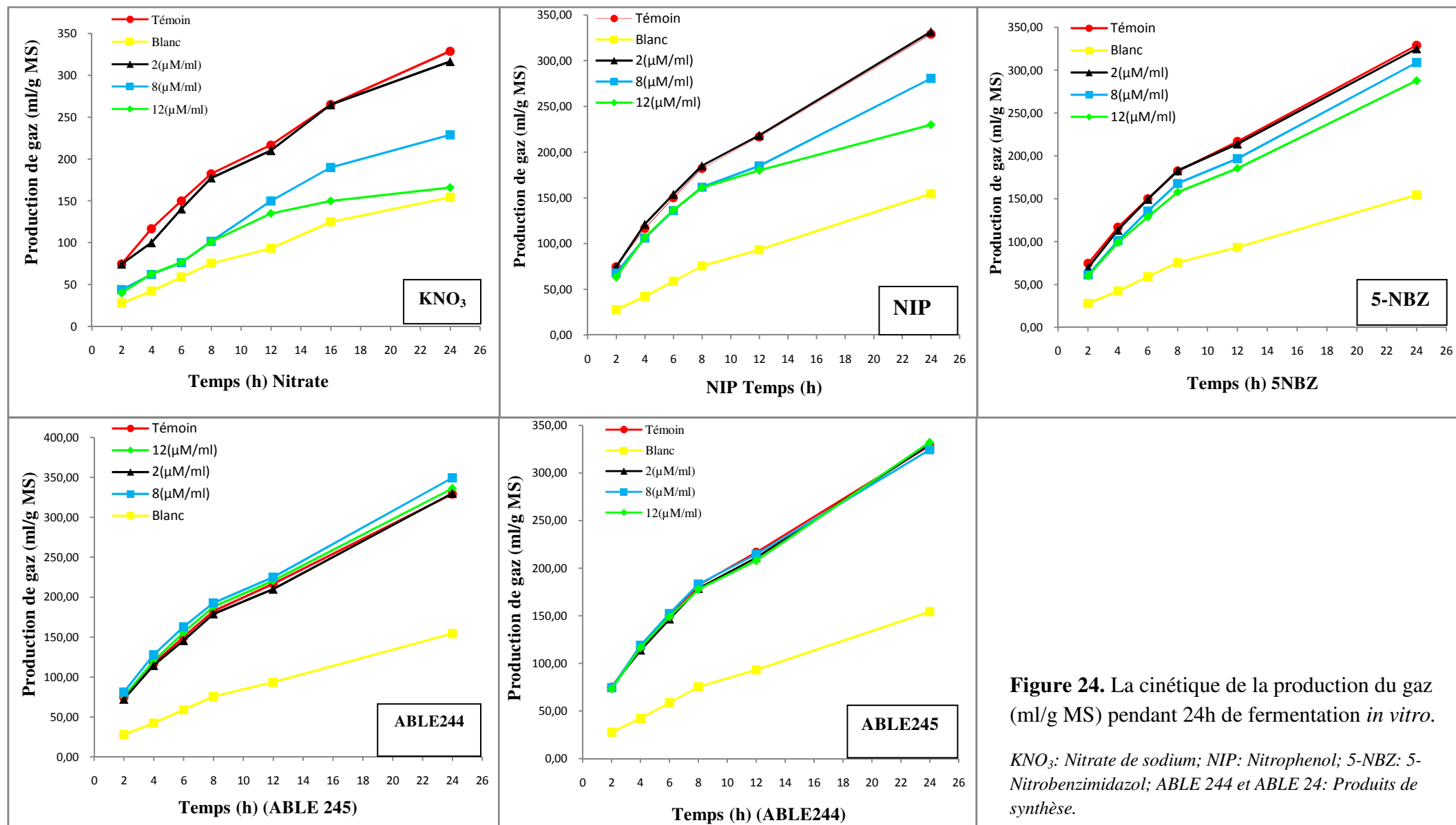


Figure 24. La cinétique de la production du gaz (ml/g MS) pendant 24h de fermentation *in vitro*.

KNO₃: Nitrate de sodium; NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 et ABLE 24: Produits de synthèse.

I.2. Effets des additifs nitreux sur la production du méthane

Le méthane est l'un des gaz à effet de serre les plus puissants et il contribue de manière significative à la pollution de l'environnement. L'élevage contribue à environ 20% (microbiote ruminal et fermentation des déchets d'origine animale).

Les résultats de la production de CH₄ sont présentés dans le **tableau VI**. La production de méthane est négativement affectée par l'addition de nitrate (P<0,001). Après 24h de fermentation, les nitrates réduisent significativement la production de CH₄ (P < 0,001). Cet effet est dose dépendant (**Fig. 25**). A 12μM, les nitrates ont engendré une diminution de 80% de la production de CH₄. Alors que, la dose de 8μM baisse 53% de la production de CH₄. Plusieurs études ont rapporté la capacité des nitrates à diminuer la méthanogenèse ruminale.

Zhenming et al. (2012) ont testé l'effet de 4 doses de nitrate (12, 24, 36, et 48 μM/ml de milieu de culture) sur la méthanogenèse ruminale *in vitro* et ont rapporté une diminution linéaire de la production de CH₄ qui a atteint les 70% avec 12 μM/ml et presque complète avec les doses ≥ 24 μM/ml. Cette réduction est accompagnée d'une par l'inhibition de la cellulolyse.

L'effet des nitrates sur la méthanogenèse est également testé par l'ajout des fourrages riches en nitrate (*Hordeum vulgare* contenant 1.69% de nitrate) à la fermentation *in vitro* et les résultats indiquent que ces plantes riches en nitrate peuvent diminuer la production du méthane de 35 à 87% (**Anderson et al., 2016**).

Par ailleurs, l'effet de nitrate avec des concentrations entre 22 et 30 μmol/ml sur les caractéristiques de la fermentation ruminale est évalué *in vitro* et toutes les doses des nitrates baissent la production de gaz et inhibent parallèlement la production de CH₄ de 98% (**Bozic et al., 2009**).

L'inhibition de la production de CH₄ par les cultures ruminales a été attribuée à la toxicité directe du nitrite en méthanogènes (**Bozic et al., 2009; Sar et al., 2005**), mais la concentration de nitrite résultant de la réduction du nitrate n'a pas été mesurée dans cette étude. Outre le nitrite, plusieurs autres mécanismes peuvent contribuer à l'inhibition de la production de CH₄ dans les cultures ruminales.

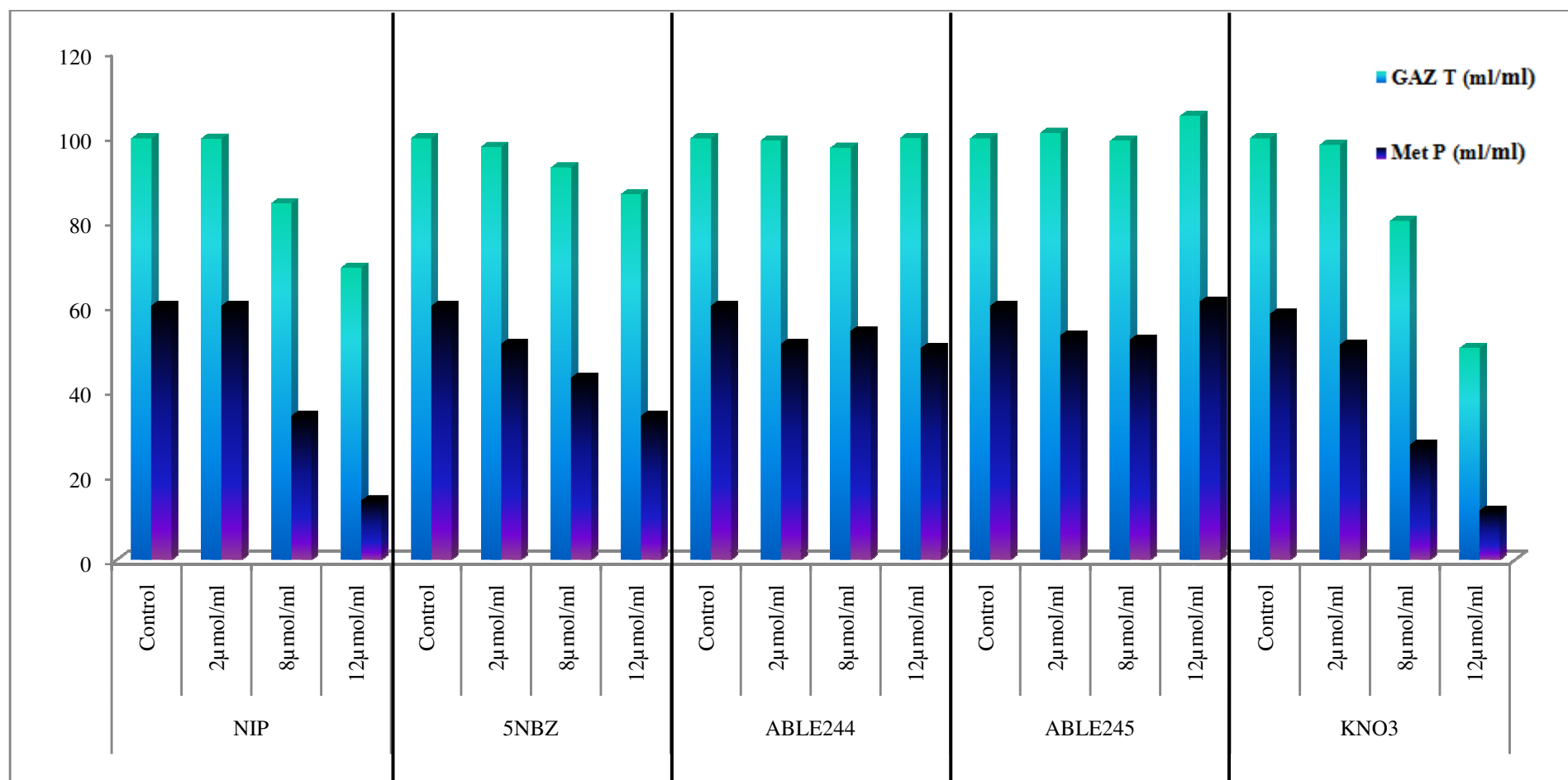


Figure 25. Production de méthane et de gaz total (ml/ml) en présence de différentes concentrations des produits nitreux.

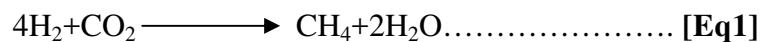
KNO₃: Nitrate de sodium; NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 et ABLE 24: Produits de synthèse. Gaz T : Gaz total ; Met P : Méthane produit.

Premièrement, le nitrate peut servir de puits d'électrons plus compétitif que le CO₂. Deuxièmes, la production de H₂ peut être inhibée par le nitrate, réduisant la disponibilité de H₂, l'équivalent réducteur primaire de la méthanogenèse dans le rumen.

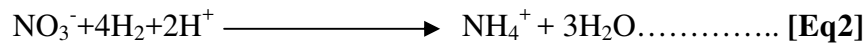
Enfin, comme l'ajout de nitrate peut augmenter les concentrations d'ammoniac dans le rumen (Sar et al., 2005) et que l'ammoniac à forte concentration peut inhiber les méthanogènes (Chen et al., 2007), une concentration accrue d'ammoniac pourrait également contribuer à l'inhibition du CH₄.

L'hydrogène (H₂) de NADH généré par la fermentation microbienne de la matière organique dans le rumen fournit des électrons qui réduisent le CO₂ en CH₄. Lorsqu'il est présent, Le NO₃⁻ a plus d'affinité pour ces électrons que le CO₂, et la production de CH₄ est abaissée. Le NO₃⁻ est réduit d'abord en NO₂⁻ puis en d'ammoniac et le CH₄ est réduite en conséquence (Jones, 1972).

Les deux réactions peuvent être couplées à des systèmes de transport d'électrons qui génèrent de l'ATP pour soutenir la maintenance et la croissance microbiennes. Les réactions respectives sont les suivantes:

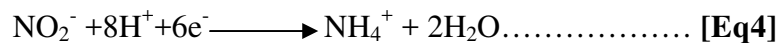
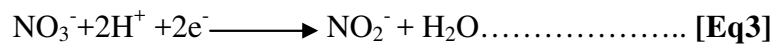


$\Delta G_o' = -175\text{kJ/réaction}$ (Contrad et Wetter, 1990)



$\Delta G_o' = -598\text{kJ/ réaction}$ (Allison et Reddy, 1984).

Les microbes du rumen utilisent le H₂ pour réduire les nitrates (Eq2) via deux réactions redox séparées :



Ce processus consommant huit électrons, l'équivalent de 4 μmol d'hydrogène, pour chaque micromole de nitrate réduite en ammoniac (Anderson et al., 2016). Les huit électrons du H₂ utilisés pour les réductions de nitrates ne sont pas disponibles pour la formation de CH₄.

Les deux réactions redox sont catalysées par des enzymes microbiennes intracellulaires, les nitrates et les nitrites réductases, respectivement. Les réductases assimilatrices prédominent probablement dans le rumen (Jones, 1972) sauf lorsque le NO₃⁻ alimentaire est présent à des concentrations assez élevées.

Les taux des deux réactions augmentent avec l'adaptation de populations microbiennes du rumen aux nitrates (Allison et Reddy, 1984 ; Alaboudi et Jones, 1985). L'accumulation de nitrite dans le contenu du rumen ne se produira que si la vitesse de l'équation 4 [Eq4] est insuffisante pour éliminer le NO_2^- (Dawson et Allison 1988). Lorsque NO_3^- s'accumule dans le contenu du rumen, il peut affecter la composition des microbes du rumen et le nitrate absorbé peut affecter les processus physiologiques dans les tissus animaux. Il est important de noter que le NO_2^- ruminal inhibe la croissance de certains micro-organismes, y compris les bactéries cellulolytiques; cela peut à son tour affecter la digestibilité des aliments et la production animale (Marais *et al.*, 1988).

La **figure 26** résume les étapes de l'utilisation des nitrates par le microbiote ruminal. Les sels de nitrate sont très solubles et le NO_3^- ingéré sera donc rapidement libéré dans le contenu du rumen. Les premières études de Lewis (1951) et d'autres chercheurs ont démontré qu'une seule dose intraruminale de NO_3^- était rapidement absorbée par les micro-organismes et rapidement réduite en NO_2^- . Le nitrite s'est ensuite accumulé dans le liquide du rumen, parce que la vitesse de la voie de nitrites vers l'ammoniac n'était pas au même rythme que le nitrate.

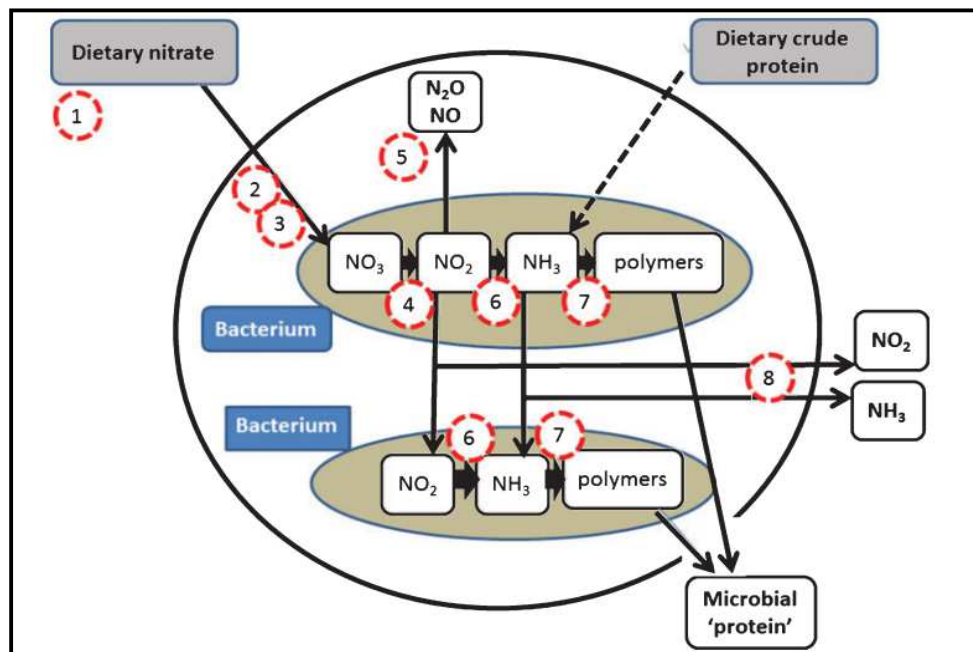


Figure 26. Principales voies métaboliques du nitrate (NO_3^-) et du nitrite (NO_2^-) dans le rumen (Nolan *et al.*, 2016).

1: NO_3^- dans l'alimentation; 2: taux de solubilité du NO_3^- dans le rumen ; 3: pénétration de NO_3^- dans des cellules microbiennes; 4: réduction intracellulaire de NO_3^- en NO_2^- ; 5: produits gazeux du métabolisme; 6: réduction intracellulaire de NO_2^- en ammoniac; 7: utilisation de l'ammoniac pour la synthèse de polymères microbiens; 8: absorption de NO_2^- et d'ammoniac du rumen.

Le potentiel d'inhibition du méthane par le nitrate dépend en grande partie de microbiote ruminal réducteur de nitrates suffisamment actif, tels que ceux qui ont été adaptés au nitrate par exposition préalable.

Les bactéries du rumen capables de réduire NO_3^- et NO_2^- comprennent *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, *Wolinella succinogenes* (Stewart et Parales, 1988), *Veillonella alcalescens* (Inderlied et Delwiche, 1973), *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* et *R. flavefaciens* (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2010).

Allison et Reddy (1984) ont identifié cinq grands groupes de bactéries provenant de moutons qui avaient été adaptés au NO_3^- alimentaire. Deux groupes ayant la capacité de réduire le NO_3^- et de métaboliser le formate ont été identifiés comme des *Selenomonas*; un troisième groupe métabolise le formate et réduit le NO_3^- et produit principalement du lactate. Un quatrième groupe identifié comme *Anaerovibrio spp* était incapable de réduire NO_3^- , plus tard, Iwamoto *et al.* (2002) ont montré que pour *S. ruminantium*, seule la sous-espèce *lactilytica* était capable de réduire les NO_3^- et NO_2^- .

Yoshida *et al.* (1982) et Iwamoto *et al.* (2002) ont conclu que les protozoaires, producteurs de H_2 , jouent également un rôle important dans la réduction du NO_3^- dans le rumen. Lin *et al.* (2011) ont constaté que les taux de réduction du NO_3^- par une fraction riche en protozoaires du contenu *in vitro* du rumen étaient similaires à ceux des teneurs en rumen entières. Cependant, l'accumulation de NO_3^- ou de ses produits de réduction dans le contenu du rumen semble inhiber la croissance des protozoaires (Sar *et al.*, 2005).

Une fraction riche en champignons du contenu du rumen semble aussi métaboliser le NO_3^- , mais seulement lentement (Lin *et al.*, 2011).

Après pénétration de nitrate dans la cellule bactérienne, Trois types distincts de nitrate réductases catalysent la réduction de nitrates en NO_2^- ; une réductase périplasmique (Nap), une réductase respiratoire liée à la membrane (Nar) et une réductase assimilatrice cytoplasmique (Nas) (Andrade et Einsle, 2013) (Fig. 27).

Les inhibiteurs connus des nitrates réductases comprennent les ions cuivre (Cu_2^+), fer (Fe_2^+), zinc (Zn_2^+), cyanure, thiocyanate, chloromercuribenzoate et p-hydroxybenzoate (BRENDA, 2015); Cependant, peuvent inhiber complètement la réduction du NO_3^- en empêchant donc la réduction du CH_4 , ce qui n'est pas notre intention. Une stratégie légitime consisterait à réduire le taux de réduction de NO_3^- dissimilatoire en NO_2^- , tout en maintenant ou en augmentant le taux de réduction du NO_2^- en ammoniac, minimisant ainsi l'accumulation de NO_2^- .

Un moyen possible d'empêcher l'accumulation de NO_2^- dans le rumen des ruminants nourris au nitrate pourrait être d'inoculer le rumen avec des microorganismes comme *E. coli* qui ont été génétiquement modifiés pour avoir une activité plus élevée de nitrite réductase (Sar *et al.*, 2005).

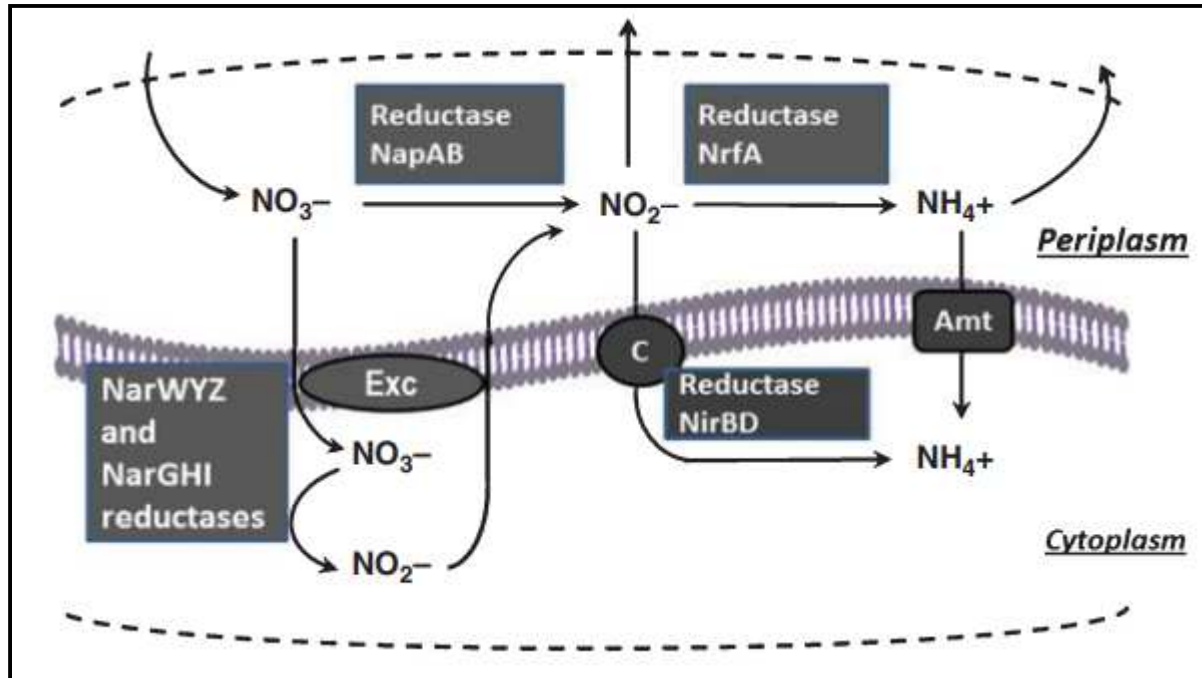


Figure 27. Diagramme montre les enzymes qui interviennent dans le métabolisme de l'azote chez les bactéries ruminales (Andrade et Einsle, 2013).

Le nitrate (NO_3^-) est importé dans le cytoplasme et réduit en nitrite (NO_2^-) par les nitrates réductases cytoplasmiques NarGHI et NarWYZ. Ce NO_2^- est exporté dans le périplasm par des protéines transmembranaires NarK et NarU (Exc). Les nitrates et nitrite réductases périplasmiques dissemblables NapAB et NrfA métabolisent l'excès de NO_3^- . La nitrite réductase cytoplasmique NirBD, associée au canal NO_2^- (NirC) et au transporteur d'ammonium (Amt), permet l'assimilation de l'ammoniac pour la synthèse de polymères bactériens. Du NO_2^- et de l'ammoniac inutilisés (NH_4^+) sont exportés de la cellule bactérienne.

Par ailleurs, Zhenming *et al.* (2012) ont montré que la flore bactérienne ruminale, les archées et les principales bactéries cellulolytiques ruminales n'ont pas été affectées par l'ajout de nitrates, sauf avec l'utilisation des concentrations élevée $\geq 24 \mu\text{M/ml}$ de nitrate.

Le NIP et le 5-NBZ avec des concentrations élevées (12 $\mu\text{M}/\text{ml}$) inhibent de façon significative (jusqu'à 60%) la production de CH_4 ($P < 0,05$) (**Tab. VI**). Ces nitrocomposés, qui réduisent la production de CH_4 et de gaz, peuvent être métabolisés par des bactéries du rumen; **Kulkarni et Chaudhari (2007)** ont rapporté que la plupart des organismes contiennent des enzymes nitroréductases, qui transforment des nitro-aromatiques en amines.

Rhodococcus erythropolis, *Rhodococcus sp.*, *Nocardioides sp.*, *Nocardioides simplex* et *Rhodococcus sp.* sont capables de se développer en utilisant le nitrophénol comme unique source de carbone et / ou d'azote et d'énergie (**Kou-San et Rebecca, 2010**).

A ce jour, peu d'études scientifiques, bien qu'elles soient nombreuses dans ce domaine, rapportent des données concluantes sur l'effet des produits nitreux aromatiques, tel que le nitrophénol et Nitrobenzimidazol, sur la méthanogenèse ruminale, car elles se sont généralement focalisées sur des tests *in vitro*, réalisés sur des produits simples de chaînes carboniques courtes.

Ces produits nitreux aromatiques peuvent être dégradés dans des conditions anaérobies en dérivés nitrés, hydroxylamines ou amines est catalysée par les nitroréductases par l'addition successive de paires d'électrons données par des co-substrats (**Nishino et Spain, 2006 ; Zhang et al., 2009**). Alors que nous émettons l'hypothèse que la réduction de ces produits en amines (**Fig. 28**) (**Rodríguez et al., 2011**) peut consommer une partie du réducteur épargné de la production de CH_4 , cette hypothèse n'a pas encore été confirmée. Si elle est confirmée, nous proposons que la réduction et le métabolisme ultime du Nitrophénol ou du 5-Nitrobenzimidazol donnent une stratégie d'inhibition du CH_4 plus intéressante, car les acides aminés produits seraient plus intéressants.

Cependant, Une revue par **Heider et Fuchs (1997)** a résumé les voies qui permettent aux bactéries d'utiliser des composés aromatiques en l'absence d'oxygène. Cet article portait sur des réactions inconnues auparavant et sur les caractéristiques enzymatiques de ces nouvelles voies métaboliques.

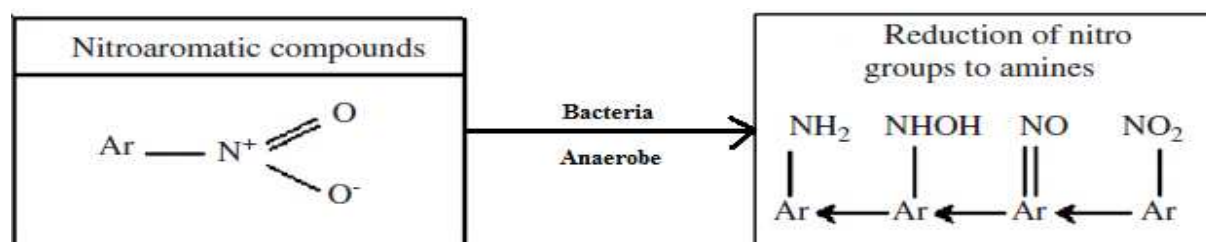


Figure 28. Stratégie microbienne de la dégradation des composés nitro-aromatiques en anaérobie (**Kulkarni et Chaudhari, 2007**)

Les oxydoréductases et les décarboxylases ont été suggérées des enzymes impliquées dans la transformation anaérobie de composés aromatiques. La carboxylation, la déshydroxylation réductrice, la désamination réductrice, la déshalogénéation réductrice, l'oxydation des groupes carboxyméthyle, l'oxydation du méthyle, la déméthylation, la transhydroxylation et la décarboxylation ont été discutées en tant que réactions métaboliques périphériques possibles au cours du processus de transformation anaérobie. La carboxylation a été proposée comme première étape de la biotransformation des composés aromatiques dans des conditions réductrices de sulfate par d'autres chercheurs (**Meckenstock *et al.*, 2000; Zhang et Young, 1997**).

Taylor *et al.* (1970) ont confirmé que l'acide aromatique, le benzoate, était anaérobiquement minéralisé par des cultures mixtes enrichies à partir de ruminants, par des voie anaérobie tout à fait distincte de la voie aérobie. La minéralisation de 60 à 70% du carbone associé au benzoate en CO₂ au cours de la respiration anaérobie indiquait une rupture du cycle du benzène et une dégradation dans des conditions anaérobies.

Le métabolisme des composés nitro-aromatiques chez les bactéries reste un domaine d'étude très riche et il reste encore beaucoup à explorer dans le futur.

L'ajout de nitrophénol et le 5-Nitrobenzimidazol pourrait avoir provoqué une diminution de microbiote ruminal et réduit donc, le nombre de bactéries et/ ou de protozoaires, en provoquant une réduction de CH₄.

Les composés nitro-aromatiques peuvent avoir un effet sur les bactéries et les protozoaires car ils sont largement utilisés comme agents thérapeutiques contre diverses infections protozoaires et bactériennes (**Buschimi *et al.*, 2009 ; Aravena *et al.*, 2010 ; Peter et Ratnasamy, 2014**).

Aucune réduction significative de méthane n'a été observée avec les deux composés nouvellement synthétisés ; ABLE 244 et ABLE 245 (P> 0,05) (**Tab.VI**). Contrairement aux résultats obtenus par **Anderson *et al.* (2010)** qui ont montré une bonne réduction de méthane par des produits nouvellement synthétisés. Peut être expliqué par l'insolubilité de ces produits dans la salive artificielle et/ou leur non-biodégradabilité par le microbiote ruminal (produits à des chaînes carboniques longues).

I.3. Evolution du pH

Le pH est un paramètre très important dans la régulation et l'optimisation des fermentations ruminales. Le pH du jus de rumen fraîchement collecté est de 6,31. Cette valeur indique des conditions physico-chimiques favorables à une bonne activité fermentaire du microbiote ruminal. Après l'addition de la salive artificielle, une légère augmentation de pH a été constatée. Le pH du mélange jus du rumen/salive artificielle a atteint une valeur moyenne de 6.75. Cette augmentation de pH peut être expliquée par l'effet tampon de la salive artificielle qui contribue à la neutralisation de l'acidité du milieu (**Mould *et al.*, 2005**).

Après 24 h de fermentation, pour tous les produits, les valeurs de pH enregistrées sont au-dessus du seuil critique d'inhibition de la croissance et de l'activité cellulolytique du microbiote ruminal (**Hoover, 1986**) ; $\text{pH} \geq 6$.

La valeur de pH est significativement distincte entre les trois premiers produits testés (KNO_3^- , NIP, 5-NBZ) ($P < 0,001$) (**Tab.VII**). Le pH passe de 6.98 à 6.86 et 6.80 respectivement pour KNO_3^- , NIP et 5-NBZ. L'augmentation du pH pourrait être causée par la production accrue d'ammoniac provenant de l'ammonification des nitrates respiratoires. Cette explication corrobore la conclusion d'une étude *in vitro* antérieure (**Sar *et al.*, 2005**).

Par ailleurs, l'acidification du milieu de fermentation est essentiellement due à l'accumulation des AGV et de l'acide lactique comme produit final de fermentation dans le milieu (**Bernard *et al.*, 2001** ; **Madrid *et al.*, 2002**).

Le pH dans les cultures avec ABLE244 et ABLE245 variait de 6,75 à 6,77 et ne différait pas significativement, ces résultats indiquent que la fermentation ne s'est finalement pas «adaptée» à ces deux produits dans les cultures ruminales au cours de l'incubation de 24 h (**Zhenming *et al.* 2012**).

I.4. Production d'acides gras volatiles (AGV)

Au cours de la fermentation ruminale, la population de micro-organismes (surtout les bactéries) fermentent les hydrates de carbone et produisent de l'énergie, des gaz, de la chaleur et des acides. L'acide acétique, l'acide propionique et l'acide butyrique sont les trois acides gras volatils (AGV) qui représentent plus de 95% des acides produits dans le rumen (**Morgavi *et al.*, 2010**).

Tableau VII. Evolution du pH dans les différentes cultures après 24h de fermentation

	pH	SEM	P
Liquide ruminal	6.31 ^{ab}	0.07	0.001
Mélange jus du rumen/salive artificielle	6.75 ^{ab}	0.01	0.001
KNO₃	6.98 ^{ab}	0.02	0.001
NIP	6.86 ^a	0.03	0.017
5-NBZ	6.80 ^b	1.21	0.050
ABLE 244	6.77	5.53	0.087
ABLE 245	6.75	4.70	0.461

KNO₃: Nitrate de sodium; NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 et ABLE 24: Produits de synthèse. S.E.M. : erreur standard des moyennes a, b, ab: moyennes dans la même colonne affectées avec des lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,01).

Les AGV qui sont les produits finaux de la fermentation bactérienne sont absorbés à travers la paroi ruminale. Alors que presque tout l'acétate et tout le propionate sont transportés jusqu'au foie, la majorité du butyrate est converti dans la paroi du rumen en un corps cétonique appelé β -hydroxybutyrate. Les corps cétoniques sont des sources d'énergie (matériel de combustion) pour de nombreux tissus dans le corps. Les corps cétoniques proviennent principalement du butyrate produit dans le rumen, mais en début de lactation, ils proviennent aussi de la mobilisation des réserves lipidiques corporelles.

La production des AGV totaux des différents produits est significativement différente entre eux (P<0,01) et entre les différentes concentrations de chaque produits nitreux ajouté (**Tab. VIII**).

Les caractéristiques de fermentation dans les cultures ruminales *in vitro* ont été considérablement modifiées par l'ajout de KNO₃, NIP et 5-NBZ, et les altérations ont varié entre les différentes concentrations testées.

Dans l'ensemble, l'administration de ces trois produits a entraîné une augmentation du pH et une diminution des concentrations totales d'AGV, ce qui concorde avec d'autres rapports d'expériences *in vitro* (**Takahashi et al., 1989 ; Sar et al., 2005**).

Tableau VIII. Effets des additifs nitreux sur les acides gras volatils après 24h de fermentation *in vitro*

		Concentrations ($\mu\text{M.ml}^{-1}$)					
	Additifs	0	2	8	12	SEM	<i>p</i>
AGV totaux (mM)	KNO₃	102 ^{ab}	103.3	97.3 ^{ab}	81.7 ^a	4.70	0.077
	NIP	102 ^{ab}	138 ^a	99.1 ^{ab}	83.4 ^b	5.53	0.087
	5-NBZ	102	119	105	96.3	4.70	0.461
	ABLE244	102	102	104	102	2.66	0.810
	ABLE245	102	103	104	102	2.85	0.729
Acetate (%)	KNO₃	62.3 ^a	62.1	63.0 ^{ab}	79.1 ^b	0.44	0.001
	NIP	62.3	62.0	59.9	60.5	0.66	0.253
	5-NBZ	62.3 ^a	61.3 ^a	58.8 ^{ab}	57.7 ^b	0.49	0.006
	ABLE244	62.3	61.5	61.8	61.1	0.36	0.352
	ABLE245	62.3	61.6	62.1	61.8	0.44	0.853
Propionate (%)	KNO₃	17.8 ^a	17.0	15.9 ^{ab}	10.1 ^b	0.22	0.001
	NIP	17.8 ^a	17.6 ^a	19.9 ^{ab}	21.1 ^b	0.52	0.030
	5-NBZ	17.8 ^a	18.6 ^{ab}	21.3 ^{ab}	22.8 ^b	0.43	0.002
	ABLE244	17.8	18.0	18.1	18.5	0.25	0.359
	ABLE245	17.8	18.2	18.0	18.1	0.26	0.722
Isobutyrate (%)	KNO₃	1.66 ^a	1.62	1.45 ^{ab}	1.22 ^b	0.05	0.008
	NIP	1.66 ^{ab}	1.76 ^a	1.56 ^{ab}	1.20 ^b	0.06	0.024
	5-NBZ	1.66	1.76	1.56	1.70	0.05	0.829
	ABLE244	1.66	1.70	1.70	1.80	0.06	0.478
	ABLE245	1.66	1.63	1.70	1.73	0.06	0.648

Butyrate (%)	KNO₃	13.1 ^a	13.2	12.2 ^{ab}	11.5 ^b	0.22	0.05
	NIP	13.1	13.3	13.9	13.8	0.30	0.326
	5-NBZ	13.1	13.2	13.6	13.2	0.32	0.839
	ABLE244	13.1	13.5	13.4	13.5	0.22	0.573
	ABLE245	13.1	13.4	13.4	13.3	0.22	0.802
Isovalerate (%)	KNO₃	3.20	3.23	3.20	3.22	0.10	0.323
	NIP	3.20 ^a	3.36 ^{ab}	3.20 ^a	2.46 ^b	0.09	0.027
	5-NBZ	3.20	3.20	2.96	3.00	0.08	0.322
	ABLE244	3.20	3.40	3.20	3.30	0.10	0.921
	ABLE245	3.20	3.30	3.10	3.20	0.10	0.843
Valerate (%)	KNO₃	1.93 ^a	1.77 ^{ab}	1.62 ^{ab}	1.57 ^b	0.02	0.001
	NIP	1.93 ^a	1.86 ^{ab}	1.36 ^{ab}	0.70 ^b	0.07	0.000
	5-NBZ	1.93 ^a	1.76 ^{ab}	1.66 ^b	1.56 ^b	0.02	0.001
	ABLE244	1.93 ^a	1.80 ^{ab}	1.73 ^b	1.70 ^b	0.02	0.015
	ABLE245	1.93 ^a	1.73 ^a	1.56 ^b	1.66 ^{ab}	0.03	0.018
Acetate:propionate	KNO₃	3.50 ^a	3.90 ^{ab}	3.96 ^{ab}	7.83 ^b	0.10	0.002
	NIP	3.50	3.52	2.99	2.90	0.12	0.065
	5-NBZ	3.50 ^a	3.30 ^{ab}	3.03 ^{ab}	2.80 ^b	0.10	0.039
	ABLE244	3.50	3.41	3.42	3.30	0.06	0.356
	ABLE245	3.50	3.38	3.45	3.41	0.07	0.783

KNO₃: Nitrate de sodium; NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 et ABLE 24: Produits de synthèse.

S.E.M. : erreur standard des moyennes a, b, ab: moyennes dans la même colonne affectées avec des lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,01).

Aucune influence des ABLE 244 et ABLE 245 sur la production des acides gras volatils n'a été remarqué (**Tab. VIII**). Ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment et relatifs à la fois à la production de gaz total et la production du méthane. Cependant, l'absence d'effet sur la concentration totale en AGV suggère que la fermentation n'a pas été compromise par ces deux composés (**Martínez-Fernández et al., 2014**). **Fig. 29** montre que les AGV totaux réduits sont doses dépendants

L'acétate a été augmenté avec 12 µml de nitrate par ml, mais n'a pas été affecté par ce produit à 2 ou à 8 µml/ml. À toutes les quatre concentrations de nitrate examinées, le nitrate a réduit les concentrations de propionate, 12 µml/ml réduisant le plus (de près de 43.25%). En tant que tel, le nitrate a remarquablement augmenté le rapport acétate: propionate d'une manière presque linéaire lorsque la concentration en nitrate est passée de 2 à 12 µml/ml (**Fig. 30**). Le butyrate n'a été réduit de manière significative que lorsque l'on a ajouté du nitrate à 12 µml/ml (12.21%) et 8 µml/ml (de 6.87%). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par **Zhenming et al. (2012)** qui ont trouvé que les concentrations élevées de nitrate ont augmenté la production de l'acétate tout en réduisant le propionate de près de 77%.

D'autre part, l'acétate a été réduit par 2, 8 et 12 µM/ml de 5-NBZ, mais n'a pas été affecté par l'addition d'autres nitrocomposés (NIP, ABLE 244 et ABLE 245). La diminution des concentrations d'acétate par traitement au 5-NBZ pourrait indiquer une diminution de la dégradation des fibres, car certains micro-organismes fibrolytiques sont plus sensibles à une pression partielle élevée en hydrogène (**Morgavi et al., 2010**). Certains auteurs ont rapporté une baisse de CH₄ sans aucune influence sur les AGV (**Hess et al., 2003**).

A Toutes les concentrations de 5-NBZ examinées, 5-NBZ a augmenté les concentrations de propionate dont 12 µM/ml augmente le propionate le plus (près de 29%), ainsi, 12 µM/ml de NIP augmente le propionate (18.53%) (**Fig. 28**). Ceci est en accord avec la découverte d'une étude précédente où les nitrocomposés organiques (diméthyl-2-nitroglutarate, 2-nitrométhylpropionate et nitroéthane) réduisent la production de méthane tout en augmentant les concentrations de propionate dans les cultures ruminales *in vitro* (**Anderson et al., 2010**).

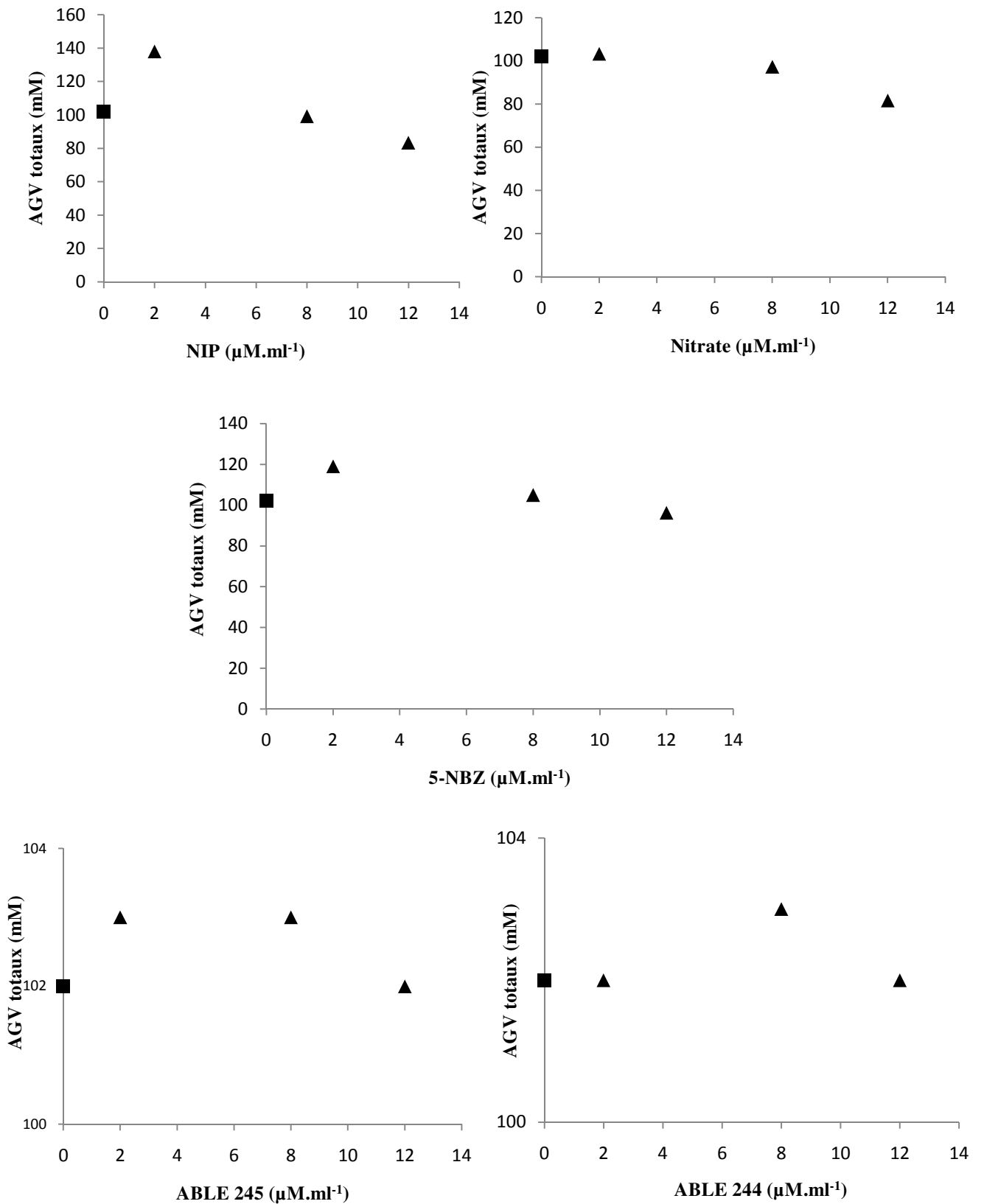


Figure 29. Relation entre les concentrations des produits et la réduction des AGV totaux.

■ *Témoin*, KNO_3 : Nitrate de sodium; NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 et ABLE 24: Produits de synthèse

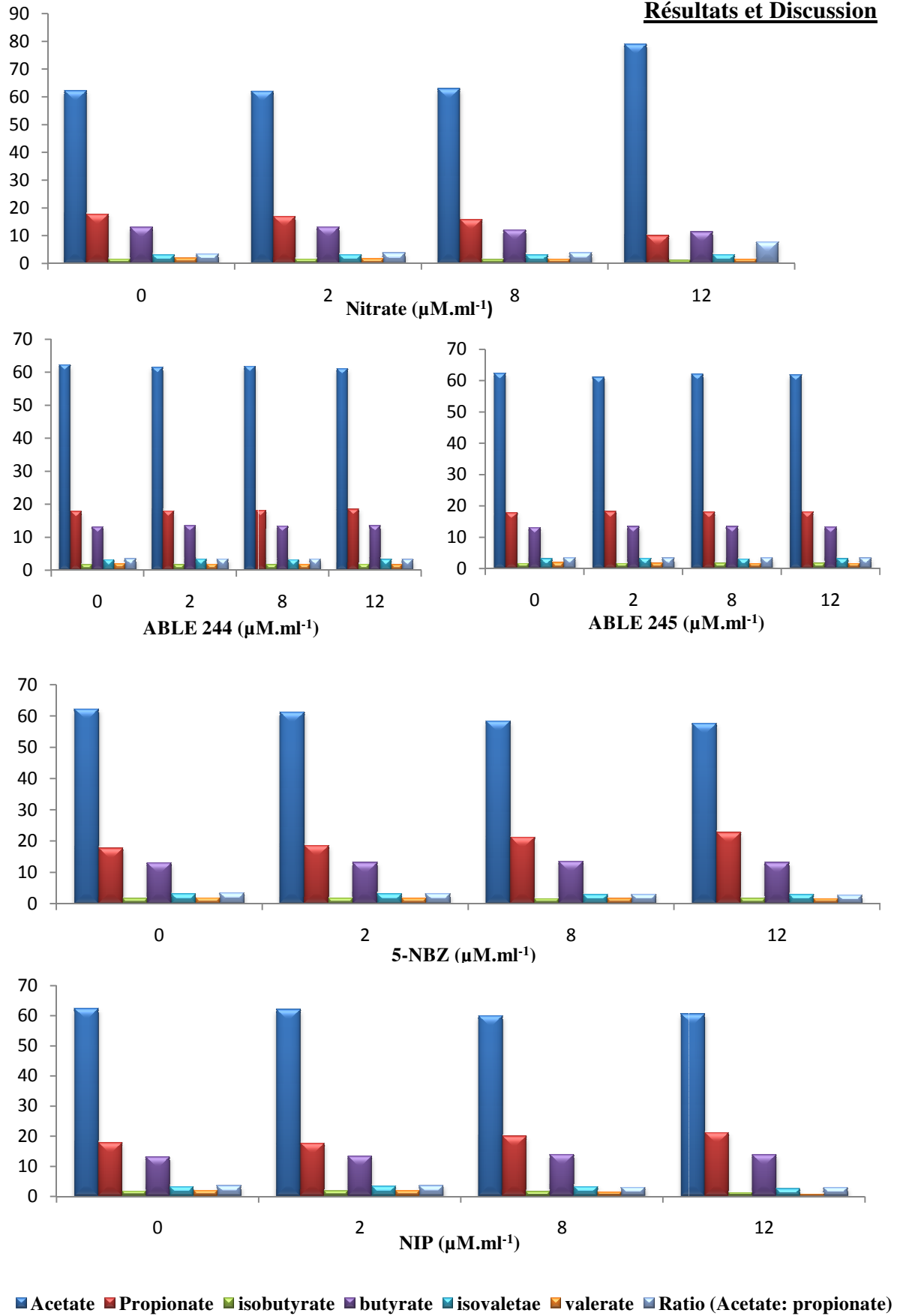


Figure 30. Effets de différents produits nitreux sur le profil des acides gras volatils *in vitro*

NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABL 244 et ABL 24: Produits de synthèse

L'analyse du butyrate à la fin de l'incubation dans cette étude n'a révélé aucun effet significatif ($P > 0,05$) ni avec NIP ni avec 5-NBZ ni avec l'ajout des deux produits de synthèse. Ceci est en accord avec une étude précédente où le butyrate n'était pas affecté par le niveau de nitrocompound organique (par exemple Nitroéthane) (Brown *et al.*, 2011), suggérant que les électrons épargnés par la production de CH_4 ne sont pas redirigés vers la production de butyrate (Gutierrez-Banuelos *et al.*, 2008, Bozic *et al.*, 2009).

Les concentrations d'isobutyrate ont été réduites par 8 et 12 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de Nitrate et de nitrophénol, sans être affectées par d'autres nitrocomposés (Fig. 30). Le valérate a été significativement affecté par l'ensemble des traitements à différentes concentrations (KNO_3 , NIP, 5-NBZ, ABLE244 et ABLE 245) dont 12 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de NIP réduisant le plus ($P < 0,001$). Au contraire, l'isovalérate n'a été affecté par aucun des traitements. En effet, De nombreuses bactéries réductrices de nitrates peuvent consommer à la fois du H_2 et des AGV en tant que substrats (Zumft, 1992).

ABLE 244 et ABLE 245 réduits seulement valérate, ces résultats indiquent que la fermentation ne s'est finalement pas «adaptée» aux produits de synthèse (ABLE 244 et ABLE 245) dans les cultures ruminales au cours de l'incubation de 24h.

Une réduction du rapport acétate: propionate a été décrite comme une caractéristique commune de plusieurs antiméthanogènes. Cela indique une diminution concomitante de la formation de méthane et la redirection de l'hydrogène du méthane vers des voies métaboliques plus propionique (Martínez-Fernández *et al.*, 2014). Cette explication corrobore la découverte d'une étude *in vitro* antérieure; les augmentations de pH entraînent généralement un déplacement de la fermentation vers des AGV réduits (par exemple propionate et butyrate) dans le rumen, conduisant à une réduction du rapport acétate: propionate.

Cet écart pourrait être attribuable à d'autres facteurs, tels que la consommation sélective d'AGV individuels par des bactéries respirant les nitrates. Des études ultérieures utilisant des mélanges définis d'AGV comme seuls substrats peuvent aider à vérifier cette supposition.

II. Effets des additifs nitreux sur la population de protozoaires ruminants

Les protozoaires présents dans le rumen font partie principalement de l'embranchement des ciliés et sont représentés majoritairement par deux groupes : les holotriches et les *Entodiniomorphes* (Annexe 2) (Jouany et Ushida, 1998). Ils représentent 40 % de la biomasse microbienne et leur concentration est évaluée à 10^6 cellules vivantes / ml de contenu ruminal.

Les protozoaires sont les plus grands producteurs d'hydrogène dans l'écosystème du rumen (Szumacher-Stabel et Cieslak, 2010). Les mécanismes microbiens sous la production de CH₄ impliquent le transfert inter-espèce H₂ entre les producteurs de H₂ et les méthanogènes (Wolin *et al.*, 1997). L'exemple le plus étudié de ce transfert de H₂ est la relation symbiotique entre les méthanogènes et les protozoaires (Newbold *et al.*, 1995): les méthanogènes sont positionnés sur les protozoaires pour réduire la distance de diffusion de H₂ de l'hydrogénosome. Ces méthanogènes associés aux protozoaires seraient responsables de 9 à 25% de la méthanogenèse dans le liquide ruminal (Newbold *et al.*, 1995).

L'effet des produits testés sur la population de protozoaires est montré dans le **tableau IX**.

Tableau IX. Effets des additifs nitreux sur la population de protozoaires ruminants (log₁₀) après 24h de fermentation *in vitro*

Additifs	Concentrations ($\mu\text{M}.\text{ml}^{-1}$)				SEM	p
	0	2	8	12		
KNO ₃	8.44 ^a	8.42	8.41	8.37 ^b	0.06	0.166
NIP	8.44 ^a	8.41 ^a	8.30 ^{ab}	8.18 ^b	0.06	0.179
5-NBZ	8.44 ^a	8.41 ^a	8.47 ^a	8.10 ^b	0.03	0.017
ABLE244	8.44	8.40	8.56	8.39	0.06	0.614
ABLE245	8.44	8.23	8.29	8.41	0.04	0.983

KNO₃: Nitrate de sodium; NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 et ABLE 24: Produits de synthèse.

S.E.M. : erreur standard des moyennes a, b, ab: moyennes dans la même colonne affectées avec des lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,01).

Comme observé avec les autres paramètres de fermentation, l'addition de ABLE 244 et ABLE 245 n'a eu aucun effet significatif sur la population de protozoaires. Alors que les autres additifs (KNO_3 , NIP et 5-NBZ) donne une diminution (doses dépendante) significative ($P < 0,05$) de la population de protozoaires, dont $12 \mu\text{M/ml}$ de 5-NBZ réduisent le plus la population de protozoaire (52%), suite par $12 \mu\text{M/ml}$ de NIP (35%). L'inhibition de la méthanogenèse devrait augmenter la pression partielle de H_2 , ce qui pourrait entraîner une inhibition des microorganismes producteurs de H_2 tels que les ruminocoques, les protozoaires et les champignons (Martínez-Fernández *et al.*, 2014).

L'inhibition de la méthanogenèse est souvent liée à la diminution du nombre et/ou l'activité des protozoaires. Environ 25 % d'archées méthanogènes sont associées aux protozoaires (Newbold *et al.*, 1995) et, donc, une partie de l'effet anti méthanogène des produits testés pourrait être attribuée principalement à une activité anti-protozoaire.

Dans cette étude, le nombre de protozoaires a diminué et l'activité anti-méthanogène des produits aromatiques (NIP et/ou 5-NBZ) serait plutôt, le résultat d'un effet anti-protozoaire, en particulier pour 5-NBZ (jusqu'à 52%) ; ou à un changement de la diversité des archées méthanogènes,

En effet, l'hypothèse d'un effet inhibiteur de l'activité métabolique, obtenu avec les produits nitro-aromatiques, ne peut toutefois être écartée. Un changement de la diversité implique sûrement un changement de l'activité des archées méthanogènes qui pourrait être limitée par l'apport de ces produits.

D'autre part, une faible diminution des protozoaires a été observée avec les nitrates et $12 \mu\text{M/ml}$ KNO_3 (16%). Des études antérieures ont montré que l'ajout de nitrate dans la ration de ruminants n'a pas un grand effet sur la population de protozoaires (Guyader *et al.*, 2015).

Le nitrate a une action sur le pool d'hydrogène et il réduit le méthane par une voie compétitive à la méthanogenèse qui permet de réduire la part d'hydrogène disponible pour les méthanogènes (Guyader *et al.*, 2014).

Les produits nitreux ayant des mécanismes d'action différents pour diminuer les émissions de méthane des ruminants.

III. Stœchiométrie de la fermentation

L'étude des stœchiométries des réactions se déroulant dans le rumen est importante pour mieux comprendre la partition du carbone et de l'hydrogène (H₂) moléculaire dans le rumen. En effet, les constituants de la ration peuvent se répartir entre des produits « utiles » pour l'animal (AGV, biomasse bactérienne), et des produits « inutiles », voire polluants pour l'environnement (CH₄) (**Medila, 2016**).

La stœchiométrie des fermentations a été étudiée pour un temps de 24 heures en présence et en absence de différents additifs nitreux. Le **tableau X** représente l'ensemble des résultats obtenus. La production de gaz résultant de la fermentation des différents substrats est essentiellement composée de dioxyde de carbone et en partie du méthane. Le volume du dioxyde de carbone est calculé par différence entre le gaz total enregistré et le volume du méthane produit.

En absence des additifs nitreux, le volume de CO₂ produit est de 11.74 mmol/g MS, par contre, en présence de ces produits, le volume de CO₂ varie entre 12.60 et 6.89 mmol/g MS (**Tab. X**). La valeur la plus élevée est enregistrée pour 12 µM/ml de KNO₃ et la plus faible pour 12µM/ml de ABLE245. Le gaz produit a pour origine principalement le système tampon.

En effet, le CO₂ est produit soit directement de la dégradation des substrats organiques ou indirectement à partir de la salive artificielle pour neutraliser l'acidité induite par la production des AGV. L'addition de nitrate, de NIP et de 5-NBZ favorise la diminution des gaz fermentaires (gaz total, CH₄ et CO₂).

Plusieurs auteurs (**Anderson et Rasmussen, 1998; Anderson et al., 2003, 2006, 2008 ; Gutierrez-Banuelos et al., 2008 ; Bozic et al., 2009; Zhang et Yang, 2011 ; Zhenming et al., 2012**) affirment que les produits nitreux (contiennent un groupement nitrate ou nitrite) favorisent une diminution de la production de gaz.

Les analyses stœchiométriques ont révélé que les cultures supplémentées en nitrate, NIP et 5-NBZ produisaient 7.06 à 60.92 µmol.ml⁻¹ de l'hydrogène produit que les témoins et les quantités produites étaient significativement plus élevées seulement pour les cultures additionnées de nitrate (**Tab. X**). Cette augmentation de H₂ produit est attendue puisque la méthanogenèse est un puits principal de H₂ dans le rumen.

Tableau X. Stœchiométrie de la fermentation *in vitro*.

	Additifs	Concentration (µM)				SEM	P
		0	2	8	12		
GT (mmol/gMS)	KNO₃	14,33 ^a	14,55 ^a	10,22 ^{ab}	7,41 ^b	3.33	0.002
	NIP	14,33 ^a	14,60 ^a	12,28 ^{ab}	10,09 ^b	3.39	0.009
	5-NBZ	14,33	14,29	13,62	12,68	3.21	0.546
	ABLE244	14,33	14,60	14,33	14,33	3.25	0.995
	ABLE245	14,33	14,78	14,42	15,31	2.60	0.827
Méthane (mmol/gMS)	KNO₃	2,59 ^a	2,27 ^a	1,21 ^{ab}	0,52 ^b	1.26	0.001
	NIP	2,59 ^a	2,67 ^a	1,50 ^{ab}	0,63 ^b	1.36	0.004
	5-NBZ	2,59 ^a	2,25 ^a	1,89 ^{ab}	1,53 ^b	1.21	0.050
	ABLE244	2,59	2,28	2,39	2,23	1.22	0.870
	ABLE245	2,59	2,33	2,33	2,71	1.25	0.822
CO₂ (mmol/gMS)	KNO₃	11,74 ^a	12,29 ^a	9,01 ^b	6,89 ^{ab}	0.52	0.001
	NIP	11,74 ^a	11,93 ^a	10,78 ^{ab}	9,46 ^b	0.52	0.020
	5-NBZ	11,74 ^a	12,03 ^a	11,73	11,15 ^b	0.51	0.050
	ABLE244	11,74	12,32	11,94	12,10	0.53	0.999
	ABLE245	11,74	12,45	12,08	12,60	0.51	0.875
H₂ Produit (µmol.ml⁻¹)	KNO₃	205,20 ^a	206,13	236,36 ^b	266,12 ^{ab}	3.33	0.000
	NIP	205,20 ^a	205,36	216,83 ^b	218,03 ^{ab}	0,59	0,468
	5NBZ	205,20 ^a	204,30 ^a	202,90 ^b	212,26 ^{ab}	0,81	0,057
	ABLE244	205,20	205,53	205,43	204,93	0,51	0,850
	ABLE245	205,20	205,40	205,23	204,96	0,50	0,852

H₂ Consommé ($\mu\text{mol.ml}^{-1}$)	KNO₃	63,83 ^a	63,12	45,88 ^{ab}	32,36 ^b	1,25	0,001
	NIP	63,83 ^a	63,76 ^a	69,12 ^{ab}	70,77 ^b	1,46	0,081
	5NBZ	63,83 ^a	65,59 ^a	71,75 ^{ab}	73,72 ^b	1,07	0,006
	ABLE244	63,83	64,96	64,89	65,86	0,78	0,414
	ABLE245	63,83	65,22	64,46	64,69	0,84	0,815
% Récupéré	KNO₃	31,10 ^a	30,62 ^a	19,41 ^a ^b	12,15 ^b	0,32	0,001
	NIP	31,10 ^a	31,04	33,75 ^{ab}	34,68 ^b	0,70	0,067
	5NBZ	31,10 ^a	32,10	35,36 ^{ab}	36,82 ^b	0,53	0,003
	ABLE244	31,10	31,60	31,58	32,13	0,35	0,364
	ABLE245	31,10	31,75	31,40	31,55	0,39	0,780

KNO₃: Nitrate de sodium; NIP: Nitrophenol; 5-NBZ: 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 et ABLE 24: Produits de synthèse. GT : Gaz total.

S.E.M. : erreur standard des moyennes a, b, ab: moyennes dans la même colonne affectées avec des lettres différentes sont significativement différentes (P < 0,01).

Le H₂ lui-même est un intermédiaire métabolique important dans le rumen et sert de substrat aux archaea méthanogènes pour générer de l'énergie. Par conséquent, l'inhibition de la méthanogenèse réduirait théoriquement l'utilisation de H₂ et augmenterait ainsi sa concentration (**Janssen, 2010**). La diminution simultanée de l'acétate (qui produit H₂) et l'augmentation des proportions de propionate (qui consomment H₂) trouvées dans cette étude est apparemment liée aux mécanismes de régulation H₂ dans le rumen. De plus, la formation de propionate est considérée comme le deuxième puits de H₂ le plus important dans le rumen après la méthanogenèse (**McAllister et Newbold, 2008**).

Par ailleurs, l'utilisation de KNO₃ montre une diminution de concentration de H₂ consommé (par 17.95 à 31.47 μmol.ml⁻¹). Ceci revient à la concurrence directe de la réduction des nitrates avec la méthanogenèse pour l'hydrogène disponible. En accord avec la présente conclusion, une étude de **Anderson et al., 2010** et de **Anuraga et al., 2017** qui ont signalé que le Nitroéthane et 3-nitrooxypropanol, deux inhibiteurs spécifiques de la méthanogenèse, diminuent la concentration de H₂ produit et n'affectent pas la population et la distribution générique des protozoaires.

Cette analyse montre aussi une augmentation dans les concentrations de l'H₂ consommé, cette observation est significative avec 8 μM/ml de 5-NBZ (augmentation par 9 μmol.ml⁻¹) et 12μM/ml de 5-NBZ (par 11 μmol.ml⁻¹) et avec 12μM/ml NIP (par 8μmol.ml⁻¹) (**Tab. X**), cette augmentation est généralement connue pour provoquer une rétroaction négative sur le processus de fermentation dans le rumen, en particulier la fermentation qui implique des cofacteurs tels que le NADH, le NADPH et les ferrédoxines réduites (**Leng, 2014**).

La question demeure: pourquoi la production de méthane est diminuée (avec le NIP et le 5-NBZ) en présence des niveaux accumulés d'hydrogène disponibles pour la méthanogenèse? La concurrence directe de la réduction de ces produits nitreux avec la méthanogenèse pour l'hydrogène disponible ne fonctionne pas efficacement à une augmentation de l'émission d'hydrogène. Ceci suggère que la méthanogenèse pourrait être inhibée d'une autre manière, ce qui est également suggéré par la littérature (**Lund et al., 2014, Guyader et al., 2015, Latham et al., 2016**).

Les produits nitro-aromatiques ont a un effet sur les populations de protozoaires (**Ates-Alagoz, 2016**). Bien qu'il existe une relation symbiotique entre les protozoaires et les méthanogènes dans lesquels les protozoaires deviennent les hôtes d'une certaine population de méthanogènes via un transfert inter-espèce H₂ (**Morgavi *et al.*, 2010**), cette symbiose est apparemment affectée en présence de NIP et 5-NBZ qui peuvent donc contribuer à la production de méthane plus faible.

Conclusion Générale

Cette thèse a approfondi les connaissances sur l'importance des différentes voies métaboliques de H₂ dans le rumen, afin de proposer et d'évaluer de nouvelles stratégies visant à réduire les émissions de CH₄ chez les ruminants. Nous avons supposé que manipuler le pool d'hydrogène ruminal permet une réduction importante des émissions de CH₄.

L'originalité de ce travail consiste à tester l'effet des produits de synthèse contenant des groupements NO₂ (ABLE 244 et ABLE 245) sur la fermentation ruminale *in vitro*, tout en comparant leurs effets avec l'effet des produits commerciaux (le Nitrate, le Nitrophénol et le 5-Nitrobenzimidazol).

Notre étude est basée d'un part, sur le test de l'effet de ces cinq produits (à base de nitrate et de nitrite) avec différentes concentrations sur les différents paramètres de la fermentation (la production de gaz total, la production de méthane, la production des AGV et sur la stœchiométrie de la fermentation) *in vitro* ; et d'autre part, l'analyse du microbiote du rumen produisant le H₂ (les protozoaires).

Les différentes analyses ont été effectuées en utilisant le jus de rumen prélevé des ovins âgés de 12 mois, ayant un poids moyen de (37,8 ± 5,73 kg) et munis de fistules permanentes de 50 mm de diamètre. Ils ont eu un accès libre à l'eau et ont été nourris deux fois par jour (09:00 et 16:00 h), un régime constitué de foin de luzerne de 15 à 20 cm et d'avoine dans une proportion de 60:40.

L'évaluation de la production de gaz total *in vitro* montre une différence significative dans la production de gaz entre les additifs nitreux et les différentes concentrations. Les produits de synthèse enregistrent la plus grande quantité de gaz et les résultats obtenus pour le Nitrate et le Nitrophénol sont relativement faibles par rapport aux témoins.

Le classement sur la base des résultats de la production de gaz *in vitro*, après 24 heures d'incubation, est le suivant :

ABLE 245 > ABLE 244 > 5-NBZ > NIP > KNO₃

Cette variation de la production de gaz est associée à la biodégradation des additifs nitreux par le microbiote ruminal et/ ou la solubilité de ces additifs dans la salive artificielle.

En effet, les nitrates et le nitrophénol s'avèrent bien être solubles dans la salive artificielle et bien utilisés par le microbiote ruminal, comparativement aux autres additifs (5-NBZ, ABLE244 et ABLE245).

La production de méthane est négativement affectée par l'addition de nitrate. Après 24 h de fermentation, les nitrates réduisent significativement la production de CH₄. Cet effet est dose dépendant. A 12μM, les nitrates ont engendré une diminution de 80% de la production de CH₄. Alors que, la dose de 8μM baisse 53% de la production de CH₄.

Le nitrate peut servir de puits d'électrons plus compétitif que le CO₂ et la production de H₂ peut être inhibée par le nitrate, réduisant la disponibilité de H₂, l'équivalent réducteur primaire de la méthanogenèse dans le rumen.

Le nitrate peut aussi augmenter les concentrations d'ammoniac dans le rumen et une concentration accrue d'ammoniac pourrait également contribuer à l'inhibition du CH₄.

Le nitrate a une action sur le pool d'hydrogène et il réduit le méthane par une voie compétitive à la méthanogenèse qui permet de réduire la part d'hydrogène disponible pour les méthanogènes.

Le NIP et le 5-NBZ avec des concentrations élevées inhibent de façon significative la production de CH₄. Ces nitrocomposés, qui réduisent la production de CH₄ et de gaz, peuvent être métabolisés par des bactéries du rumen. L'ajout de nitrophénol et le 5-Nitrobenzimidazol pourrait avoir aussi provoqué une diminution de microbiote ruminal et réduit donc, le nombre de bactéries et/ ou de protozoaires, en provoquant une réduction de CH₄.

Dans cette étude, le nombre de protozoaires a diminué et l'activité anti-méthanogène des produits aromatiques (NIP et/ou 5-NBZ) serait plutôt, le résultat d'un effet anti-protozoaire, en particulier pour 5-NBZ (jusqu'à 52%) ; ou à un changement de la diversité des archées méthanogènes.

Aucune réduction significative de méthane n'a été observée avec les deux composés nouvellement synthétisés ; ABLE 244 et ABLE 245. Ceci revient à l'insolubilité de ces produits dans la salive artificielle et/ou leur non-biodégradabilité par le microbiote ruminal (produits à des chaînes carboniques longues).

La production en AGV totaux avec les différents additifs nitreux est significativement différente. Aucun effet des ABLE 244 et ABLE 245 sur la production des acides gras volatils n'a été remarqué. Ces résultats confirment les résultats obtenus précédemment et relatifs à la fois à la production de gaz total et la production du méthane. Cependant, l'absence d'effet sur la concentration totale en AGV suggère que la fermentation n'a pas été compromise par ces deux composés.

Les concentrations élevées de nitrate ont augmenté la production de l'acétate tout en réduisant le propionate. Une réduction du rapport acétate: propionate a été décrite comme une caractéristique commune de plusieurs antiméthanogènes. Cela indique une diminution concomitante de la formation de méthane et la redirection de l'hydrogène du méthane vers des voies métaboliques plus propionique.

Dans l'ensemble, l'administration de ces trois produits a entraîné une augmentation du pH et une diminution des concentrations totales d'AGV. Les augmentations de pH entraînent généralement un déplacement de la fermentation vers des AGV réduits (par exemple propionate et butyrate) dans le rumen, conduisant à une réduction du rapport acétate: propionate.

Cet écart pourrait être attribuable à d'autres facteurs, tels que la consommation sélective d'AGV individuels par des bactéries respirant les nitrates.

L'analyse qualitative du pool gazeux indique que le volume de CO₂ varie entre 12.60 et 6.89 mmol/g MS. La valeur la plus élevée est enregistrée pour 12 µM/ml de KNO₃ et la plus faible pour 12µM/ml de ABLE245. Le gaz produit a pour origine principalement le système tampon.

En effet, le CO₂ est produit soit directement de la dégradation des substrats organiques ou indirectement à partir de la salive artificielle pour neutraliser l'acidité induite par la production des AGV. L'addition de nitrate, de NIP et de 5-NBZ favorise la diminution des gaz fermentaires (gaz total, CH₄ et CO₂).

Le bilan d'hydrogène calculé montre que les quantités d'H₂ produites étaient significativement plus élevées seulement pour les cultures additionnées de nitrate. Cette augmentation de H₂ produit est attendue puisque la méthanogenèse est un puits principal de H₂ dans le rumen. Par ailleurs, l'utilisation de KNO₃ montre une diminution de concentration de H₂ consommé. Ceci revient à la concurrence directe de la réduction des nitrates avec la méthanogenèse pour l'hydrogène disponible.

Ce bilan montre aussi une augmentation dans les concentrations de l'H₂ consommé avec 5-NBZ et avec le NIP, cette augmentation est généralement connue pour provoquer une rétroaction négative sur le processus de fermentation dans le rumen, en particulier la fermentation qui implique des cofacteurs tels que le NADH, le NADPH et les ferrédoxines réduites.

La question demeure: pourquoi la production de méthane est diminuée (avec le NIP et le 5-NBZ) en présence des niveaux accumulés d'hydrogène disponibles pour la méthanogenèse? La concurrence directe de la réduction de ces produits nitreux avec la méthanogenèse pour l'hydrogène disponible ne fonctionne pas efficacement à une augmentation de l'émission d'hydrogène. Ceci suggère que la méthanogenèse est inhibée d'une autre manière qu'est l'effet anti-protozoaire et/ ou un changement de la diversité des archées méthanogènes.

Cependant, les résultats présentés dans ce manuscrit nécessitent une analyse plus détaillée qui dépasse le cadre d'une thèse. Néanmoins, certains points soulevés peuvent faire l'objet d'un travail expérimental intéressant.

- Des études *in vivo* devraient être envisagées en vue de mieux connaître la réaction de l'animal et de ses performances vis-à-vis ces produits.
- Des analyses moléculaires sur la flore méthanogène peuvent avoir lieu.
- Conduire une nouvelle étude avec un mélange de différents additifs nitreux.
- Des études ultérieures utilisant des mélanges définis d'AGV comme seuls substrats peuvent aider à vérifier la consommation sélective d'AGV individuels par des bactéries respirant les nitrates.

Références Bibliographiques

- Abdoui, H. et Schaefer D. M., 1986. Effects of two dietary niacin concentrations on ruminal fluid free niacin concentration, and of supplemental niacin and source of inoculum on *in vitro* microbial growth, fermentative activity and nicotinamide adenine dinucleotide pool size. *J. Anim. Sci.* 62, 254-262.
- Adem R. et Ferrah A., 2002. Les ressources fourragères en Algérie : Déficit structurelle et disparité régional. Analyse du bilan fourrager pour l'année 2001.
- Alaboudi AR. et Jones GA., 1985. Effect of acclimation to high nitrate intakes on some rumen fermentation parameters in sheep. *Canadian Journal of Animal Science.* 65, 841-849.
- Allison MJ. et Reddy CA., 1984. Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate. *In: 'Proceedings of the third international symposium on microbial ecology'*. (Eds MJ Klug, CA Reddy) pp. 248–256. (American Society for Microbiology: Washington, DC).
- Anderson R. C., Laura H. Ripley , Jan G. P. Bowman , Todd R. Callaway , Kenneth J. Genovese , Ross C. Beier , Roger B. Harvey and David J. Nisbet., 2016. Ruminal fermentation of Anti-Methanogenic Nitrate- and Nitro-Containing Forages. *Front. Vet. Sci.* 3, 62.
- Anderson, R.C., Callaway, T.R., Van Kessel, J.S., Jung, Y.S., Edrington, T.S., Nisbet, D.J., 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *J. Bioresour. Technol.* 90, 59-63.
- Anderson, R.C., Carstens, E., Miller, R.K., Callaway, T.R., Schultz, C.L., Edrington, T.S., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2006. Effect of oral nitroethane and 2-nitropropanol administration on methane-producing activity and volatile fatty acid production in the ovine rumen. *J. Bioresour. Technol.* 97, 2421-2426.
- Anderson, R.C., Janice, K.H., David, J.S., Thaddeus, B.S., Nathan, A.K., Todd, R.C., Thomas, S.E., Roger, B.H., David, J.N., 2010. Effect of nitroethane, dimethyl-2-nitroglutarate and 2 nitro methyl-propionate on ruminal methane production and hydrogen balance *in vitro*. *J. Bioresour. Technol.* 101, 5345-5349.
- Anderson, R.C., Nathan, A.K., Thaddeus, B.S., Todd, R.C., Edrington, Thomas S., Harvey, Roger B., Yong, S.J., Nisbet, David J., 2008. Effects of select nitrocompounds on *in vitro* ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *J. Bioresour. Technol.* 99, 8655–8661.
- Anderson, R.C., Rasmussen, M.A., 1998. Use of a novel nitrotoxin-metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresour. Technol.* 64, 89–95.

- Andrade SL, Einsle O., 2013. The tricky task of nitrate/nitrite antiport. *Angewandte Chemie International Edition*. 52, 10422-10424.
- Angela R. Moss-Jean-P. Jouany – John M., 2000. Methane production by ruminants : its contribution to global warming. *New hold*. 49.
- Anuraga J., Ki Ageng S., Makoto K., Hiroki M., Muhammad R., Erika B. Laconi & Nahrowi, 2017. Use of 3-nitrooxypropanol as feed additive for mitigating enteric methane emissions from ruminants: a meta-analysis. *Italian Journal of Animal Science*,
- Aravena M, Figueroa R, Olea-Azar C, Arán V., 2010. ESR, electrochemical and ORAC studies of nitro compounds with potential antiprotozoal activity. *J. Chil. Chem. Soc.* 55, 244-249.
- Arco-Pérez, A., Ramos-Morales, E., Yáñez-Ruiz, D.R., Abecia, L., Martín-García, A.I., 2017. Nutritive evaluation and milk quality of including of tomato or olive by-products silages with sunflower oil in the diet of dairy goats. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 232, 57-70.
- Ariza, P., A. Bach, M. D. Stern and M. B. Hall., 2001. Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 79, 2713-2718.
- Ates-Alagoz, Z., 2016. Antimicrobial activities of 1-H-benzimidazole-based molecules. *J. Curr. Top. Med. Chem.* 16, 2953-2962.
- Atta, M. et Meyer, 2000. Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochim Biophys Acta.* 9, 368-371.
- Baldwin, R.L., Emery, R.S., 1960. The oxidation-reduction potential of rumen contents. *Journal of Dairy Science.* 43, 506-511.
- Bauchart D., Doreau M. & Legay-Carmier F., 1985. Utilisation digestive des lipides et conséquences de leur introduction sur la digestion du ruminant. *Bull. Tech. CRVZ Theix, INRA.* 61, 65-77
- Bauchop T., 1981. The anaerobic fungi in rumen fibre digestion. *Agric Environ.* 6, 339-48.
- Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Martinez, T. F. et McAllister, T. A., 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85, 1990-1996.
- Beever, D.E., 1993. Rumen function: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Forbes, J.M. et France, J. (eds). *CAB Int., Univ. Press, Cambridge, UK.* 187-215.

- Beinert, H., R. H. Holm, and E. Münck., 1997. Iron-Sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653-659.
- Bergman E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70, 567-590.
- Bernard J.K., Martin S.A., Wedegaertner T.C., 2001. *In vitro* mixed ruminal microorganism fermentation of whole cottonseed coated with gelatinized corn starch and urea. *PubMed*. 84 (1), 154-8.
- Blake, D.R. and Rowland, F.R., 1988. Continuing world-wide increase in tropospheric methane. *Science* 239, 1129-1131.
- Blaxter, K.L., 1989. *Energy Metabolism in Animals and Man*. Cambridge, UK Cambridge Univ. Press.
- Blaxter, K.L., J.L. Clapperton., 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19, 511-522.
- Blümmel M. and Orskov E.R., 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40, 109-119.
- Boadi, D.A., Wittenberg, K.M., Kennedy, A.D., 2002. Validation of the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique for measurement of methane and carbon dioxide production by cattle. *Canadian Journal of Animal Science*. 82, 125-131.
- Bodelier Paul, L.E., Laanbroek, Hendrikus J., 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *J. FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 265–277.
- Bolle, H. J., Seiler, W., and Bolin, B., 1986. Other Greenhouse Gases and Aerosols: Assessing their Role for Atmospheric Radiative Transfer', *in* B. Bolin, B. R. Döös, J. Jäger and R. A. Warrick (eds.), *The Greenhouse Effect, Climatic Change, and Ecosystems*, SCOPE 29, Chichester, UK, John Wiley and Sons, 157–203.
- Bordet P., 2008. *Rappels de cristallographie*. EDP Sciences, Les Ulis. 9, 1-17
- Bouazza, L., 2014. Etude de la valeur nutritive de légumineuses arbustives du genre *Acacia* Effets spécifiques de leurs hautes teneurs en tannins condensés sur la méthanogénèse ruminale d'ovins. Thèse de doctorat en Sciences. Univ. de Constantine. P. 154.
- Boufennara S., 2012. Effet des tanins sur la fermentescibilité *in vitro* et la digestibilité *in sacco* de végétaux et de sous produits de l'agronomie des zones arides. Essai de modélisation des fermentations du microbiote ruminal. Thèse de doctorat Biotechnologies microbiennes. Univ. de Constantine. P. 179.

- Bozic, A.K., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Ricke, S.C., Callaway, T.R., Yokoyama, M.T., Wang, J.K., Nisbet, D.J., 2009. Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Bioresour. Technol.* 100, 4017-4025.
- BRENDA, 2015. The comprehensive enzyme information system.' Available at <http://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.7.1.1> [Verified 14 June 2015].
- Brown, E.G., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Gutierrez-Bañuelos, H., McReynolds, J.L., Slay, L.J., Callaway, T.R., Nisbet, D.J., 2011. Effects of oral nitroethane administration on enteric methane emissions and ruminal fermentation in cattle. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 166, 275–281.
- Bru, D., A. Sarr, and L. Philippot, 2007. Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5971-5974.
- Brugère, H., 1983. Biochimie du rumen – Aspects physiologiques. *Bull. GTV.* 3, 5-22.
- Buschimi A, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F, de Albuquerque CN, Zucchi TMAD, Poli P., 2009. Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *J. Parasitol.*
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P.W., Kamel C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture”, *J. Dairy Sci.* 88, 2508-2516.
- Chagunda M.G.G., 2013. Opportunities and challenges in the use of the Laser Methane Detector to monitor enteric methane emissions from ruminants, *Anim.*, 7, 394–400.
- Chagunda M.G.G., Ross D., Roberts D.J., 2009. On the use of a laser methane detector in dairy cows. *Comput. and Elect. Agri.*, 68, 157–160.
- Chaucheyras-Durand F., Masegla S., Fonty G, Forano E., 2010. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs. *Applied and Environmental Microbiology.* 76, 7931–7937
- Chaves, A. V., L. C. Thompson, A. D. Iwaasa, S. L. Scott, M. E. Olson, C. Benchaar, D. M. Veira and T. A. McAllister, 2006. Effect of pasture type (alfalfa vs. grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Can. J Anim. Sci.* 86, 409-418.
- Cheeke, P. R., 2001. Actual and potential of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. *Recent Adv. Nutr. Austral.* 13,115-126.

- Chen, J., Yu, Z., Michel Jr., F.C., Wittum, T., Morrison, M., 2007. Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4407–4416.
- Church D.C., 1976. Digestive physiology and nutrition of ruminants. O&B Books; 2nd edition. pp. 452.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A. et Oleszek, W., 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal.* 7, 253-265
- Colonna P., Buleon A., Leloup V., Thibault J.-F., Renard C., Lahaye M., Viroben G., 1995. Constituants des céréales, des graines, des fruits et de leurs sous-produits. *In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (eds.), Nutrition des ruminants domestiques.* INRA Editions. Paris. France. pp: 83-121.
- Conrad R, Wetter B., 1990. Influence of temperature on energetics of hydrogen metabolism in homoacetogenic, methanogenic, and other anaerobic bacteria. *Archives of Microbiology.* 155, 94–98.
- Crouse BR., Yano T., Finnegan MG., Yagi T., Johnson MK., 1994. Properties of the iron-sulfur center in the 25-kilodalton subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol Chem.* 33, 21030-6.
- Crutzen, P.J., 1995. The role of methane in atmospheric chemistry and climate. *In: Engelhardt, W.V., Leonhard- Marek, S., Breves, S., Giesecke, D. (Eds.), Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology.* Ferdinand EnkeVerlag, Stuttgart, pp. 291–315.
- Crutzen, P.J., Aselmann, I., Seiler, W., 1986. Methane production by domestic animals, wild ruminants, other herbivorous fauna, and humans. *Tellus.* 38, 271-284.
- Czerkawski J.W., Blaxter K.L., Wainman F.W., 1966. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production”, *Br. J. Nutr.* 20, 349-362.
- Czerkawski, J.W., 1986. *An Introduction to Rumen Studies.* Pergamon Press, Oxford.
- Czerkawski, J.W., Harfoot, C.G. and Breckenridge, G., 1972. The relationship between methane production and concentrations of hydrogen in the aqueous and gaseous phases during rumen fermentation *in vitro*. *Journal of Applied Bacteriology.* 35, 537-551.

- Danielsson R, Schnurer A, Arthurson V, Bertilsson J., 2012. Methanogenic population and CH₄ production in Swedish dairy cows fed different levels of forage. *Appl Environ Microbiol.* 78, 6172-9.
- Dawson KA, Allison MJ., 1988. Digestive disorders and nutritional toxicity. In 'The rumen microbial ecosystem.' (Ed. PN Hobson) pp. 445–459. (Elsevier Applied Science: London).
- Demeyer, D.I., 1991. Quantitative aspects of microbial metabolism in the rumen and hindgut. In: Jouany, J.P. (Ed.), *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. INRA Editions, Paris, pp. 217–237.
- Devendra C., 1978. The digestive efficiency of goats. *World Review of Animal Production.* 14, 9-22.
- Donze, G., C. McMahon, and P. M. Guerin, 2004. Rumen metabolites serve ticks to exploit large animals. *J. Exp. Biol.* 207, 4283–4289.
- Doreau M., Martin C., Eugène M., Popova M., Morgavi D.P., 2011. Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *In : Gaz à effet de serre en élevage bovin : le méthane*. Doreau M., Baumont R., Perez J.M. (Eds). Dossier, INRA Productions Animales, 24, 461-474.
- Doreau M., Van der Werf H.M.G., Micol D., Dubroeuq H., Agabriel J., Rochette Y., Martin C., 2011. Enteric methane production and greenhouse gases balance of diets differing in concentrate in the fattening phase of a beef production system. *Journal of Animal Science*, 89, 2518-2528.
- Eastabrook, R. W., Suzuki, K., Mason, J. I., Baron, J., Taylor, W. E., Simpson, E. R., Purvis, J., and McCarthy, J., 1973. *In Iron-Sulfur Proteins* (Lovenberg, W., ed) Vol. 1, pp. 193–221, Academic Press, New York.
- El-Gohary, N.S., Shaaban, M.I., 2017. Synthesis, antimicrobial, anti-quorum sensing and antitumor activities of new benzimidazole analogs. *Eur. J. Med. Chem.* 137, 439–449.
- Ellis, J. L., J. Dijkstra, E. Kebreab, A. Bannink, N. E. Odongo, B. W. McBride, J. France, 2008. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *J. Agric. Sci.* 146, 213-233.
- Emma Ransam Jones, David L Jones, Alan J.MC. Carthy, James E.MC Donald, 2012. The *Fibrobacter* : an important phylum of cellulose Degrading Bacteria. *Microbial Ecology.* 63, 267-281.

- Eugene, M., D. Masse, J. Chiquette, C. Benchaar, 2008. Short communication: Metaanalysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 88, 331-334.
- Euzéby JP., 2006. Dictionnaire de Bactériologie Vétérinaire.
- FAOSTAT., 2009. FAO Statistical Database, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. Accessed 22.06.2011 at <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx>.
- FAOSTAT., 2013. Emissions, Agriculture, enteric fermentation. faostat3.fao.org/home/, accessed March 18.
- Ferreira GC., Franco R., Lloyd SG., Pereira AS., Moura I., Moura JJ., Huynh BH., 1994. Mammalian ferrochelatase, a new addition to the metalloenzyme family. *J Biol Chem.* 269, 7062-5.
- Fjell D, Blasi D, Towne G., 1991. Nitrate and prussic acid toxicity in forage. Causes, prevention and feeding management. Cooperative Extension Service, Kansas State Univ., Manhattan.
- Fonty, G., J. P. Jouany, E. Forano, and P. Gouet., 1995. L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: R. Jarrige, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce and M. Journet (eds.) *Nutrition des ruminants domestiques* INRA, Paris, France. p 299-347.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S. et Becker, K., 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88:587-605
- Galzer AN., Nikaidation H., 2007. *Microbial biotechnology*. 2nd Edition Cambridge Univ. Press.
- Giger-Reverdin, S., Duvaux-Ponter, C., Sauvant, D., Martin, O., Nunes Do Prado, I., Muller, R., 2002. Intrinsic buffering capacity of feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology.*, 96, 83-102.
- Goel G., Makkar H.P.S., 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical Animal Health Production*, 44, 729-739.
- Goel, G., Makkar, H.P., Becker, K., 2009. Inhibition of methanogens by bromochloromethane: effects on microbial communities and rumen fermentation using batch and continuous fermentations. *Br. J. Nutr.* 101, 1484-1492.
- Goel, N., Sirohi, S. K. et Dwivedi, J., 2012. Estimation of total saponins and evaluate their effect on *in vitro* methanogenesis and rumen fermentation pattern in wheat straw based diet. *J. Adv. Vet. Res.* 2,120-126.

- Gottschalk, G., 1986. Bacterial Metabolism (2nd edition). Springer Verlag, New York Inc.
- Gouet P. et Thivend P., 1986. Le rumen un fermenteur modèle. Biofuture. 23, 47-52.
- Grainger C., Beauchemin K.A., 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production ? Animal Feed Science and Technology, 166-167, 308-320.
- Gruninger RJ, Puniya AK, Callaghan TM, Edwards JE, Youssef N, Dagar SS., 2014. Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. FEMS Microbiol Ecol. 90, 1-17.
- Guangming, J., Keshab, R.S., Zhiguo, Y., 2013. Effects of nitrate dosing on methanogenic activity in a sulfide-producing sewer biofilm reactor. J. Water Res. 47, 1783–1792.
- Guillaume H., 2007. Flore du rumen, Origine, Composition, Evaluation, Conséquences, Physiopathologiques. Thèse de Doctorat vétérinaire faculté de médecine de CRETEIL.
- Gulter H., 1975. Physiologie des animaux domestiques. Vigot. Editeurs. 211-272.
- Gutierrez-Banuelos, H., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Tedeschi, L.O., Pinchak, W.E., Cabrera-Diaz, E., Krueger, N.A., Callaway, T.R., Nisbet, D.J., 2008. Effects of Nitroethane and monensin on ruminal fluid fermentation characteristics and nitrocompound- metabolizing bacterial populations. J. Agric. Food Chem. 56, 4650–4658.
- Guyader J, Silberberg M, Morgavi DP, Martin C., 2014. Postprandial kinetics of dissolved hydrogen in the rumen of cows fed nitrate and/or linseed oil. Proc. Aust. Soc. Anim. Prod. 30, 86.
- Guyader J., 2015. Manipulation of the hydrogen pool available in the rumen to reduce methane emissions from ruminants. Thèse de Doctorat. Univ. Blaise Pascal. P. 275.
- Guyader, J., Eugène, M., Meunier, B., Doreau, M., Morgav, D.P., Silberberg, M., Rochette, Y., Gerard, C., Loncke, C., Martin, C., 2015. Additive effect between dietary linseed oil and nitrate as methane emission-reducer in cattle. J. Anim. Sci. 93, 3564–3577.
- Hariadi, B.T., Santoso, B., 2010. Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. J. Sci. Food Agric. 90, 456–461.
- Hegarty RS, Bird SH, Vanselow BA, Woodgate R., 2008. Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. Br J Nutr. 100, 1220-7.

- Hegarty, R. S., and R. Gerdes, 1999. Hydrogen production and transfer in the rumen. *Recent Advances in Animal Nutrition*. 12, 37-44.
- Heider, J., and G. Fuchs., 1997. Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *European Journal of Biochemistry*. 243, 577-596.
- Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W, Janssen PH., 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci Rep*. 5, 145-167.
- Hess, H. D., Monsalve, L. M., Lascano, C. E., Carulla, J. E., Diaz, T. E., & Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Crop and Pasture Science*, 54, 703-713.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 111, 509-547.
- Hillman, K., D. Lloyd, and A. G. Williams, 1985. Use of a portable quadrupole mass spectrometer for the measurement of dissolved gas concentrations in ovine rumen liquor *in situ*. *Curr. Microbiol*. 12, 335-340.
- Holtshausen, L., Chaves, A. V., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., McAllister, T. A., Odongo, N. E., Cheeke, P. R. et Benchaar, C., 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 92, 2809-2821.
- Hook S. E., André-Denis G. Wright, & Brian W. McBride, 2010. Methanogens : Methane producers of the rumen & mitigation stratégies . *Archaea*. (1472-83).
- Hook, S. E., Wright, A. D. G. et McBride, B. W., 2010. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. 1,11.
- Hook, S.E., Northwood, K.S., Wright, A.D., McBride, B.W., 2009. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Appl. Environ. Microbiol*. 75, 374–380.
- Hoover W.H., 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dai. Sci*. 69, 2755-2766.
- Hristov, A. N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T. W., Harper, M. T., Weeks, H. L., Branco, A. F., Moate, P. J., Deighton, M. H., Williams, R. O., Kindermann, M. et Duval, S., 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 34, 10663-10668.

- Hulshof R.B.A., Berndt A., Gerrits W.J.J., Dijkstra J., Van Zijderveld S.M., Newbold J.R. and Perdok H.B., 2012. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane based diets. *Journal of Animal Science*. 90, 2317- 2323.
- Hungate RE., 1966. The rumen bacteria. *In* : Hungate (ed.) *The rumen and its microbes*. Academic press, 8-90. 533 p.
- Immig, I., Demeyer, D., Fiedler, D., Van Nevel, C., Mbanzamihiho, L., 1996. Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Arch. Tierernahr*. 49, 363–370.
- Inderlied CB, Delwiche EA., 1973. Nitrate reduction and the growth of *Veillonella alcalescens*. *Journal of Bacteriology*. 114, 1206-1212.
- IPCC, Climate Change, 2001. The scientist basis. Contribution of working group I to the third assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge Univ ress, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA. 881 pp.
- Iverson W.G., Millis N.F., 1977. Sucession of *Streptococcus bovis* strains with differing bacteriophage sensitivities in the rumen of two fistulated sheeps. *Appl. environ. Microbiol.*, 33, 810-813.
- Iwamoto M, Asanuma N, Hino T., 2002. Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to reduce nitrate and nitrite with special reference to the suppression of ruminal methanogenesis. *Anaerobe*. 8, 209–215.
- Janssen PH, Kirs M., 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl Environ Microbiol*. 74, 3619-25.
- Janssen, P. H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol*. 160, 1-22.
- Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H. P. S. et Becker, K., 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. *Anim. Feed Sci. Technol*. 150, 230-237.
- Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE., 2008. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci*. 86, 397–412.
- Jensen, B.B. & Jørgensen, H., 1994. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl. environ. Microbiol*. 60, 1897-1904.
- Joblin, K. N., 2005. Methanogenic Archea. *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. H. P. S. Makkar and C. S. McSweeney, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pages

- 47-53 in Denman SE, Martinez FG, Shinkai T, Mitsumori M, McSweeney CS. Metagenomic analysis of the rumen microbial community following inhibition of methane formation by a halogenated methane analog. *Front Microbiol.* 2015; 6:1087.
- Johnson, D.D., R.D. Huffman, S.E. Williams, and D.D. Hargrove, 1991. The effect of breed group and age at feeding on beef carcass composition. *Florida Beef Cattle Research Report.* Pp. 82-87.
- Johnson, K. A., D. E. Johnson., 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci.* 73, 2483-2492.
- Johnson, K., Huyler, M., Westberg, H., Lamb, B., Zimmerman, P., 1994. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. *Environmental Science and Technology.* 28, 359-362.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions in cattle. *Journal of Animal Science* 73, 2483-2492.
- Johnson, M. K., 1994. in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry* (King, R. B., ed) Vol. 4, pp. 1896–1915, Wiley, UK.
- Jones GA., 1972. Dissimilatory metabolism of nitrate by the rumen microbiota. *Canadian Journal of Microbiology.* 18, 1783–1787.
- Jordan, E., D. K. Lovett, M. Hawkins, J. J. Callan, F. P. O'Mara, 2006. The effect of varying levels of coconut oil on intake, digestibility and methane output from continental cross beef heifers. *Anim. Sci.* 82, 859-865.
- Jouany J P. Broudiscoul. Prins R.A & Komisarczuk-Bony .S., 1994. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen; *Nutrition des ruminants domestiques.* INRA Editions, Versailles, France. 350-381.
- Jouany J.P., 1994. Les fermentations dans le rumen et leur optimisation. *INRA Prod. Anim.*, 7, 207-225.
- Jouany J.-P., Broudiscou L., Prins R.A., Komisarczuk- Bony S., 1995. Métabolisme et nutrition de la population microbienne du rumen. In : Jarrige R., Ruckebusch Y., Demarquilly C., Farce M.-H., Journet M. (Eds.), *Nutrition des ruminants domestiques. Ingestion et digestion.* Institut National de la Recherche Agronomique : Paris. 349-381.
- Jouany J.P., Ushida K., 1998. The role of the protozoa in feed digestion. *Asian-Australian. J. of Anim. Sci.* 12, 113-128.
- Jouany JP, Morgavi DP., 2007. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal.* 1(10), 1443-66.

- Ju K.S., Parales R.E., 2010. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 250–272.
- Kajikawa H., Valdez C., Hillman K., Wallace R.J., Newbold C.J., 2003. “Methane oxidation and its coupled electron-sink reactions in ruminal fluid, 36, 354-357.
- Katarzyna Błaszczak-Świątkiewicz, Marek Mirowski, Katarzyna Kaplińska, Rafał Kruszyński, Agata Trzęsowska-Kruszyńska and Elżbieta Mikiciuk-Olasik, 2012. New benzimidazole derivatives with potential cytotoxic activity — study of their stability by RP HPLC. *J. Acta biochimica polonica.* 59, 279–288.
- Khiaosa-Ard, R., Bryner, S.F., Scheeder, M.R., Wettstein, H.R., Leiber, F., Kreuzer, M., Soliva, C.R., 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal alpha-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J. Dairy Sci.* 92, 177–188.
- Kittelmann S, Pinares-Patino CS, Seedorf H, Kirk MR, Ganesh S, McEwan JC., 2014. Two different bacterial community types are linked with the low-methane emission trait in sheep. *Plos One.* 9, 103-171.
- Kittelmann S, Seedorf H, Walters WA, Clemente JC, Knight R, Gordon JL, 2013. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *Plos One.* 8, 103-171.
- Klieve A., Baicho T., Hudman J.F., 1991. Rumen bacteriophages. *In : The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, Penambul Books, Armidale, 277-279.
- Klieve A.V., Swain R.A., 1993. Estimation of bacteriophages numbers by pulse field electrophoresis and laser densitometry. *Appl. Environ. microbiol.*, 59, 2299-2303.
- Koetschan C, Kittelmann S, Lu J, Al-Halbouni D, Jarvis GN, Müller T., 2014. Internal transcribed spacer 1 secondary structure analysis reveals a common core throughout the anaerobic fungi (*Neocallimastigomycota*). *PLoS One.* 9, 91928.
- Kou-San, J., Rebecca, E.P., 2010. Nitroaromatic compounds, from Synthesis to biodegradation. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 250–272.
- Krishnamoorthy U., Soller H., Steingass H., Menke K.H., 1991. A comparative study on rumen of energy supplements *in vitro*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 65, 28–35.
- Kristensen N.B., 2005. Splanchnic metabolism of volatile fatty acids in the dairy cow. *Anim. Sci.* 80, 3-10.
- Kulkarni, M., Chaudhari, A., 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *J. Environ. Manag.* 85, 496–512.

- La Penna G., 2010. The inhibition of hydrogenase by dioxygen. In: Proceedings of the NIC Symposium, Jülich, Germany. p 79.
- Lamera, E., Bouacida, S., Marc, L.B., Bouazizc, Z., Bouraiou, A., 2017. Sequential MCR/Fisher indolization strategy for the construction of polycyclic carbazole derivatives. *J. Tetrahedron Lett.* 58, 1305–1307.
- Lang, M., P. Spiteller, V. Hellwig, and W. Steglich, 2001. Stephanosporin, a “traceless” precursor of 2-chloro-4-nitrophenol in the gasteromycete *Stephanospora caroticolor*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40,1704–1705.
- Larina LI, Lopyrev VA., 2005. Synthesis of nitrobenzazoles. Part 1. *In: Attanasi OA, Spinelli D (eds) Targets in heterocyclic systems – chemistry and properties, vol 9. Italian Soc Chem, Rome. 327–362*
- Lassey, K.R., 2007. Livestock methane emission: from the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *J. Agric. For. Meteorol.* 142, 120–132.
- Latham, E. A., R. C. Anderson, W. E. Pinchak, and D. J. Nisbet, 2016. Insights on alterations to the rumen ecosystem by nitrate and nitrocompounds. *Front. Microbiol.* 7, 228.
- Lee, C., and Beauchemin, K.A., 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals : nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Can.J.Anim.Sci.* 94, 557–570.
- Leng, R. A., 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Anim. Prod. Sci.* 54, 519-543.
- Lewis D., 1951. The metabolism of nitrate and nitrite by the sheep. Reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *Biochem J.* 48, 175-179.
- Li, L., Davis, J., Nolan, J., and Hegarty, R., 2012. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. *Anim. Prod. Sci.* 52, 653–658.
- Liang, J. B., Terada, F., Hamaguch, I., 1989. Efficacy of using the face mask technique for the estimation of daily heat production of cattle. *In: Energy metabolism of farm animals (Ed. Y. Van Der Honing and W. H. Close). Pudoc, Wageningen, the Netherlands.*
- Lin M, Schaefer DM, Guo WS, Ren LP, Meng QX., 2011. Comparisons of *in vitro* nitrate reduction, methanogenesis, and fermentation acid profile among rumen bacterial, protozoal and fungal fractions. *AsianAustralasian Journal of Animal Sciences* 24, 471–478.

- Lin, M., W. Guo, Q. Meng, D. M. Stevenson, P. J. Weimer, and D. M. Schaefer., 2013. Changes in rumen bacterial community composition in steers in response to dietary nitrate. *Appl. Environ. Biotech.* 97, 8719-8727.
- Liping Zhao, Qingxiang Meng, Liping Ren, Wei Liu¹, Xinzhuang Zhang, Yunlong Huo, and Zhenming Zhou, 2015. Effects of Nitrate Addition on Rumen Fermentation, Bacterial Biodiversity and Abundance. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 28, 1433-1441.
- Liu, W.-K., X.-K. Wang, and C.-T. Che, 1996. Cytotoxic effects of sinococuline. *Cancer Lett.* 99, 217–224.
- Loesche, W.J., 1969. Oxygen sensitivity of various anaerobic bacteria. *Applied Microbiology.*, 18, 723-727.
- Lourenço M., Ramos-Morales E., Wallace R. J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal.* 1008-1023.
- Lund, P., R. Dahl, H. J. Yang, A. L. F. Hellwing, B. B. Cao, and M. R. Weisbjerg., 2014. The acute effect of addition of nitrate on *in vitro* and *in vivo* methane emission in dairy cows. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1432–1435.
- Machmuller, A., C. R. Soliva, M. Kreuzer., 2003. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. *Br. J. Nutr.* 90, 529-540.
- Madrid J., Megias M.D., Hernandez F., 2002. *In vitro* determination of dry matter and cell wall degradation, and production of fermentation end products of various by- products. *Ani. Feed. Sci. Tech.* 51, 189-199.
- Marais JP, Therion JJ, Mackie RI, Kristner A, Dennison C., 1988. Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *British Journal of Nutrition.* 59, 301–313.
- Marden, J.P., Bayourthe, C., Enjalbert, F., Moncoulon, R., 2005. A new device for measuring kinetics of ruminal pH and redox potential in dairy cow. *Journal of Dairy Science.*, 88, 277-281.
- Marounek M, Rada V., 1998. Age effect on *in vitro* fermentation pattern and methane production in the caeca of chickens. *Physiol Res.* 47, 259-63.
- Marounek M, Suchorska O, Savka O., 1999. Effect of substrate and feed antibiotics on *in vitro* production of volatile fatty acids and methane in caecal contents of chickens. *Anim Feed Sci Technol.* 80, 223-30.
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4, 351-65.

- Martin C., Morgavi D., Doreau M., Jouany J.P., 2006. Comment réduire la production de méthane chez les ruminants. In Fourrages. 187, 283-300
- 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. Journal of Animal Science. 86, 2642-2650.
- Martínez-Fernández, G., Abecia, L., Arco, A., Cantalapiedra-Hijar, G., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E., Kindermann, M., Duval, S., Yáñez-Ruiz, D.R., 2014. Effects of ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-nitrooxypropanol on ruminal fermentation, microbial abundance, and methane emissions in sheep. J. Dairy Sci. 97, 3790–3799.
- Matsubara, H., Hase, T., 1983. in Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics (Jensen, U., and Fairbrothers, D. E., eds) pp. 168–181, Springer- Verlag Inc., New York.
- Matsubara, H., Saeki, K., 1991. in Advances in Inorganic Chemistry (Cammack, R., ed) Vol. 38, pp. 223–267, Academic Press, New York.
- Matteuzi D., Sozzi T., 1971. *Bifidobacterium* bacteriophage from calf rumen. Z. Allg. Mikrobiol., 11, 57-58.
- Mayouf, R., Arbouche, F., 2014. Chemical composition and relative feed value of three Mediterranean fodder shrubs. Afr. J. Agric. Res. 9, 746–749.
- Mazzeo, D.E.C., Levy, C.E., de Angelis, D., Marin-Morales, M.A., 2010. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. J. Sci. Total Environ. 408, 4334–4340.
- McAllister TA, Meale SJ, Valle E, Guan LL, Zhou M, Kelly WJ., 2015. Use of genomics and transcriptomics to identify strategies to lower ruminal methanogenesis. J Anim Sci. 93, 1431-49.
- McAllister TA, Newbold CJ., 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. Aust J Exp Agric. 48, 7–13.
- McCaughey W.P., Wittenberg K., Corrigan D., 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows, Can. J. Anim. Sci., 79, 221- 226.
- Meckenstock, R.U., E. Annweiler, W. Michaelis, H.H. Richnow, and B. Schink, 2000. Anaerobic Naphthalene Degradation by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture. Applied and Environmental Microbiology, 66(7), 2743-2747.
- Medila I., 2016. Caractérisation chimique et fermentescibilité *in vitro* en présence du microbiote ruminal de dromadaire de certaines plantes halophytes de la région d'El Oued. Thèse de Doctorat des Sciences. Univ. Kasdi Merbah Ouargla. P. 161.

- Menke K.H. and Steingass H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Research and Devlop. 28, 7-55.
- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., F Ritz D., Shneider W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. J. of Agri. Sci. 97, 217-222.
- Michel, T. A., and J. M. Macy., 1990. Ferredoxin from *Selenomonas ruminantium*. Arch. Microbiol. 153, 518-520.
- Miller TL, Wolin MJ, Kusel EA., 1986. Isolation and characterization of methanogens from animal feces. Syst Appl Microbiol . 8, 234-8.
- Miller, T.L., 1995. The ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In: Engelhardt, W.V., Leonhard-Marek, S., Breves, G., Giesecke, D. (Eds.), Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. Ferdinand Enke Verlag, Berlin, pp. 317–331.
- Miller, W.H., Koes, R.M., 1988. Construction and operation of an open-circuit indirect calorimetry system for small ruminants. Journal of Animal Science 66, 1042-1047.
- Mills, J.A., Dijkstra, J., Bannink, A., Cammell, S.B., Kebreab, E., France, J., 2001. A mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: model development, evaluation, and application. J. Anim. Sci. 79, 1584-1597.
- Moran D., MacLeod M., Wall E., Eory V., McVittie A., Barnes A., Rees R.M., Topp C.F.E., Pajot G., Matthews R., Smith P., Moxey A., 2011. Developing carbon budgets for UK agriculture, land-use, land-use change and forestry out to 2022. Climatic Change, 105, 529-553.
- Morgavi DP, Forano E, Martin C, Newbold CJ. 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal. 4, 1024–1036.
- Morgavi DP, Martin C, Jouany JP, Ranilla MJ., 2012. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. Br J Nutr. 107, 388-97.
- Moss, A. R., 1993. Methane: Global Warming and Production by Ruminant. Chalcombe Publications, Canterbury, p. 86.
- Moss, A.R., Jouany, J., Newbold, N., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Ann. Zootechnol. 49, 231–253.

- Mould F. L., Morgan R., Kliem K. E., Krystallidou E. (2005). A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123-124.
- Müller, M., 1993. The hydrogenosome. Review article. *J Gen Microbiol* 139, 2879-2889.
- Müller, M., M. Mentel, J. J. van Hellemond, K. Henze, C. Woehle, S. B. Gould, R. Y. Yu, M. van der Giezen, A. G. M. Tielens, and W. F. Martin, 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 444-495.
- Murray RM, Bryant AM, Leng RA., 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. *Br J Nutr.* 36, 1-14.
- Nagaraja T.G., Towne G., Beharka A.A., 1992. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a high-grain diet, *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2410–2414.
- Newbold CJ, de la Fuente G, Belanche A, Ramos-Morales E, McEwan NR., 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. *Front Microbiol.* 6, 1313.
- Newbold CJ, Lassalas B, Jouany J-P., 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett Appl Microbiol.* 21, 230-4.
- Newbold, C. J., B. Lassalas, and J. P. Jouany, 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Lett. Appl. Microbiol.* 21, 230-234.
- Nishino, S., and J. C. Spain, 2006. Biodegradation of 3-nitrotyrosine by *Burkholderia* sp. strain JS165 and *Variovorax paradoxus* JS171. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1040–1044.
- Nolan J. V., Godwin B, I. R de Raphélis-Soissan, V. and R. S. Hegarty, 2016. Managing the rumen to limit the incidence and severity of nitrite poisoning in nitrate-supplemented ruminants. *Animal Production Science*, 56, 1317–1329.
- Nolan, J. V., Hegarty, R. S., Hegarty, J., Godwin, I. R. and Woodgate, R., 2010. Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. *Anim. Prod. Sci.* 50, 801-806.
- Nollet L., Mbanzamihiho L., Demeyer D.I., Verstraete W., 1997. 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* 80.71, 49-66.
- O'Mara F.P., 2011. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Animal Feed Science and Technology.* 7-15, 166-167.

- Ogata H., W. Lubitz, Y. Higuchi, 2009. [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism, Dalton Trans. 7577–7587.
- Ogimoto K., Imai S., 1981. Atlas of rumen microbiology. Japanese Science Society Press, p. Tokyo. 231 p.
- Palmer, K. and M. A. Horn, 2012. Actinobacterial nitrate reducers and proteobacterial denitrifiers are abundant in N₂O metabolizing peat. Appl. Environ. Microbiol. 78, 5584–5596.
- Pankaj Kumar Arora, 2012. Metabolism of para-nitrophenol in *Arthrobacter* sp. SPG, E3 J. Environ. Res. Manage. 3, 52–57.
- Pankaj Kumar Arora, Alok Srivastava, Vijay Pal Singh, 2014. Bacterial degradation of nitrophenols and their derivatives. Journal of Hazardous Materials 266, 42–59.
- Patra AK, Saxena J., 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. J Sci Food Agric. 15, 24–37.
- Patra, A. K. et Saxena, J., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry. 71, 1198–1222
- Paul S.S., Deb S.M., Singh D., 2011. Isolation and characterization of novel sulphate-reducing *Fusobacterium* sp. and their effects on *in vitro* methane emission and digestion of wheat straw by rumen fluid from Indian riverine buffaloes. Anim. Feed Sci. Technol., 166–167, 132–140.
- Paul, R.G., Williams, A.G. and Butler, R.D., 1990. Hydrogenosomes in the rumen entodiniomorphid ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. Journal of General Microbiology. 136, 1981–89.
- Pei CX, Mao SY, Cheng YF, Zhu WY., 2010. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. Animal. 4, 20–9.
- Peter K. et Ratnasamy S., 2014. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. J. Appl. Toxicol. 34, 810–824.
- Pfister JA., 1988. Nitrate intoxication of ruminant livestock. In: The Ecology and Economic Impact of Poisonous Plants on Livestock Production L.F. James (ed.) Westview Press, Boulder..
- Pinares-Patiño, C.S., Clark, H., 2008. Reliability of the sulfur hexafluoride tracer technique for methane emission measurement from individual animals: an overview. Australian Journal of Experimental Agriculture 48, 223–229.

- Pitta DW, Pinchak WE, Indugu N, Vecchiarelli B, Sinha R, Fulford JD., 2016. Metagenomic analysis of the rumen microbiome of steers with wheat-induced frothy bloat. *Front Microbiol.* 7, 689.
- Popova M., 2011. Structure et activité de la communauté des Archaea méthanogènes du rumen en relation avec la production de méthane par les ruminants. Thèse de Doctorat. Univ. Blaise Pascal. P. 282.
- Poulsen M, Schwab C, Borg JB, Engberg RM, Spang A, Canibe N., 2013. Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nat Commun.* 4, 14-28.
- Prabakaran A.R. and S. Mohan, 1991. FTIR and Raman studies on benzimidazole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy.* 47, 1111-1115.
- Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein, J. M. Willey, L. M. Sherwood, and C. J. Woolverton, 2010. *Microbiologie*, 3ème édition, Bruxelles, Belgique.
- Rees, E. M. R., D. Lloyd, and A. G. Williams, 1998. The effects of differing concentrations of CO₂ and O₂ on the fermentative metabolism of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum* and *Neocallimastix frontalis* L2. *Can J Microbiol.* 44, 819-824.
- Reichl, J.R., Baldwin, R.L., 1975. Rumen modeling: rumen input-output balance models. *J. Dairy Sci.* 58, 879-890.
- Reynold, C. K., Humphries, D. J., Kirton, P., Kindermenn, M., Duval, S. et Steinberg, W., 2014. Effects of 3-nitrooxypropanol on methane emission, digestion, and energy and nitrogen balance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97, 3777-3789.
- Rira M., 2015. Impact de plantes riches en métabolites secondaires sur la méthanogénèse ruminale et les activités fermentaires du microbiome ruminal chez des ovins. Thèse de Doctorat. Univ. de Constantine. P. 223.
- Robinson, J. A., R. F. Strayer, and J. M. Tiedje, 1981. Method for measuring dissolved hydrogen in anaerobic ecosystems: Application to the rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 545-548.
- Rodríguez, A., Ignacio, I., Guzmán, Á., Cecilia, C., José Luis, R., Mercedes, G., Hugo, C., 2011. Anaerobic biotransformation of nitro-compounds to amines by bovine rumen fluid. *J. Green Sustain. Chem.* 1, 47-53.
- Rodríguez, A., Ignacio, I., Guzmán, Á., Cecilia, C., José Luis, R., Mercedes, G., Hugo, C., 2011. Anaerobic biotransformation of nitro-compounds to amines by bovine rumen fluid. *J. Green Sustain. Chem.* 1, 47-53.

- Rubio M.A., E. Lissi, N. Herrera, V. Perez, N. Fuentes, 2012. Phenol and nitrophénols in the air and dew waters of Santiago de Chile, *Chemosphere*. 86, 1035–1039.
- Rumpler, W.V., D.E. Johnson Et D.B. Bates. 1986. The effect of high dietary cation concentration on methanogenesis by steers fed diets with and without ionophores. *J. Anim. Sci.* 62, 1737-1741.
- Russel R.W., Gahr S.A., 2000. Glucose availability and associated metabolism. In : D’Mello J.P.F. (Ed.), *Farm animal metabolism and nutrition*. CABI Publishing : Oxon. 121-147.
- Russell J. B., Wallace R. J., 1988. Energy yielding and consuming reactions. In: Hobson, P. N.(ed.), *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Applied Science, London and New York. 185-215.
- Russell, J.B., Strobel, H.J., 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1–6.
- Sabrina R. A., Biplab K. D., Md. S. H., U. K., Abu Shara S. R., 2017. Synthesis and antioxidant activity of 2-substituted-5-nitro benzimidazole derivatives . *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 9, 308-310
- Sander van Z., 2011. Dietary strategies to reduce methane emissions from ruminants. PhD thesis, Wageningen Univ. Wageningen, the Netherlands. P. 978.
- Sar C, Mwenya B, Pen B, Takaura K, Morikawa R, Tsujimoto A, Kuwaki K, Isogai N, Shinzato I, Asakura Y, Toride Y, Takahashi J., 2005a. Effect of ruminal administration of *Escherichia coli* wild type or a genetically modified strain with enhanced high nitrite reductase activity on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-infused sheep. *British Journal of Nutrition*. 94, 691–697
- Sar, C., Mwenya, B., Santoso, B., Takaura, K., Morikawa, R., Isogai, N., Asakura, Y., Toride, Y., Takahashi, J., 2005b. Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high nitrite reductase activity on *in vitro* ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. *J. Anim. Sci.* 83, 644–652.
- Sauvant D., Assoumaya C., Giger-Reverdin S., Archimède H., 2006. Etude comparative du mode d'expression du niveau d'alimentation chez les ruminants. *Renc. Rech. Rum.* 13, 103.
- Sauvant, D., Meschy, F., Mertens, D., 1999. Les composantes de l’acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales*. 12, 49-60.
- Sauvant, D., S. Giger-Reverdin, A. Serment, and L. Broudiscou., 2011. Influences des régimes et de leur fermentation dans le rumen sur la production de méthane par les ruminants. *INRA Prod. Anim.* 24, 433-446.

- Sawers, G., 1994. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 66, 57-88.
- Sayyafi, M., Mozhdeh, S.H., Hamid, R.K., Bazgir, A., 2008. One-pot, three-component route to 2H-indazolo [2,1-b] phthalazine-triones. *J. Tetrahedron*. 64, 2375–2378.
- Schwarz, E., and B. Friedrich, 2003. The H₂-metabolizing prokaryotes. *In*: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg and K. H. Schleifer (eds.) *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community* Springer, New-York, USA. p.
- Schwarzbauer J., M. Ricking, R. Littke, 2004. Quantitation of nonextractable anthropogenic contaminants released from Teltow Canal sediments after chemical degradation, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 31, 469–481.
- Shi WB, Moon CD, Leahy SC, Kang DW, Froula J, Kittelmann S., 2014. Methane yield phenotypes linked to differential gene expression in the sheep rumen microbiome. *Genome Res.* 24, 1517-25.
- Shima S., E. J. Lyon, M. Sordel-Klippert, M. Kauss, J. Kahnt, R. K. Thauer, K. Steinbach, X. Xie, L. Verdier et C. Griesinger, 2004. The Cofactor of the Iron–Sulfur Cluster Free Hydrogenase Hmd: Structure of the Light-Inactivation Product, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 2547–2551.
- Silberberg M., Chaucheyras-Durand F., Commun L., Mialon M., Monteils V., Mosoni P., Morgavi DP., Martin C., 2008. Repeated acidosis challenges and live yeast supplementation shape rumen microbiota and fermentations and modulate inflammatory status in sheep. *Renc. Rech. Rum.* 15, 208.
- Sinderal, J. J. and Milkowski, A. L., 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide* 26, 259-266.
- Sirohi, S. K., Goel, N. et Singh, N., 2013. Utilization of saponins, a plant secondary metabolite in enteric methane mitigation and rumen modulation. *Annual Research & Review in Biology.* 4, 1-19.
- Smith, L.W., Hall, G.T., Kennedy, G.L., 1988. Acute and repeated dose inhalation toxicity of para-nitrophenol sodium salt in rats. *J. Drug. Chem. Toxicol.* 11, 319–327.
- Smolenski, W. J., and J. A. Robinson, 1988. *In situ* rumen hydrogen concentrations in steers fed eight time daily, measured using a mercury reduction detector. *FEMS Microbiol. Ecol.* 53, 95-100.
- Soltner D., 1994. *Alimentation des animaux domestiques*. *Cool. Sci. Tech. Agric.*, édition, Paris. 20^{ème} édition.

- Spiro, T. G., 1982. Iron-Sulfur Proteins, Wiley Interscience, New York.
- Stewart CS, Flint HJ, Bryant MP., 1997. The rumen bacteria. *In*: Hobson PN, Stewart CS, editors. The rumen microbial ecosystem. London: Chapman & Hall. 10–72.
- Stewart V, Parales J Jr., 1988. Identification and expression of genes narL and narX of the nar (nitrate reductase) locus in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 170, 1589–1597.
- Storm, I.M.L.D., Hellwing, A.L.F., Nielsen, N.I., Madsen, J., 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals*. 2, 160- 183.
- Szumacher-Strabel, M. et Cieslak, A., 2010. Potential of phytofactors to mitigate rumen ammonia and methane production. *J. Anim. Feed Sci*. 19, 319-337.
- Takahashi J., Chaudhry A.S., Beneke R.G., Young B.A., 1997. Modification of methane emission in sheep by cystéine and a microbial preparation, *Sci.Total Environ.*, 204, 117-123.
- Takahashi, J., Chaudhry, A.S., Beneke, R.G., Young, B.A., 1999. An open-circuit hood system for gaseous exchange measurements in small ruminants. *Small Ruminant Research*. 32, 31-36.
- Takahashi, J., Johchi, N., Fujita, H., 1989. Inhibitory effects of sulphur compounds, copper and tungsten on nitrate reduction by mixed rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.* 61, 741–748.
- Tarayre, C., 2012. Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Ed. Univ. Eur. P. 116.
- Taylor, B.F., W.L. Campbell, and I. Chinoy, 1970. Anaerobic Degradation of the Benzene Nucleus by a Facultatively Anaerobic Microorganism. *Journal of Bacteriology*, 102, 430-437.
- Teather R.M., Mahadevan S., Erfle J.D., Sauer F.D., 1984. Negative correlation between protozoal and bacterial levels in rumen samples and its relation to the determination of dietary effects on the rumen microbial population, *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 566–570.
- Thauer R. K., Klein A. R., Hartmann G. C., 1996. Reactions with Molecular Hydrogen in Microorganisms: Evidence for a Purely Organic Hydrogenation Catalyst. *Chem. Rev.* 96, 3031-3042.
- Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker, 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* 41, 100-180.

- Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185–197.
- Theodorou, M.K., Gascoyne, D.J., Akin, D.E., Hartley, R.D., 1987. Effect of phenolic acids and phenolics from plant cell walls on rumenlike fermentation in consecutive batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1046–1050.
- Ushida, K., and J. P. Jouany, 1996. Methane production associated with rumen-ciliated protozoa and its effect on protozoan activity. *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 129-132.
- Van Dijk, C., Mayhew, S.G., Grands, H.J. and Veeger, C., 1979. Purification and properties of hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *European Journal of Biochemistry.* 102, 317-330.
- Van Nevel, C.J., Demeyer, D., 1996. Control of rumen methanogenesis. *J. Environ. Monit. Assess.* 42, 73–97.
- Van Soest P.J., Wine R.H., Moore L.A., 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. In: *Proceedings of the 10th International Grassland Congress, Helsinki, Finland.* 10, 438–441.
- Vermorel M., 1995. Productions gazeuses et thermiques résultant des fermentations digestives. *Nutrition des ruminants domestiques.* 2, 649-670.
- Vermorel M., Jouany J-P., 1989. Effects of rumen protozoa on energy utilisation by wethers of two diets based on ammonia-treated straw supplemented or not with maize. *INRA. Editions, Versailles, France,* 2, 475-476.
- Vidic, R.D., Brantley, S.L., Vandebossche, J.M., Yoxtheimer, D., & Abad, J.D., 2013. Impact of shale gas development on regional water quality. *Science,* 340.
- Vignais P.M., B. Billoud, J. Meyer, 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases, *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455–501.
- Vignais, P. M., and A. Colbeau, 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 159-188.
- Vlaming, J.B., Brookes, I.M., Hoskin, S.O., Pinares-Patiño, C. S., Clark, H., 2007. The possible influence of intra-ruminal sulphur hexafluoride release rates on calculated methane emissions from cattle. *Canadian Journal of Animal Science.* 87, 269-275.
- Vogels, G. D., W. F. Hoppe, and C. K. Stumm, 1980. Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 608-612.

- Voncken, F. G.; Boxma, B.; van Hoek, A. H.; Akhmanova, A. S.; Vogels, G. D.; Huynen, M.; Veenhuis, M.; Hackstein, J. H., 2002. A hydrogenosomal [Fe]-hydrogenase from the anaerobic chytrid *Neocallimastix* sp. L2. *Gene*. 6, 103-112.
- Wallace R. J., Cotta M. A., 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. *In*: Hobson, P. N. (ed.), *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Applied Science. London and New York. pp: 217-249.
- Wang C.J., Wang S.P., Zhou H., 2009. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 148, 157-166.
- Wang Y, McAllister TA, Yanke LJ, Cheeke PR., 2000. Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *J Appl Microbiol.* 88, 887–896.
- Wang, M., X. Z. Sun, P. H. Janssen, S. X. Tang, and Z. L. Tan, 2014. Responses of methane production and fermentation pathways to the increased dissolved hydrogen concentration generated by eight substrates in *in vitro* ruminal cultures. *Anim. Feed Sci. Technol.* 194, 1-11.
- Wang, X.-K., Y.-R. Zhao, T.-F. Zhao, S. Lai, and C.-T. Che, 1994. 1-Nitroaknadinine from *Stephania sutchuenensis*. *Phytochemistry*. 35, 263–265.
- Williams AG and Coleman GS., 1992. *The rumen protozoa*. Springer-Verlag, New York, USA.
- Williams, A. G., and G. S. Coleman., 1997. *The rumen protozoa*. *In*: P. N. Hobson and C. S. Stewart (eds.) *The rumen microbial ecosystem* Blackie Academic & Professional, London, UK. p 73-139.
- Wischer, G., 2012. Effects of monensin and tannin extract supplementation on methane production and other criteria of rumen fermentation *in vitro* and in long-term studies with sheep. Thèse de doctorat. Univ. of Hohenheim, Stuttgart, Allemagne
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML., 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 4576-9.
- Wolin MJ, Miller TL, Stewart CS.,1991. Microbe–microbe interactions. *In*: Hobson PN, Stewart CS, editors. *The rumen microbial ecosystem*. New York: Blackie Academic & Professional. 467-91.
- Wolin, M. J., Miller, T. L., & Stewart, C. S., 1997. Microbe-microbe interactions. *In* *The rumen microbial ecosystem*. Springer Netherlands. 467-491.

- Woodward, S. L., Waghorn, G. C. et Laboyrie, P. G., 2004. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod. 64, 160-164.
- Wright A. D., Kennedy P., O'neill C.J., Toovey A.F., Popovski S., Rea S.M., Pimm C.L., Klein L., 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens, Vaccine, 22, 3976-3985.
- Wright A.D.G., Kennedy P., O'Neill C.J., Toovey A.F., Popovski S., Rea S.M., Pimm C.L., Klein L., 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. Vaccine, 22, 3976-3985.
- Wright MJ, Davison, KL., 1964. Nitrate accumulation in crops and nitrate poisoning in animals. Adv Agro. 16, 197-247.
- Wu, G., 2013. Amino acids: Biochemistry and nutrition. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA.
- Wuebbles, D.J., Hayhoe, K., 2002. Atmospheric methane and global change. Earth-Sci. Rev. 57, 177–210.
- Yadav, S., Narasimhan, B., Kaur, H., 2016. Perspectives of benzimidazole derivatives as anticancer agents in the new era. J. Anticancer Agents Med. Chem. 16, 1403–1425.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., 2016. Non-cow milk production: the greenhouse gas emissions and climate change. In: Tsakalidou, Effie (Ed.), Non-Bovine Milk and Milk Products, pp. 15–38.
- Yarlett, N., D. Lloyd, and A. G. Williams, 1985. Buyrate formation from glucose by the rumen protozoon *Dasytricha ruminantium*. Biochem. J. 228, 187-192.
- Yarlett, N., Orpin, C.G. Munn, E.A., Yarlett, N.C. and Greenwood, C.A., 1986. Hydrogenosomes in the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum*. Biochemical Journal. 236, 729-739.
- Yoshida J, Nakamura Y, Nakamura R., 1982. Effects of protozoal fraction and lactate on nitrate metabolism of microorganisms in sheep rumen. Nihon Chikusan Gakkaiho 53, 677–685
- Zelter S. Z., Leroy F., Tissier J. P., 1970. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne dans le rumen. Etudes *in vitro* : comportement en milieu de rumen de quelques protéines tannées avec du tannin de châtaignier ou certains aldéhydes (formaldéhyde, glutaraldéhyde, glyoxal). Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 10, 111-122.

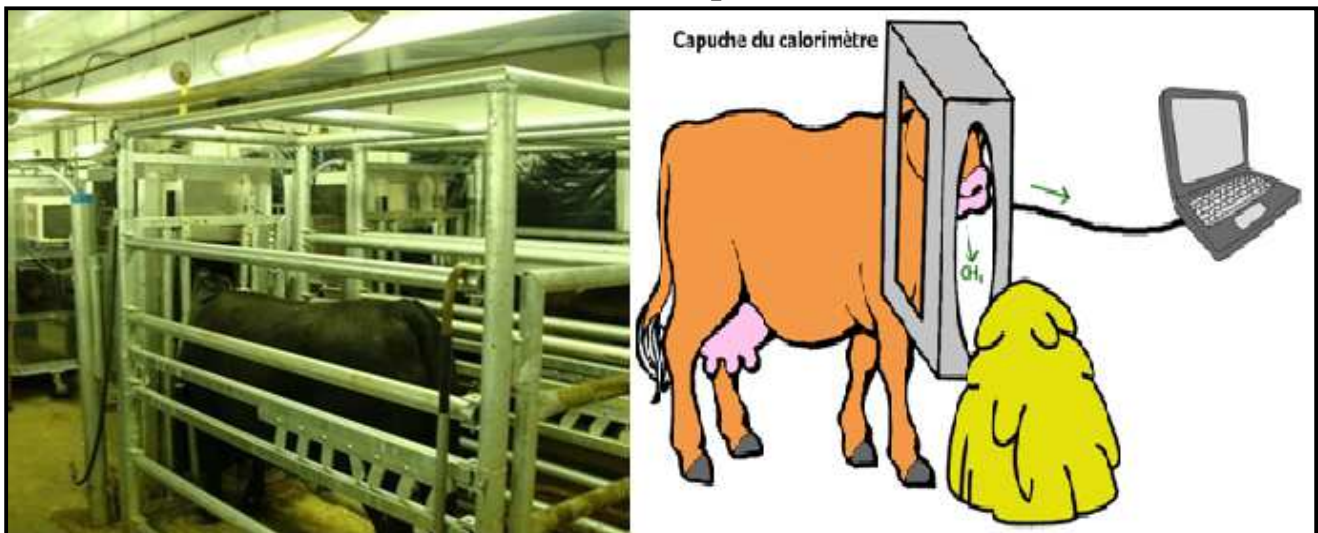
- Zened, A., 2011. Particularités du microbiote et son activité lors de la déviation de la biohydrogénation ruminale de l'acide linoléique de la voie trans-11 à la voie trans-10. Thèse de Doctorat. Univ. de Toulouse. P. 336.
- Zhang, D.F., Yang, H.J., 2011. *In vitro* ruminal methanogenesis of a hay-rich substrate in response to different combination supplements of nitrocompounds; pyromelliticdiimide and 2-bromoethanesulphonate. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 163, 20–32.
- Zhang, J.-J., H. Liu, Y. Xiao, X.-E. Zhang, and N.-Y. Zhou, 2009. Identification and characterization of catabolic para-nitrophenol 4-monooxygenase and para-benzoquinone reductase from *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *J. Bacteriol.* 191, 2703–2710.
- Zhang, X., and L.Y. Young, 1997. Carboxylation as an Initial Reaction in the Anaerobic Metabolism of Naphthalene and Phenanthrene by Sulfidogenic Consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4759-4764.
- Zhenming, Z., Qing-xiang, M., Zhong-tang, Y., 2011. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* Ruminant cultures. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2634–2639.
- Zhenming, Z., Zhong-tang, Y., Qing-xiang, M., 2012. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. *J. Bioresour. Technol.* 103, 173–179
- Zhou M, Chung YH, Beauchemin KA, Holtshausen L, Oba M, McAllister TA., 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *J Appl Microbiol.* 111, 1148-58.
- Zhu XY, Joerger RD., 2003. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent *in situ* hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Poultry Sci.* 82, 1242-9.
- Zirngibl C., Van Dongen W., Schwörer B., Von Büнау R., Richter M., Klein A., Thauer RK., 1992. H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur J Biochem.* 208(2), 511-20.
- Zumft, W.G., 1992. The denitrifying prokaryotes. In: Balows, A. (Eds.), *The Prokaryotes*, second ed. Springer, New York, pp. 554–582.

Annexes

Annexe 1. Mesure de méthane par Calorimétrie indirecte



La chambre respiratoire.

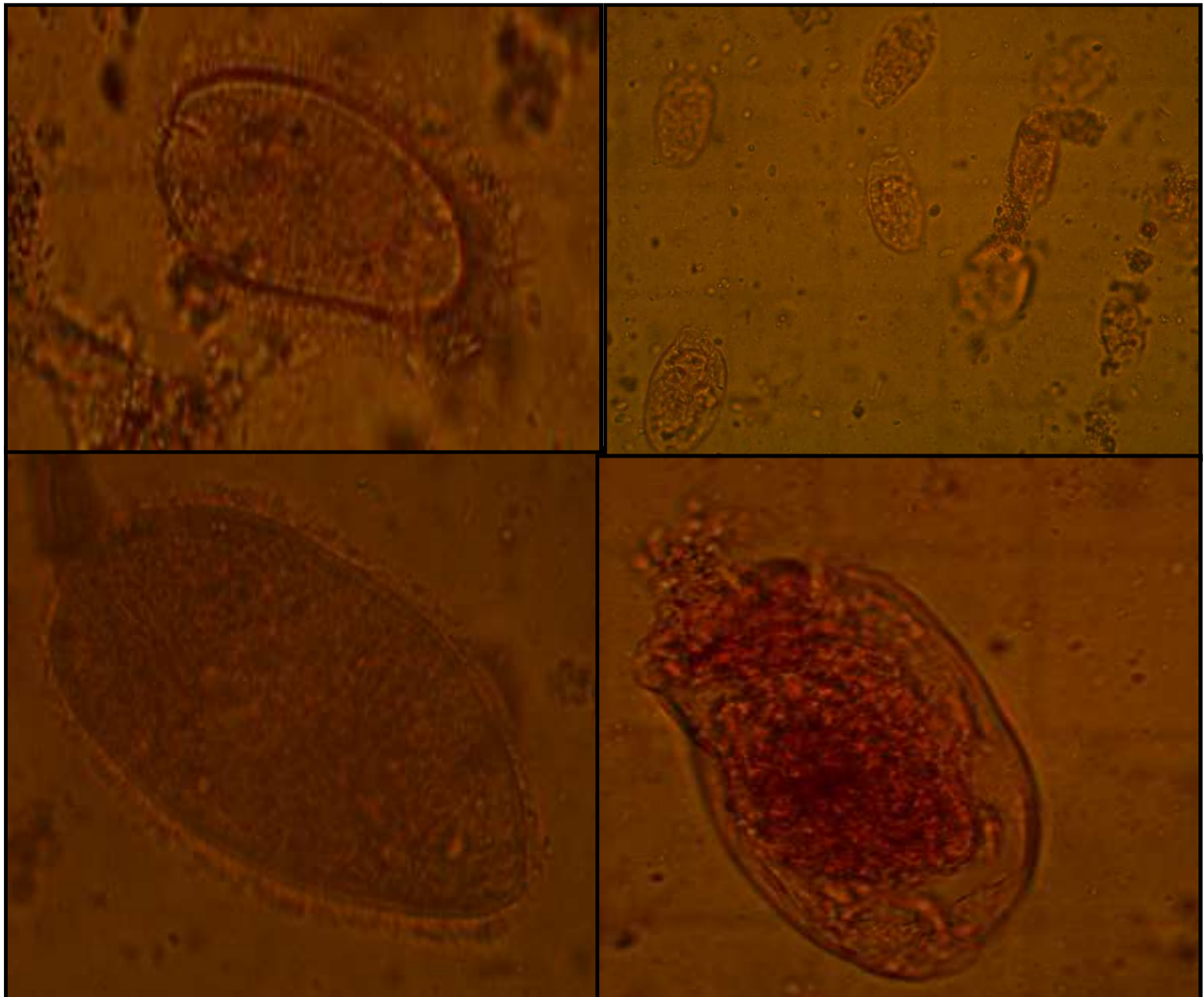


Coffre de tête ou capuche du calorimètre.



Technique du gaz traceur SF6

Annexe 2. Observation microscopique des protozoaires ruminants



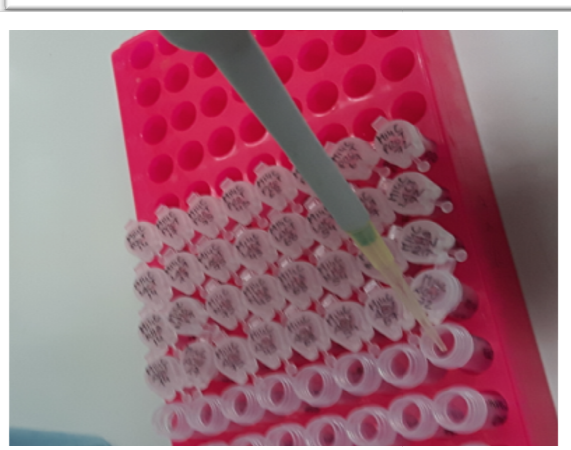
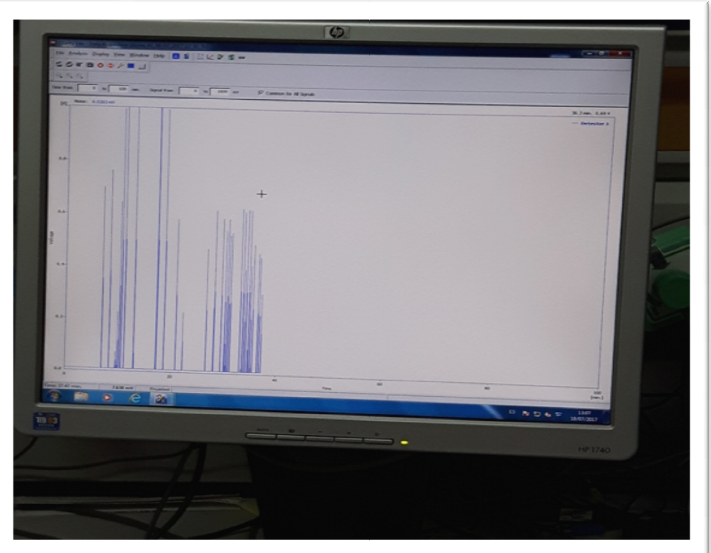
Photographies des protozoaires ruminants observés par un microscope optique (X40).

Annexe 3. Analyses au laboratoire



Préparation de la salive artificielle.

Annexe 3. Analyses au laboratoire



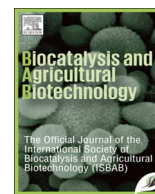
Publications et Communications

KHEDDOUMA Asma, ARHAB Rabah, ANTONIO Ignacio Martín-García, AOUIDANE Laiche, BOURAIYOU Abdelmalek, 2018. Effects of the methane-inhibitors Nitrophenol, 5-Nitrobenzimidazol and two new synthetic nitrocompounds on in vitro ruminal fermentation. *Journal of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14 , 160–165.

KHEDDOUMA Asma, BENACHI Safa et AOUIDANE Laiche, 2018. Effet des produits nitreux sur la flore microbienne ruminale. Editions Universitaires Européennes. ISBN: 978-620-2-28277-2.

KHEDDOUMA Asma, YAKHLEF Wahiba et ARHAB Rabah, 2016. Etude de la réduction du méthane ruminal par l'application des produits nitreux *in vitro*. Séminaire International sur la biotechnologie appliquée à l'agriculture, la santé et l'environnement, Université de Khenchela. Avril, 2016.

YAKHLEF Wahiba , KHEDDOUMA Asma et ARHAB Rabah, 2015. Évaluation de l'activité antibactérienne des composés phénoliques issus de l'olivier. 6^{es} Journées Scientifiques Internationales sur la Valorisation des Bioressources, Tunisie. Mai 2015.



Effects of the methane-inhibitors Nitrophenol, 5-Nitrobenzimidazol and two new synthetic nitrocompounds on *in vitro* ruminal fermentation

Asma Kheddouma^{a,b,*}, Rabah Arhab^b, Antonio Ignacio Martín-García^c, Laiche Aouidane^a, Abdelmalek Bouraiou^d

^a University of Abbes Laghrour Khenchela, Faculty of Nature and Life Sciences, BP: 1252 Route de Batna Khenchela, Algeria

^b Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Larbi Ben M'Hidi, Oum El Bouaghi, Algeria

^c Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Camino del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

^d Unité de Recherche de Chimie de l'Environnement et Moléculaire Structurale (CHEMS), Université-Constantine 1 (ex Mentouri-Constantine), Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Methane-inhibitor
Rumen
Nitrophenol
5-Nitrobenzimidazol
ABLE 244
ABLE 245

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the effects of four nitrocompounds (Nitrophenol, 5-Nitrobenzimidazol and two synthetic nitrocompounds ABLE 244 and ABLE 245) on methane production and fermentation characteristics using *in vitro* rumen batch culture. 0, 2, 8 or 12 μM of each nitrocompound were incubated. The higher concentrations of Nitrophenol and 5-Nitrobenzimidazol produced 60% less CH_4 ($P < 0.05$) compared to controls, while two synthetic nitrocompounds ABLE 244 and ABLE 245 had no effect on CH_4 production. Quantification of fermentation end-products indicated that fermentation efficiencies were not compromised by the nitro-treatments.

1. Introduction

Methane is a greenhouse gas that contributes to global warming (Lassey, 2007). After carbon dioxide; methane is considered the most potent greenhouse gas (IPCC et al., 2001), due to the higher efficiency (20–30 times) of long-wave radiation absorption relative to CO_2 and involvement of CH_4 in chemical reactions that give ozone as the final product (Crutzen, 1995). Due to the increased concentration of CH_4 in the atmosphere in the post-industrial era, several investigations have been involved to identify sources and sinks of methane and to estimate their effects (Bodelier Paul and Laanbroek, 2004; Hilary et al., 2012; Guangming et al., 2013).

In the livestock sector, ruminants contribute significantly to global greenhouse gas emissions (Yáñez-Ruiz and Martín-García, 2016). In terms of the environment, ruminal methanogenesis accounts for about 12–14% of total greenhouse gas emissions (Zervas and Tsiplakou, 2012). But methane production results in a loss of raw energy (4–12%) for cattle fed on forage and fodder (Zhenming et al., 2012). In the rumen, CH_4 is produced by methanogens catalyzing the transfer of hydrogen and carbon dioxide into methane. In addition to methane production, the low hydrogen partial pressure by methanogenesis has a great influence on other products of the non-methanogenic and fermentative microbial community (Wolin et al., 1997). In many cases, the reduction of CH_4 production in the rumen may thus affect digestive

function and microbial cell yields due to altered fermentation efficiencies associated with microbial hydrogen transfer reactions (Miller, 1995; Van Nevel and Demeyer, 1996; Anderson et al., 2008)

Several methods have been developed by ruminant microbiologists to reduce the energy losses associated with the production of ruminal CH_4 (Anderson et al., 2008), and many chemical inhibitors reduce methanogenesis (eg monensin and lasalocide) (Russell and Strobel, 1989), plant extracts (tannins for example) (Hariadi and Santoso, 2010) or new synthetic compounds (Patra et al., 2017). These strategies involve supplementing ruminants with anti-methanogenic compounds that directly inhibit methanogens or inhibit the biochemical reactions involved in methane production (Bozic et al., 2009). Among these methods; is the change in electron acceptors that consume more efficiently the reducing equivalents produced during fermentation to redirect the electron flux from the reduction of carbon dioxide to CH_4 (Anderson and Rasmussen, 1998; Sar et al., 2005). Several nitrocompounds have the ability to reduce ruminal methane *in vitro* up to 90% (Anderson et al., 2003), such as nitroethane, 2-nitroethanol, 2-nitro-1-propanol and 3-nitro-1-propionic inhibit the rumen. CH_4 production (Anderson and Rasmussen, 1998; Anderson et al., 2003, 2008; Bozic et al., 2009; Gutierrez-Banuelos et al., 2008). In addition, nitroethane and 2-nitro-1-propanol reduce CH_4 -producing activity *in vivo* (Anderson et al., 2006; Gutierrez-Banuelos et al., 2008; Zhang and Yang, 2011), as well as ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-

* Corresponding author at: University of Abbes Laghrour Khenchela, Faculty of Nature and Life Sciences, BP: 1252 Route de Batna Khenchela, Algeria
E-mail address: kheddouma.asma@hotmail.fr (A. Kheddouma).

nitrooxypropanol have shown potential for successful use as anti-methanogenic additives in ruminants (Martínez-Fernández et al., 2014). Short-chain nitro compounds have demonstrated potently inhibiting methanogenesis and can serve as terminal electron acceptors (Zhenming et al., 2011).

The use of nitrates in reducing methane has been limited because of the risk of potential nitrite accumulation and its ability to cause methemoglobinemic cattle (Zhenming et al., 2012). Recent work, however, suggests that the risk of ruminal nitrite accumulation maybe alleviated by co-supplementation with nitrite-reducing bacteria or decreasing the rapidity of nitrate reduction in the rumen by feeding nitrate with a slow-release coating (Raphélis-Soissan et al., 2017). Therefore, nitrate may be a potential inhibitor to attenuate methane in cattle.

Literature survey revealed that benzimidazole derivatives have considerable interest as an antimicrobial (Ates-Alagoz, 2016) and anticancer agents (Yadav et al., 2016). However, *in vitro* antitumor screening of benzimidazoles toward cancer cell lines demonstrated that these compounds are the most potent analogs toward all tested cell lines (El-Gohary and Shaaban, 2017).

Smith et al. (1988) experiment's on male rats exposed for 2 weeks to up to 2 mg Nitrophenol have demonstrated that no histopathological alterations in the esophagus, stomach, small intestine, colon, and cecum. On the other hand, No studies were located regarding the carcinogenic effects in humans or animals following inhalation exposure to Nitrophenol or Nitrophenol derivatives.

The objective of this study was to evaluate the effects of two newly synthesized nitrocompounds, 13- (4-nitrophenyl) -3,4-dihydro-2H-indazolo [1,2-b] phthalazine-1,6, 11 (2H, 13H) -trione (ABLE 244) and 16- (4-nitrophenyl) -1,16-dihydrophthalazino [2', 3': 1,2] pyrazolo [4,3-a] carbazole-9,14 dione (ABLE 245), and two commercial nitrocompounds, Nitrophenol (NIP) and 5-Nitrobenzimidazol (5-NBZ) on the total *in vitro* production of volatile gas, methane and fatty acid in the rumen.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Newly synthesized nitrocompounds (Fig. 1) were synthesized at the Crystallography Laboratory (University of Constantine, Algeria) as follows:

The 13-(4-nitrophenyl)-3,4-dihydro-2H-indazolo [1,2-b] phthalazine-1,6,11(2H, 13H)-trione (ABLE 244) was prepared according to the modified procedure (Sayyafi et al., 2008) via the multi component reaction of phthalhydrazide (1 mmol), 1,3-cyclohexadione (1.05 mmol) and 4-nitrobenzaldehyde (1.05 mmol) at reflux of acetic acid and in the presence of a catalytic amount of trifluoroacetic acid.

The 16-(4-nitrophenyl)-1,16-dihydrophthalazino [2',3':1,2]

pyrazolo [4,3-a]carbazole-9,14 dione (ABLE 245) was obtained according to the previously described procedure (Lamera et al., 2017) from reaction of phthalhydrazide (1 mmol), 4-nitrobenzaldehyde (1 mmol), 1,3-cyclohexadione (1.05 mmol) and phenylhydrazine (1.7 mmol) using a sequential MCR/Fisher indolization strategy at reflux of acetic acid and in the presence of a catalytic amount of trifluoroacetic acid.

2.2. Experimental design and animal management

Animals were cared and handled in accordance with the Spanish guidelines for experimental animal protection (Royal Decree 53/2013 on the protection of animals used for experimentation or other scientific purposes) in line to corresponding European Directive (2010/63/EU). The corresponding experimental protocol was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Estación Experimental del Zaidín (Spanish National Research Council).

Rumen content from three caulated goats was collected before morning feeding, through two layers of sterilized cheesecloth under a steady stream of oxygen-free CO₂ and maintained at 40 °C in a water bath. Then, in an interval of time lasting 30 min, the rumen fluid was used as inoculums for *in vitro* batch incubations as follow.

2.3. *In vitro* incubation

Tests for effects of inhibitors on ruminal methane production were accomplished by batch culture (Theodorou et al., 1987). The culture medium consisted of an artificial saliva (Menke and Steingass, 1988) that was bubbled with CO₂ until saturated before being used (Krishnamoorthy et al., 1991) and the clarified rumen fluid in a 3:1 ratio in crimp-top Wheathon bottles (capacity 120 ml). Each *in vitro* culture tube contained 30 ml medium and 10 ml fresh rumen fluid collected from three caulated goats before morning feeding; containing 0.3 g ground oats hay, and 0, 2, 8 and 12 μM of NIP, 5-NBZ, ABLE 244 and ABLE 254.

Culture tubes were immediately closed with rubber stoppers to contain the respective gas phase, and incubated upright without agitation at 39 °C during 24 h. Gas pressure in headspace was released and quantified using a Pressure Meter (Wide Range 840065) after 2, 4, 6, 12 and 24 h.

2.4. Gas and methane measurement

After 24 h incubation, a gas sample (about 5 ml) was stored in an evacuated tube (Terumo Europe N.V., Leuven, Belgium) to determine CH₄ produced from 12 to 24 h by gas chromatography using a HP Hewlett 5890 Packard Series II gas chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with a flame ionization detector (FID) and an HPINNOWAX cross linked polyethylene glycol column

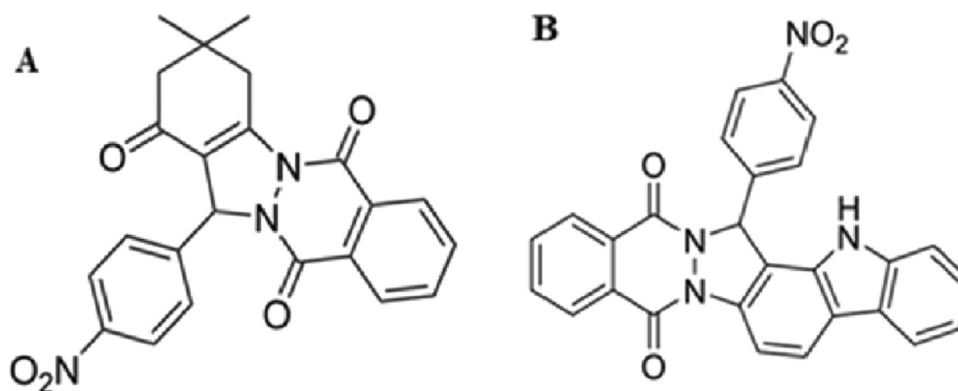


Fig. 1. Structure of ABLE 244 (A) (Sayyafi et al., 2008) and ABLE 245 (B) (Lamera et al., 2017).

(25 m × 0.2 mm × 0.2 μm; Teknokroma, Madrid, Spain). The carrier gas was N₂ and peaks were identified and quantified by using with a standard curve made by injecting different volumes of 99.9% pure CH₄ pre and post the injection of samples. Samples of 0.5 ml of gas were injected using a 1 ml Sample-Lock® syringe (Hamilton, Reno, NV, USA). Bottles were then opened and a sample was taken (0.8 ml was added to 0.8 ml of deproteinising solution consisting in 20 g of metaphosphoric acid and 0.8 g of crotonic acid, as internal standard, per liter) for GC VFA determination following procedure described by Arco-Pérez et al. (2017).

2.5. Statistical analyses

The incubation run was performed using the rumen fluid from each of the three goats to inoculate each of the 3-replicates per treatment (per compound and dose). The total gas and CH₄ production, VFA and Protozoa counts data were analyzed using the SPSS software (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, New York, USA) by general linear model (GLM) repeated measures (dose), including the fixed effects of compound and dose × compound interaction, with the donor animal as the experimental unit. Polynomial response to incremental amounts of each compound was evaluated using orthogonal contrasts. When a significant effect was found, post hoc comparison of means by compound was made using the LSD test. Differences were declared significant at $P < 0.05$ and considered as tendencies towards significance at $P < 0.10$.

3. Results and discussion

3.1. Total gas and CH₄ production

Total gas production (GP) was decreased ($P < 0.05$) by near 30% with 12 μM Nitrophenol (NIP) compared to unsupplemented control cultures (Table 1). These results indicate that NIP at this level negatively affects the *in vitro* rumen fermentation. However, 5-NBZ, ABLE 244 and ABLE 245 did not affect gas production.

A number of *in vitro* studies have demonstrated the anti-methanogenic potential of a class of nitro-compounds such as nitroethane, 2-nitroethanol, 2-nitro-1-propanol and 3-nitro-1-propionic acid (Anderson and Rasmussen, 1998), consistent with similar studies using other commercially available compounds like nitroethane (Anderson et al., 2010) and with earlier *in vitro* studies with short chain nitro-compounds (Gutierrez-Banuelos et al., 2008; Saengkerdsub et al., 2006), that with the higher concentration being near that used in earlier studies (Anderson et al., 2003, 2008, 2010), NIP and 5-NBZ markedly inhibited CH₄ production ($P < 0.05$) with 12 μM NIP and

12 μM 5-NBZ by more than 60% when compared to control (Table 1).

These nitrocompounds, that reduce CH₄ and gas production, may have transformed by ruminal bacteria; Kulkarni and Chaudhari (2007) reported that most organisms contain redox enzymes (nitroreductase), which transform nitro-aromatics into corresponding amines, through the successive addition of electron pairs donated by co-substrates. Microorganisms of the rumen fluid biocatalyzed the reduction of nitro-compound substrates to yield the respective amines (Rodríguez et al., 2011).

Rhodococcus erythropolis, *Rhodococcus* sp., *Nocardioides* sp., *Nocardioides simplex* and *Rhodococcus* sp. are all able to grow using Nitrophenol as sole carbon and/or nitrogen and energy sources (Kou-San and Rebecca, 2010).

A main effect on total gas production was not observed ($P > 0.05$) with ABLE 244 and ABLE 245, probably because the biodegradability of long-chain products by bacteria is difficult (Tarayre, 2012). Likewise, the absence of the adaptation of bacteria to the nitrocompounds (due to insufficient contact time) makes its degradation difficult (Mazzeo et al., 2010).

Microorganisms are the only entities in the biosphere with the ability to exploit various organic/inorganic compounds for their growth. They are able to inhabit various ecological niches and to pursue unusual metabolic and physiological activities (Timmis et al., 1994). We propose that NIP and 5-NBZ be reduced under anaerobic conditions to corresponding amines (Nishino and Spain, 2002; Zhang and Bennett, 2005; Kulkarni, and Chaudhari, 2007).

3.2. Volatile fatty acid production

To compensate the accumulation of H₂, the rumen microbial ecosystem often disposes of excess reducing equivalents by increasing the production of more reduced volatile fatty acids (Van Nevel and Demeyer, 1996).

The results of the fermentation analyses indicate that the production of VFA in the *in vitro* ruminal cultures has been modified by the addition of nitrocompounds, and that these alterations have varied between the concentrations tested (Table 2). It is possible that organic nitrocompounds reduce methane production and redirect reducing equivalents to butyrate and propionate production (Zhenming et al., 2012).

Compared to the control cultures, total VFA was significantly increased by NIP at 2 μM, but not at 8 and 12 μM. However, the lack of effect on total VFA concentration at both tested doses suggests that fermentation was not compromised by majority of compounds (Martínez-Fernández et al., 2014). Acetate was reduced by 2, 8 and 12 μM 5-NBZ, but not affected by addition of others nitrocompounds.

Table 1
Effects of nitro-compounds on fermentation characteristics after 24h batch rumen microorganisms culture.

Item	Compounds	Dose (μM)				SEM	p value
		0	2	8	12		
Total gas production (ml/g DM)	NIP	321 ^a	327 ^a	275 ^{ab}	226 ^b	3.39	0.009
	5-NBZ	321	320	305	284	3.21	0.546
	ABLE244	321	327	321	321	3.25	0.995
	ABLE245	321	331	323	343	2.60	0.827
CH ₄ (ml/ml)	NIP	0.181 ^a	0.183 ^a	0.122 ^{ab}	0.062 ^b	0.01	0.002
	5-NBZ	0.181 ^a	0.158 ^a	0.139 ^{ab}	0.121 ^b	0.01	0.031
	ABLE244	0.181	0.156	0.167	0.156	0.01	0.469
	ABLE245	0.181	0.158	0.162	0.177	0.01	0.954
CH ₄ (ml/gDM)	NIP	58.1 ^a	59.8 ^a	33.5 ^{ab}	14.0 ^b	1.36	0.004
	5-NBZ	58.1 ^a	50.5 ^a	42.3 ^{ab}	34.3 ^b	1.21	0.050
	ABLE244	58.1	51.0	53.6	50.0	1.22	0.870
	ABLE245	58.1	52.2	52.3	60.7	1.25	0.822

NIP, Nitrophenol; 5-NBZ, 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 and ABLE 245, synthesized nitrocompounds.

^{a,b}, ^{ab}Values within columns with unlike superscripts differ ($P < 0.05$).

Table 2
Effects of nitrocompounds on volatile fatty acid (VFA) after 24 h batch rumen microorganisms' culture.

Item	Compounds	Dose (μM)				SEM	p value
		0	2	8	12		
Total	NIP	102 ^{ab}	138 ^a	99.1 ^{ab}	83.4 ^b	5.53	0.087
VFA(mM)	5-NBZ	102	119	105	96.3	4.70	0.461
	ABLE244	102	110	104	102	2.66	0.810
	ABLE245	102	113	104	102	2.85	0.729
Acetate (%)	NIP	62.3	62.0	59.9	60.5	0.66	0.253
	5-NBZ	62.3 ^a	61.3 ^a	58.8 ^{ab}	57.7 ^b	0.49	0.006
	ABLE244	62.3	61.5	61.8	61.1	0.36	0.352
	ABLE245	62.3	61.6	62.1	61.8	0.44	0.853
Propionate (%)	NIP	17.8 ^a	17.6 ^a	19.9 ^{ab}	21.1 ^b	0.52	0.030
	5-NBZ	17.8 ^a	18.6 ^{ab}	21.3 ^{ab}	22.8 ^b	0.43	0.002
	ABLE244	17.8	18.0	18.1	18.5	0.25	0.359
	ABLE245	17.8	18.2	18.0	18.1	0.26	0.722
Isobutyrate (%)	NIP	1.66 ^{ab}	1.76 ^a	1.56 ^{ab}	1.20 ^b	0.06	0.024
	5-NBZ	1.66	1.76	1.56	1.70	0.05	0.829
	ABLE244	1.66	1.70	1.70	1.80	0.06	0.478
	ABLE245	1.66	1.63	1.70	1.73	0.06	0.648
Butyrate (%)	NIP	13.1	13.3	13.9	13.8	0.30	0.326
	5-NBZ	13.1	13.2	13.6	13.2	0.32	0.839
	ABLE244	13.1	13.5	13.4	13.5	0.22	0.573
	ABLE245	13.1	13.4	13.4	13.3	0.22	0.802
Isovalerate (%)	NIP	3.20 ^a	3.36 ^{ab}	3.20 ^a	2.46 ^b	0.09	0.027
	5-NBZ	3.20	3.20	2.96	3.00	0.08	0.322
	ABLE244	3.20	3.40	3.20	3.30	0.10	0.921
	ABLE245	3.20	3.30	3.10	3.20	0.10	0.843
Valerate (%)	NIP	1.93 ^a	1.86 ^{ab}	1.36 ^{ab}	0.70 ^b	0.07	0.000
	5-NBZ	1.93 ^a	1.76 ^{ab}	1.66 ^b	1.56 ^b	0.02	0.001
	ABLE244	1.93 ^a	1.80 ^{ab}	1.73 ^b	1.70 ^b	0.02	0.015
	ABLE245	1.93 ^a	1.73 ^a	1.56 ^b	1.66 ^{ab}	0.03	0.018
Acetate: propionate	NIP	3.50	3.52	2.99	2.90	0.12	0.065
	5-NBZ	3.50 ^a	3.30 ^{ab}	3.03 ^{ab}	2.80 ^b	0.10	0.039
	ABLE244	3.50	3.41	3.42	3.30	0.06	0.356
	ABLE245	3.50	3.38	3.45	3.41	0.07	0.783

NIP, Nitrophenol; 5-NBZ, 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 and ABLE 245, synthesized nitrocompounds.

^{a,b} Values within columns with unlike superscripts differ ($P < 0.05$).

The decrease in acetate concentrations by treatment with 5-NBZ could indicate a decrease in fiber degradation, as some fibrolytic microorganisms are more sensitive to high hydrogen partial pressure (Morgavi et al., 2010). At all the four 5-NBZ concentrations examined, 5-NBZ increased propionate concentrations, with 12 μM reducing the most, also, 12 μM of NIP was increased propionate but it was not affected with others nitrocompounds. As such, 5-NBZ and NIP remarkably reduced acetate: propionate ratio (Table 2). This explanation corroborates the finding of a previous *in vitro* study; increases in pH typically result in a shift of fermentation towards reduced VFAs (e.g. propionate and butyrate) in the rumen, leading to decreased acetate:propionate ratio (Zhenming et al., 2012). A reduction in the acetate: propionate ratio has been described as a common feature of several antimethanogens. This indicates a concurrent decrease of methane formation and redirection of hydrogen from methane to more propionic metabolic pathways (Martínez-Fernández et al., 2014). This discrepancy might be attributable to other factors, such as selective consumption of individual VFAs by nitrate-respiring bacteria. Future studies using defined mixtures of VFAs as the sole substrates can help to verify this surmise.

Analysis of butyrate at the end of the incubation in this study revealed no effect ($P > 0.05$) of nitro-treatment on his concentration. This is agreement to a previous study where butyrate was not affected by level of organic nitrocompound (eg. Nitroethane) (Brown et al., 2011), suggesting that electrons spared from CH_4 production were not redirected to production of butyrate (Gutierrez-Banuelos et al., 2008; Bozic et al., 2009).

Isobutyrate concentrations were reduced by 8 and 12 μM of

Nitrophenol, while not affected by other nitrocompounds. NIP reduced isovalerate at 12 μM ($P < 0.05$), but not at the other concentrations. On the contrary, valerate was markedly affected by all of the four treatments (NIP, 5-NBZ, ABLE244 and ABLE 245), with 12 μM of 5-NBZ reducing the most ($P = 0.001$), ABLE 244 and ABLE 245 reduced only valerate. These observations were contrary to observed by Anderson et al. (2010); using nitroethane, dimethyl-2-nitroglutarate and 2-nitro-methyl-propionate with 2.97 or 11.88 μM .

Indeed, of the four compounds tested, NIP and 5-NBZ reduced methane production by a large margin, and the first appeared to be the most potent. In the case of NIP treatment, reductions in methane production were accompanied by lower production of total VFAs. These results suggest that reduced fermentation activities are among the possible reasons for the reduced methane production in the rumen cultures, a finding that corroborates previous studies using different inhibitors (Beauchemin and McGinn, 2006; Holtshausen et al., 2009). The effect of antimethanogenic compounds on total and individual VFAs can be affected by other factors, such as the presence or absence of fermentable sugars, and the VFAs detected may be those present in the original ruminal fluid. So, the effects of antimethanogenic compounds on fermentation and ruminal digestion should be interpreted taking into account the substrates present in the cultures (Zhenming et al., 2011). In this study, there might be little fermentation or VFA production in the blank bottles without ground oats hay; due to the lack of fermentable sugars, and the VFAs detected might be those present in the original rumen fluid.

3.3. Total protozoa

Protozoa are the greatest producers of hydrogen in the rumen ecosystem (Szumacher-Stabel and Gieslak, 2012). The microbial mechanisms under CH_4 production involve interspecies H_2 transfer between H_2 -producers and methanogens (Wolin et al., 1997). The most studied example of this H_2 transfer is the symbiotic relationship between methanogens and protozoa (Newbold et al., 1995): methanogens are positioned on the protozoa to reduce the distance for diffusion of H_2 from the hydrogenosome. These methanogens associated with protozoa would be responsible for between 9% and 25% of methanogenesis in rumen fluid (Newbold et al., 1995).

The quantity of total protozoa affected by compounds is presented in Table 3. As observed with other parameters, the addition of ABLE 244 and ABLE 245 had no significant effects on the population of total protozoa. While 5-NBZ significantly ($P < 0.05$) suppressed the population of total protozoa. Previous studies have shown that the addition of nitrate in the ration of ruminants negatively affects the protozoa population (Guyader et al., 2015). The inhibition of methanogenesis is expected to increase the partial pressure of H_2 , potentially leading to an inhibition of H_2 -producing microorganisms such as *Ruminococci*, protozoa, and fungi (Martínez-Fernández et al., 2014).

Table 3
Effects of nitro-compounds on total protozoa counts (log10) after 24 h batch rumen microorganisms culture.

Compounds	Dose μM				SEM	p value
	0	2	8	12		
NIP	8.44 ^a	8.41 ^a	8.30 ^{ab}	8.18 ^b	0.06	0.179
5-NBZ	8.44 ^a	8.41 ^a	8.47 ^a	8.10 ^b	0.03	0.017
ABLE244	8.44	8.40	8.56	8.39	0.06	0.614
ABLE245	8.44	8.23	8.29	8.41	0.04	0.983

NIP, Nitrophenol; 5-NBZ, 5-Nitrobenzimidazol; ABLE 244 and ABLE 245, synthesized nitrocompounds.

^{a,b} Values within columns with unlike superscripts differ ($P < 0.05$).

4. Conclusion

Results from the present study confirm the CH₄-inhibiting activity of Nitrophenol and 5-Nitrobenzimidazol. The reduction in CH₄ emissions observed in this trial using 5-NBZ did not cause a rumen dysfunction.

The two newly tested compounds, ABLE 244 or ABLE 245 did not have CH₄-inhibiting activity and we hypothesize that these long chain nitrocompounds are not easily degradable by the ruminal flora. However, those new synthetic compounds seem have no adverse effects on rumen microbial fermentation. Further studies on longer-term fermentation (over 24 h) are needed to elucidate the need for additional time for microorganism to adapt to these compounds.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Elisabeth JIMENEZ and Ricardo GARCÍA TREJO from (EEZ, CSIC, Granada, Spain) for their technical assistance. We also thank the contributions of the staff members of the Structural Molecular and Environmental Chemistry Research Unit (CHEMS), University-Constantine, Algeria.

References

- Anderson, R.C., Rasmussen, M.A., 1998. Use of a novel nitrotoxin-metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresour. Technol.* 64, 89–95.
- Anderson, R.C., Callaway, T.R., Van Kessel, J.S., Jung, Y.S., Edrington, T.S., Nisbet, D.J., 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *J. Bioresour. Technol.* 90, 59–63.
- Anderson, R.C., Carstens, E., Miller, R.K., Callaway, T.R., Schultz, C.L., Edrington, T.S., Harvey, R.B., Nisbet, D.J., 2006. Effect of oral nitroethane and 2-nitropropanol administration on methane-producing activity and volatile fatty acid production in the ovine rumen. *J. Bioresour. Technol.* 97, 2421–2426.
- Anderson, R.C., Nathan, A.K., Thaddeus, B.S., Todd, R.C., Edrington, Thomas S., Harvey, Roger B., Yong, S.J., Nisbet, David J., 2008. Effects of select nitrocompounds on *in vitro* ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *J. Bioresour. Technol.* 99, 8655–8661.
- Anderson, R.C., Janice, K.H., David, J.S., Thaddeus, B.S., Nathan, A.K., Todd, R.C., Thomas, S.E., Roger, B.H., David, J.N., 2010. Effect of nitroethane, dimethyl-2-nitroglutarate and 2-nitro methyl-propionate on ruminal methane production and hydrogen balance *in vitro*. *J. Bioresour. Technol.* 101, 5345–5349.
- Arco-Pérez, A., Ramos-Morales, E., Yáñez-Ruiz, D.R., Abecia, L., Martín-García, A.I., 2017. Nutritive evaluation and milk quality of including of tomato or olive by-products silages with sunflower oil in the diet of dairy goats. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 232, 57–70.
- Ates-Alagoz, Z., 2016. Antimicrobial activities of 1-H-benzimidazole-based molecules. *J. Curr. Top. Med. Chem.* 16, 2953–2962.
- Beauchemin, K.A., Mc Ginn, S.M., 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84, 1489–1496.
- Bodelier Paul, L.E., Laanbroek, Hendrikus J., 2004. Nitrogen as a regulatory factor of methane oxidation in soils and sediments. *J. FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 265–277.
- Bozic, A.K., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Ricke, S.C., Callaway, T.R., Yokoyama, M.T., Wang, J.K., Nisbet, D.J., 2009. Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Bioresour. Technol.* 100, 4017–4025.
- Brown, E.G., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Gutierrez-Bañuelos, H., McReynolds, J.L., Slay, L.J., Callaway, T.R., Nisbet, D.J., 2011. Effects of oral nitroethane administration on enteric methane emissions and ruminal fermentation in cattle. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 166, 275–281.
- Cruzen, P.J., 1995. The role of methane in atmospheric chemistry and climate. In: Engelhardt, W.V., Leonhard-Marek, S., Breves, S., Giesecke, D. (Eds.), *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction: Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology*. Ferdinand EnkeVerlag, Stuttgart, pp. 291–315.
- El-Gohary, N.S., Shaaban, M.I., 2017. Synthesis, antimicrobial, anti-quorum sensing and antitumor activities of new benzimidazole analogs. *Eur. J. Med. Chem.* 137, 439–449.
- Guangming, J., Keshab, R.S., Zhiguo, Y., 2013. Effects of nitrate dosing on methanogenic activity in a sulfide-producing sewer biofilm reactor. *J. Water Res.* 47, 1783–1792.
- Gutierrez-Bañuelos, H., Anderson, R.C., Carstens, G.E., Tedeschi, L.O., Pinchak, W.E., Cabrera-Diaz, E., Krueger, N.A., Callaway, T.R., Nisbet, D.J., 2008. Effects of nitroethane and monensin on ruminal fluid fermentation characteristics and nitrocompound-metabolizing bacterial populations. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4650–4658.
- Guyader, J., Eugène, M., Meunier, B., Doreau, M., Morgav, D.P., Silberberg, M., Rochette, Y., Gerard, C., Loncke, C., Martin, C., 2015. Additive effect between dietary linseed oil and nitrate as methane emission-reducer in cattle. *J. Anim. Sci.* 93, 3564–3577.
- Hariadi, B.T., Santoso, B., 2010. Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. *J. Sci. Food Agric.* 90, 456–461.
- Hilary, F., Angus, G., Laurence, J., Davey, L., Jones, 2012. Methane, carbon dioxide and nitrous oxide fluxes from a temperate salt marsh: grazing management does not alter global warming potential. *J. Estuar. Coast. Shelf Sci.* 113, 182–191.
- Holtshausen, L., Chaves, A.V., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., McAllister, T.A., Odongo, N.E., Cheeke, P.R., Benchaar, C., 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 2809–2821.
- IPCC, 2001. The scientific basis. Contribution of working group I to the third. In: Metz, B., Davidson, O.R., Bosch, P.R., Dave, R., Meyer, L.A. (Eds.), *Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Kou-San, J., Rebecca, E.P., 2010. Nitroaromatic compounds, from Synthesis to biodegradation. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 250–272.
- Krishnamoorthy, U., Steingass, H., Menke, K.H., 1991. Preliminary observations on the relationship between gas production and microbial protein synthesis *in vitro*. *Arch. Tierernähr.* 41, 521–526.
- Kulkarni, M., Chaudhari, A., 2007. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *J. Environ. Manag.* 85, 496–512.
- Lamera, E., Bouacida, S., Marc, L.B., Bouaziz, Z., Bouraiou, A., 2017. Sequential MCR/Fisher indolization strategy for the construction of polycyclic carbazole derivatives. *J. Tetrahedron Lett.* 58, 1305–1307.
- Lassey, K.R., 2007. Livestock methane emission: from the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. *J. Agric. For. Meteorol.* 142, 120–132.
- Martínez-Fernández, G., Abecia, L., Arco, A., Cantalapedra-Hijar, G., Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E., Kindermann, M., Duval, S., Yáñez-Ruiz, D.R., 2014. Effects of ethyl-3-nitrooxy propionate and 3-nitrooxypropanol on ruminal fermentation, microbial abundance, and methane emissions in sheep. *J. Dairy Sci.* 97, 3790–3799.
- Mazzeo, D.E.C., Levy, C.E., de Angelis, D., Marin-Morales, M.A., 2010. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *J. Sci. Total Environ.* 408, 4334–4340.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *J. Anim. Res. Dev.* 28, 7–55.
- Miller, T.L., 1995. The ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. In: Engelhardt, W.V., Leonhard-Marek, S., Breves, G., Giesecke, D. (Eds.), *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. Ferdinand Enke Verlag, Berlin, pp. 317–331.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *J. Anim.* 4 (7), 1024–1036.
- Newbold, C.J., Lassalas, B., Jouany, J.P., 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *J. Lett. Appl. Microbiol.* 21, 230–234.
- Nishino, S.F., Spain, J.C., 2002. Biodegradation, transformation and bioremediation of nitroaromatic compounds. In: Hurst, C.J., Crawford, R.L., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D. (Eds.), *Manual of Envir. Microbiol*, second ed. ASM Press, Washington, DC, pp. 987–996.
- Patra, A., Park, T., Kim, M., Yu, Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J. Anim. Sci. Technol.* 8, 13.
- Raphélis-Soissan, V., Nolan, J.V., Godwin, I.R., Newbold, J.R., Perdok, H.B., Hegarty, R.S., 2017. Paraffin-wax-coated nitrate salt inhibits short-term methane production in sheep and reduces the risk of nitrite toxicity. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 229, 57–64.
- Rodríguez, A., Ignacio, I., Guzmán, Á., Cecilia, C., José Luis, R., Mercedes, G., Hugo, C., 2011. Anaerobic biotransformation of nitro-compounds to amines by bovine rumen fluid. *J. Green Sustain. Chem.* 1, 47–53.
- Russell, J.B., Strobel, H.J., 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1–6.
- Saengkerdsud, S., Woo-Kyun, K., Anderson, R.C., Nisbet, D.J., Ricke, S.C., 2006. Effects of nitrocompounds and feedstuffs on *in vitro* methane production in chicken cecal contents and rumen fluid. *J. Anaerob.* 12, 85–92.
- Sar, C., Mwenya, B., Pen, B., Takaura, K., Morikawa, R., Tsujimoto, A., Kuwaki, K., Isogai, N., Shinzato, I., Asakura, Y., Toride, Y., Takahashi, J., 2005. Effect of ruminal administration of *Escherichia coli* wild type or a genetically modified strain with enhanced high nitrite reductase activity on methane emission and nitrate toxicity in nitrate-infused sheep. *Br. J. Nutr.* 94, 691–697.
- Sayyafi, M., Mozhdeh, S.H., Hamid, R.K., Bazgir, A., 2008. One-pot, three-component route to 2H-indazole [2,1-b] phthalazine-triones. *J. Tetrahedron* 64, 2375–2378.
- Smith, L.W., Hall, G.T., Kennedy, G.L., 1988. Acute and repeated dose inhalation toxicity of para-nitrophenol sodium salt in rats. *J. Drug. Chem. Toxicol.* 11, 319–327.
- Szumacher-Stabel, M., Cieslak, A., 2012. Dietary possibilities to mitigate rumen methane and ammonia production. In: Guoxiang Liu (Ed.), *Greenho. Gases, Capt., Utiliz. and Redu* 51. Intech, pp. 192–195.
- Tarayre, C., 2012. Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Ed. Univ. Eur. 116.
- Theodorou, M.K., Gascoyne, D.J., Akin, D.E., Hartley, R.D., 1987. Effect of phenolic acids and phenolics from plant cell walls on rumenlike fermentation in consecutive batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1046–1050.
- Timmis, K.N., Steffan, R.J., Unterman, R., 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Ann. Rev. Microbiol.* 48, 525–557.
- Van Nevel, C.J., Demeyer, D., 1996. Control of rumen methanogenesis. *J. Environ. Monit. Assess.* 42, 73–97.
- Wolin, M.J., Miller, T.L., Stewart, C.S., 1997. Microbe-microbe interactions. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic & Professional, New York, pp. 467–491.
- Yadav, S., Narasimhan, B., Kaur, H., 2016. Perspectives of benzimidazole derivatives as

- anticancer agents in the new era. *J. Anticancer Agents Med. Chem.* 16, 1403–1425.
- Yáñez-Ruiz, D.R., Martín-García, A.I., 2016. Non-cow milk production: the greenhouse gas emissions and climate change. In: Tsakalidou, Effie (Ed.), *Non-Bovine Milk and Milk Products*, pp. 15–38.
- Zervas, G., Tsiplakou, E., 2012. An assessment of GHG emissions from small ruminants in comparison with GHG emissions from large ruminants and monogastric livestock. *J. Atmos. Environ.* 49, 13–23.
- Zhang, C., Bennett, G.N., 2005. biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Appl. J. Environ. Microbiol.* 67, 600–618.
- Zhang, D.F., Yang, H.J., 2011. *In vitro* ruminal methanogenesis of a hay-rich substrate in response to different combination supplements of nitrocompounds; pyromelliticdiimide and 2-bromoethanesulphonate. *J. Anim. Feed Sci. Technol.* 163, 20–32.
- Zhenming, Z., Qing-xiang, M., Zhong-tang, Y., 2011. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* Ruminant cultures. *J. Appl. Environ. Microbiol.* 77, 2634–2639.
- Zhenming, Z., Zhong-tang, Y., Qing-xiang, M., 2012. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. *J. Bioresour. Technol.* 103, 173–179.

Diplôme : Doctorat en Science

Thème : Essai de la réduction de la production de méthane chez les ruminants via la manipulation du pool d'hydrogène : utilisation de nitrates et des nitrites

Résumé

La réduction des émissions de méthane liées à l'élevage est une préoccupation majeure qui nécessite l'implication des pouvoirs publics et des acteurs des filières animales à l'échelle mondiale.

L'objectif de ce travail de thèse était de tester le pouvoir antiméthanogène, *in vitro*, de cinq additifs nitreux et de proposer et évaluer de nouvelles stratégies alimentaires pour réduire les émissions de CH₄, en supposant que la manipulation de la production et de l'utilisation de H₂ permet une réduction plus importante des émissions de CH₄.

Nos travaux permettent de conclure que les nitrates ont le potentiel d'atténuer la production de méthane *in vitro* sans effets indésirables notables sur la fermentation ruminale et sur la flore ruminale. A 12µM, les nitrates ont engendré une diminution de 80% de la production de CH₄. Alors que, la dose de 8µM baisse 53% de la production de CH₄.

L'effet des nitrates est plutôt lié à son action sur le pool d'hydrogène et sa voie compétitive à la méthanogenèse qui permet de réduire la part d'hydrogène disponible pour les méthanogènes.

Ce travail de thèse a aussi mis en évidence l'activité réductrice de méthane des additifs aromatiques ayant des groupements nitrites (le nitrophénol et le 5-nitrobenzimidazol) (une réduction de 60% de la concentration du méthane produit), cette réduction du méthane est due à l'effet anti-protozoaire (jusqu'à 52%) et/ ou un changement de la diversité des archées méthanogènes des nitrites.

Les produits de synthèse ne montrent aucune réduction de méthane *in vitro*, à cause de manque de l'adaptation de la flore ruminale à ces produits à chaîne carbonique longue (ce qui rend leur dégradation difficile) ; et/ ou leur l'insolubilité dans le milieu de culture.

Mots clés : Réduction de méthane, ruminants, Nitrate, Nitrite, pool d'hydrogène

Promoteur:	Pr. ARHAB Rabah	Professeur, Univ. Larbi Ben M'hidi, OEB
Président	Pr. ZELLAGUI Amar	Professeur, Univ. Larbi Ben M'hidi, OEB
Examineurs	Pr. AYACHI Ammar	Professeur, Univ. Elhaj Lakhdhar, Batna
	Pr. DJEBBAR-TINE Fouzia	Professeur, Univ. Larbi Tébéssi, Tebessa
	Pr. DARBOUCHE A.Elhak	Professeur, Univ. Abbes Laghrour, Khenchela
	Dr. GRAMA Borhane Samir	MCA, Univ. Larbi Ben M'hidi, OEB