

Méthodes de dénombrement des bactéries du rumen de mouton

Mohammed BENSALAH¹, Ahmed GAMMOUH¹, Gerard PRENSIER²,
Abdelmjid ZYAD¹ & Jacques BOHATIER²

(Reçu le 08/07/2003 ; Accepté le 17/05/2004)

طرق عد بكتيريا معدة الحيوانات المجترة

لدراسة وتتبع مختلف الأحياء الدقيقة المتواجدة بمعدة الحيوانات المجترة يجب تطوير مناهج وطرق خاصة. لهذا الهدف نقترح في هذا البحث طريقتان لمتابعة عد البكتيريا العامة وعدد أصناف معينة من البكتيريا المعروفة بتكيفها وتواجدها المكثف في هذا المجال البيئي. لمتابعة البكتيريا العامة، استعملنا ملون Acridine-orange الذي يلتصق بالأحماض النووية للخلايا سواء كانت حية أم مية. لمتابعة الأصناف المعينة الأكثر تواجد بمعدة الحيوانات المجترة، قمنا مسبقا بإنتاج عشر مضادات حيوية خاصة بكل صنف عن طريق تلقيح أرناب واستعمال هذه المضادات الحيوية المنتجة لتتبع أعداد كل صنف على حدة. لقد أظهرت النتائج أن استعمال المضادات مكن من رفع دقة التقنية في تتبع أعداد أصناف البكتيريا التي تتفاعل معها.

الكلمات المفتاحية: معدة الحيوانات - عد - بكتيريا - المضادات الحيوية.

Méthodes de dénombrement des bactéries du rumen de mouton

Afin de mieux comprendre l'écosystème rumen par l'étude de l'évolution du nombre des bactéries totales et celui de certaines flores spécifiques, deux techniques de quantification sur filtre sont proposées. (i) L'acridine orange est un fluorochrome qui se fixe sur les acides nucléiques de toutes les bactéries et permet de les colorer en vue de les dénombrer. Parallèlement, les cellules viables ont été dénombrées par culture en milieu solide pour comparaison. Les nombres obtenus par la technique de coloration ont été supérieurs à ceux des cellules viables d'une unité logarithmique, du fait que la première technique tient compte à la fois des cellules vivantes et mortes. (ii) L'immunofluorescence indirecte, basée sur des anticorps polyclonaux dirigés contre dix souches naturellement majoritaires du rumen de mouton, a été également utilisée pour le dénombrement de ces souches en fonction du temps. Les résultats obtenus montrent une bonne spécificité des anticorps et un suivi efficace des différentes souches utilisées.

Mots clés: Rumen de mouton - Dénombrement - Bactéries - Acridine orange - Anticorps polyclonaux - Immunofluorescence indirecte

Techniques for enumeration of sheep rumen bacteria

In order to understand the rumen microbial ecology, and to monitor the growth of microbial groups in the rumen, appropriate enumeration techniques are needed. In the present work, we developed two microscopic based techniques to enumerate the total bacteria and specific species of the rumen: i) Enumeration of total bacteria after staining using acridine orange as a dye. The viable count was carried out concomitantly on a general medium for comparison purpose. The results obtained by the newly developed technique were a 1-log unit higher than the viable cell counts due to the fact that the former technique includes the dead cells as well. ii) Indirect immunofluorescent technique: ten polyclonal antibodies against ten specific strains known to predominate in the rumen system were produced in rabbit and used to monitor the growth as function of time of these strains in the rumen. The results indicated good specificities and accurate follow-up of the strains number.

Key words: Rumen - Enumeration - Bacteria - Acridine orange - Polyclonal antibodies - Indirect immunofluorescence

¹ Laboratoire d'Immunologie, Biochimie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques de Beni Mellal, B.P. 523, 23000, Beni Mellal, Maroc

² Laboratoire de Protistologie, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, Complexe Scientifique des Cézeaux, 63177, Aubiere Cedex, France

^o Auteur correspondant; e-mail: bensalah62@yahoo.fr ; Tel: 212 23 48 51 12/82/22; Fax: +212 23 48 52 01

INTRODUCTION

Le rumen est composée d'une microflore abondante et complexe comprenant des bactéries, des protozoaires et des champignons. Chez les ruminants, il joue un rôle essentiel dans la digestion des particules végétales contenues dans leur ration alimentaire (cellulose, hémi-cellulose, pectine) et dans l'utilisation de l'ammoniaque pour les transformer respectivement en acides gras volatils et en protéines microbiennes fournissant ainsi de l'énergie et des acides aminés à l'hôte qui les héberge (Gouet & Thivend, 1985 ; Fonty & Forano, 1999).

La compréhension du fonctionnement de cet écosystème, afin d'améliorer ses performances métaboliques, passe, entre autres, par un affinage des techniques du suivi de ses populations microbiennes.

Plusieurs techniques de dénombrement ont été développées pour déterminer l'importance relative des genres ou des espèces microbiennes dans différents écosystèmes. Certaines utilisent des colorants qui se fixent sur les acides nucléiques de toutes les bactéries mortes ou vivantes et permettent de les dénombrer à un instant donné (Loberg, 1982; Bergstrom *et al.*, 1986; Delatre, 1986). D'autres consistent à dénombrer les cellules viables après culture en milieux solides ou liquides (Bryan & Burkey, 1953; Bryan & Robinson, 1968; Dehority & Grubb, 1976; Fonty, 1984).

Les techniques de coloration actuellement disponibles nécessitent d'être plus affinées et adaptées pour réaliser le suivi ou le dénombrement d'espèces voire de souches bactériennes déterminées. En effet, les méthodes de culture sont souvent limitées en raison de la nature complexe de la microflore du rumen, des exigences nutritionnelles qui diffèrent d'une espèce à l'autre et de la nécessité de réaliser des conditions d'anaérobiose très poussées.

Ces techniques ne permettent pas le dénombrement de souches ou d'espèces spécifiques, en particulier, celles qui sont réfractaires aux milieux de culture généraux non sélectifs.

De plus, ces dénombrements en culture sont lourds à réaliser et difficilement applicables à des cinétiques comportant plusieurs prélèvements sur une courte durée.

L'objectif du présent travail est d'affiner une technique de dénombrement bactérien sur filtre après coloration des cellules à l'acridine orange et de développer une nouvelle technique de dénombrement sur filtre par immunofluorescence indirecte qui soit spécifique à certaines souches bactériennes permettant ainsi leur suivi *in vivo* parmi la microflore complexe du rumen.

MATÉRIELS & MÉTHODES

1. Prélèvement du jus de rumen

Un mouton castré de race texel, pesant 73 kg et porteur d'une canule permettant l'accès au contenu de son rumen, a été utilisé. Environ 250 ml de jus de rumen sont prélevés, à travers la canule, à l'aide d'un tube muni d'une poire en caoutchouc. Le liquide est filtré sur grille métallique (maille 1 mm²) pour éliminer les grosses particules végétales (Jouany, 1978). Les prélèvements sont réalisés à H₀ juste avant la distribution du repas, puis à 3 heures, 6 h, 12 h, 18 h et 24 h après le repas. La ration alimentaire journalière distribuée aux moutons en une seule fois est composée de 700 g de luzerne déshydratée, 300 g d'orge agglomérée, 100 g de foin et 50 g de paille de blé.

2. Dénombrement des bactéries dans le jus de rumen

2.1. Bactéries totales dénombrées à l'aide de l'acridine orange

Un échantillon de 1 ml du jus de rumen préalablement filtré sur grille métallique est mélangé avec du formol (40% formaldéhyde et 10% méthanol, densité 1,09) en solution (4% v/v) dans un tampon PBS (Phosphate Buffer Saline: NaCl 8g/l; Na₂HPO₄ 12 H₂O 3,6g/l; NaH₂PO₄ 0,4g/l; pH 7,2). Le mélange est laissé au repos à température ambiante pendant au moins une heure puis centrifugé à 4000 x g pendant 20 minutes. Il est ensuite lavé trois fois dans le tampon PBS, puis centrifugé à 4000 x g et récupéré dans 2 ml de tampon pour réaliser des dilutions décimales dans de l'eau distillée stérile. Un volume de 1 ml de chaque dilution est mélangé avec 1 ml d'une solution d'acridine orange 1 % (p/v) stérilisée par filtration à travers un filtre acridine Gelman (0,22 µm de porosité). Le mélange est ensuite maintenu à température ambiante à l'obscurité pendant 10 min pour permettre la fixation du colorant sur les cellules bactériennes. Le mélange

acridine orange - bactéries est alors filtré à l'aide d'un dispositif de filtration constitué d'une fiole à vide sur laquelle est monté un support à filtres amovibles en verre fritté, surmonté d'une colonne de 10 ml. Un filtre stérile en polycarbonate nucléopore (DMF réf. 110-656, diamètre 25 mm, porosité 25 µm et traité à Irgalan bleu) est placé sur le support préalablement humecté avec quelques gouttes de surfactant (triton X-100 à 0.5%). Afin de diminuer l'hydrophobicité du filtre et d'assurer une répartition homogène des bactéries sur sa surface, il est également humecté avec quelques gouttes de surfactant. L'ensemble support-filtre est ensuite placé sur la fiole et immobilisé sous la colonne par un système de pinces. Les 2 ml du mélange acridine orange-échantillon sont versés dans la colonne et aspirés sous vide. La colonne est ensuite rincée avec de l'eau stérile et les filtres sont recueillis à l'aide d'une pince et placés dans une boîte de Pétri entourée de papier aluminium. Les filtres sont séchés puis montés entre lame et lamelle et observés, en épifluorescence au microscope photonique (Olympus BH2), à l'aide de l'objectif à immersion (x 100). Après vérification de l'homogénéité de la distribution bactérienne sur le filtre (on compte généralement les dilutions qui donnent un nombre compris entre 20 et 30 bactéries par champ oculaire). Dix champs oculaires de surface déterminée sont comptés au hasard. Le nombre de bactéries par millilitre d'échantillon (N) est calculé selon la formule suivante :

$$N = n \times S \cdot d/s$$

n = Moyenne de bactéries comptées dans 10 champs oculaires

S = Surface filtrante : 346 mm²

s = Surface d'un champ oculaire : 16,48.10⁻³ mm²

d = Dilution réalisée sur l'échantillon

N = Nombre de bactéries/ml

La concentration finale est la moyenne arithmétique de deux déterminations.

2.2. Bactéries dénombrées par immunofluorescence indirecte

2.2.1. Souches utilisées

Les souches bactériennes utilisées sont : *Ruminococcus albus* 7; *R. flavefaciens* 007; *Fibrobacter succinogenes* S85; *Streptococcus bovis* FD10; *Methanobrevibacter ruminantium* Mr; *Selenomonas ruminantium* WPL; *Eubacterium*

limosum 20543; *E. cellulossolvans* C; *Butyrivibrio fibrisolvans* D1; *Lachnospira multiparus* LM.

Ces souches proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie de Theix (France). Elles étaient conservées à -70°C. Avant chaque utilisation, elles sont repiquées sur milieu complet pour bactéries du rumen puis incubées à 39°C pendant 48 heures (Hungate, 1969; Bryan & Burkey, 1953; Bryan & Robinson, 1968; Dehority & Grubb, 1976).

2.2.2. Obtention d'anticorps polyclonaux

Pour chaque souche bactérienne étudiée, un sérum polyclonal de lapin a été préparé. Pour ce faire, 10 ml d'une culture jeune (16 à 18 h) pure sont fixés dans le formol à 4% en PBS (pH 7,2) pendant 1 h puis centrifugés à 4000 x g pendant 20 minutes. Le culot est ensuite lavé 3 fois dans le tampon PBS puis resuspendu dans un volume de 0,5 ml de tampon auquel est ajouté 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet.

Le mélange est ensuite injecté à un lapin suivant la méthode de Conway de Macario *et al.* (1982) qui consiste à faire des injections dans le coussinet plantaire. Un prélèvement sanguin témoin sur les lapins est réalisé avant immunisation pour préparer un sérum pré-immun. Après 15 jours, un premier rappel composé de 0,5 ml du culot bactérien préparé comme précédemment est mélangé avec 0,5 ml d'adjuvant incomplet de Freund et injecté par voie intramusculaire dans le gras de la cuisse du lapin. Un deuxième rappel est fait de la même façon quinze jours plus tard. Après une autre quinzaine de jours, un prélèvement sanguin de 30 à 50 ml, effectué au niveau de l'artère centrale de l'oreille, est mis à coaguler à 37°C pendant 1 heure, puis stocké à 4°C pendant 12 à 16 h. Le sérum est alors récupéré et centrifugé à 4000 x g pour éliminer les globules rouges restants, puis aliquoté en 1 ml et mis à congeler à -80°C. Le sérum pré-immun du lapin avant immunisation a été préparé de la même façon pour servir de témoin négatif.

2.2.3. Caractérisation des sérums

Les sérums produits sont testés sur les différentes souches bactériennes ayant servi aux différentes immunisations (réactions croisées) et pour la détermination de la dilution donnant le maximum de fluorescence pour chaque sérum. Ces caractérisations ont été effectuées par

immunofluorescence indirecte sur lame. L'anticorps primaire produit a été mis au contact de la bactérie ayant servi à sa production et le complexe (anticorps-bactérie) formé est ensuite visualisé par excitation aux rayons ultra-violet (435 nm) après addition d'un anticorps anti-IgG de lapin (GAR-Whole molécule FITC, Sigma Co, USA) marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (ICTF). Par exemple, pour la détermination des réactions croisées, une souche bactérienne (2 µl) est déposée dans chaque puits d'une lame contenant 10 puits de 6 mm de diamètre chacun (Biomérieux, France). Chaque souche est traitée avec les 10 sérums. Pour la détermination de la dilution qui donne le maximum de fluorescence, on opère de la même façon sauf que, dans ce cas, les puits contenant la souche sont traités avec les différentes dilutions correspondant à son sérum.

2.2.4. Dénombrement par immunofluorescence indirecte

Une quantité précise de bactéries (2 ml), provenant aussi bien des cultures pures que de l'échantillon de jus de rumen, est formolée pendant 1 heure puis centrifugée à 4000 x g. Le culot récupéré est lavé 3 fois dans du PBS puis récupéré dans un volume de 2 ml de PBS et homogénéisé à l'aide d'une seringue stérile de 10 ml.

Un volume de 2 µl de la bactérie en culture ou du jus de rumen est déposé dans chacun des puits d'une lame histologique comportant 10 cavités de 6 mm de diamètre chacune (Biomérieux, France).

Après séchage par passage au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, chaque puits reçoit 20 µl d'une solution de sérum de chèvre pour saturer les sites non spécifiques. Les lames sont ensuite placées à dans une chambre humide à 37°C. À la sortie de l'étuve, le sérum de chèvre est aspiré à l'aide d'un système aiguille-seringue relié à une trompe à vide. Les puits sont lavés 3 fois avec du tampon PBS (le lavage consiste à déposer 20 µl de tampon PBS pendant quelques secondes et l'aspirer à l'aide du système aiguille-seringue).

Les puits reçoivent ensuite 20 µl de l'anticorps primaire produit par le lapin, dilué au 1/100^{ème} et les lames sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Après élimination de l'anticorps primaire, trois lavages successifs sont effectués, puis 20 µl d'un second anticorps anti-IgG de lapin marqué à l'ITCF dilué au 1/100^{ème} sont ajoutés. Les lames

sont ensuite incubées 1 heure à 37°C. Après trois lavages dans le tampon PBS, le montage final se fait entre lame et lamelle préparées dans du liquide de Fluoprep (Biomérieux, France) puis observés en épifluorescence à l'aide d'un microscope Olympus à l'objectif à immersion (x100). Cette opération permet également de déterminer la densité approximative de la bactérie dans le jus de rumen pour un dénombrement ultérieur sur filtre.

Pour les comptages sur filtre, le principe est le même que pour la technique sur lame. Dans ce cas la réaction antigène-anticorps est réalisée dans des tubes Eppendorf. Les lavages du matériel biologique se font par centrifugation.

Un volume de 1 ml d'une dilution appropriée, estimée sur lame, est mélangé avec 20 µl d'une dilution de sérum de chèvre pour saturer les sites non spécifiques dans un tube Eppendorf puis incubé à 37°C pendant 1 heure. Le mélange subit trois cycles de centrifugations/lavage à 8000 x g pendant 20 min. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 ml de tampon PBS auquel on ajoute 20 µl de l'anticorps primaire produit chez le lapin et incubé à 37°C pendant une heure. Trois cycles de lavage sont également effectués, puis le complexe bactérie-anticorps primaire est mélangé avec 20 µl d'anticorps anti-IgG de lapin marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (GAR-Whole molécule FITC, Sigma Co, USA). Ce mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C. Trois lavages sont réalisés et le culot est re-suspendu dans un volume final de 1 ml dans du tampon PBS, puis filtré et dénombré de la même manière que pour la technique à l'acridine orange.

2.3. Dénombrement en milieux solides

Les échantillons dénombrés par coloration à l'acridine orange ont été également quantifiés par culture en milieu solide selon la technique des dilutions pour comparaison. La composition du milieu de base utilisé est la suivante: jus de rumen (400 ml); bacto tryptone (5 g); glucose (2 g); amidon soluble (4 g); cellobiose (2 g); rézasurine à 0,01% (1ml); cystéine hydrochlorure (0,5 g); carbonate de sodium (4,0 g); agar bactériologique (20 g); cysteine HCl (0,5 g). À ce milieu de base, ont été ajoutés 75 ml d'une solution minérale 1 (SMN1: KH₂PO₄ 0,6%) et 75 ml d'une solution minérale 2 (SMN2: KH₂PO₄ 0,6%; NH₄SO₄ 1,2%; NaCl 1,2%; MgSO₄ 0,12% et CaCl₂ 0,12%).

Le milieu complet stérilisé est réparti dans des tubes de Hungate sous atmosphère enrichie en CO₂ à raison de 9 ml par tube pour les milieux de dilutions (SMN1: 75 ml; SMN2: 75 ml; résazurine 0,01%: 1 ml; carbonate de sodium 4,0 g; cystéine HCl 0,5 g; eau distillée: qsp l) et de 4 à 5 ml par tube pour le milieu gélosé. Ce dernier est ensemencé par un ml de la dilution préparée à partir de l'échantillon de jus de rumen utilisé pour la comparaison des deux techniques de dénombrement des bactéries totales (acridine orange et dénombrement sur milieu solide). L'incubation de ces milieux gélosés a lieu à 39°C pendant une semaine (Hungate, 1969; Bryan & Robinson, 1968; Dehority & Grubb, 1976; Fonty, 1984).

RÉSULTATS & DISCUSSION

1. Caractérisation des sérums produits

Les résultats des tests préliminaires visant à exclure les faux résultats positifs montrent que les

sérums prélevés avant l'immunisation ne donnent pas de réactions avec les différentes souches utilisées. Chaque anticorps est spécifique à la souche ayant servi à sa production.

Par ailleurs, les anticorps anti-IgG de lapin n'ont pas réagi avec les différentes souches utilisées.

Pour la détermination de la dilution donnant le maximum de fluorescence, chaque souche bactérienne est testée avec son anticorps spécifique aux dilutions suivantes : 1/10; 1/50; 1/100; 1/200; 1/800; 1/1600; 1/3200. Les résultats montrent que le sérum obtenu pour chaque souche contient suffisamment d'anticorps: ils sont, pour la plupart, positifs au-delà de la dilution 1/800 (Tableau 1).

L'étude des réactions croisées montre peu ou pas de réactions croisées entre les différents sérums (Tableau 2). De légères réactions croisées entre *R. albus* (7) et *S. bovis* (FD 10) ou entre

Tableau 1. Détermination de la dilution donnant le maximum de fluorescence

Souches bactériennes	Dilutions de sérums							
	1/10	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
<i>Fibrobacter succinogenes</i> S85	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
<i>Ruminococcus albus</i> 7 (Ra)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007 (Rf)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
<i>E. cellulosolvens</i> 5 (Ec)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
<i>Eubacterium limosum</i> 20543 (EL)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> D1 (Bf)	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
<i>Streptococcus bovis</i> FD10 (Sb)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> (Mr)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
<i>Selenomonas ruminantium</i> (WPL)	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
<i>Lachnospira multiparus</i> (LM)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-

+ : Fluorescence faible; ++ : Fluorescence intermédiaire; +++ : Fluorescence maximale; - : Absence de fluorescence

Tableau 2. Réactions croisées entre les sérums de lapins immunisés avec une culture pure de différentes souches du rumen

Souches	Sérums									
	Rf 007	Ra7	FsS85	EL20543	Ec5	SbFD10	LM	Mr	WPL	Bf D1
<i>Ruminococcus flavefaciens</i> 007 (Rf)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ruminococcus albus</i> 7 (Ra)	-	+	-	-	-	-/+	-	-	-	-
<i>Fibrobacter succinogènes</i> S85 (Fs)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium limosum</i> 20543 (EL)	-	-	-	+	-	-	-	-	-/+	-
<i>E. cellulosolvens</i> 5 (Ec)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus bovis</i> FD10 (Sb)	-	-/+	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Lachnospira multiparus</i> (LM)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> (Mr)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Selenomonas ruminantium</i> (WPL)	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+	-
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> D1 (Bf)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ : Fluorescence maximale; -/+ : Fluorescence faible; - : Absence de fluorescence

S. ruminantium (WPL) et *E. limosum* (20543) ont été, néanmoins, remarquées bien qu'assez faibles. La fluorescence qui en résultait disparaissait assez vite par rapport à une fluorescence spécifique.

On remarque également l'absence de réactions croisées intra-géniques entre *R. albus* (7) et *R. flavefaciens* (007) et entre *E. limosum* (souche 20543) et *E. celluloslvens* (5).

Ces deux exemples démontrent la bonne spécificité des anticorps produits, pour les souches testées. Théoriquement, bien que ceci n'exclut pas la possibilité de réactions croisées avec d'autres souches du rumen non testées dans ce travail, l'observation de plusieurs échantillons de jus de rumen traités avec les sérums a montré que ces réactions sont très limitées et identifiables grâce à des critères morphologiques.

2. Validation des techniques de comptage

Les dénombrements spécifiques n'ont pas été réalisés sur lames, mais sur filtre pour des raisons de pertes. En effet, une souche en culture pure d'*E. limosum* (20543) a été dénombrée à la fois sur lame et sur filtre. Les résultats ont montré des pertes considérables pouvant aller jusqu'à 50% en raison des décolllements de bactéries lors des lavages (Tableau 3).

Pour cela, un milieu de culture complet pour bactéries du rumen (Bryan & Robinson, 1968; Dehority & Grubb, 1976; Bryan & Burkey, 1953) a été inoculé avec 1 ml d'une culture jeune d'*E. limosum* 20543 (16 à 18 heures) et incubés à 39°C.

Tableau 3. Dénombrement d' *E. Limosum* 20543 sur lame et sur filtre

Temps (en h)	Dénombrement <i>E. Limosum</i> 20543 (bactérie/ml)		Pourcentage de perte sur lame
	sur lame	sur filtre	
H ₀	1,7.10 ⁵	3,5.10 ⁵	51
H ₂	2,4.10 ⁵	5,3.10 ⁵	55
H ₄	12.10 ⁵	27.10 ⁵	55
H ₆	46.10 ⁵	95.10 ⁵	51
H ₈	140.10 ⁵	245.10 ⁵	43
H ₁₀	187.10 ⁵	325.10 ⁵	42
Moyenne des pertes sur lame			49,5

Des prélèvements ont été effectués au temps H₀ (juste après l'inoculation), H₂, H₄, H₆, H₈, H₁₀. Ces échantillons ont été dénombrés sur lame et sur filtre pour comparaison.

3. Suivi des bactéries totales

Les dénombrements des bactéries totales par coloration à l'acridine orange (Figure 1) donnent un nombre voisin de 10¹⁰ bactéries/ml contre 10⁹ bactéries/ml par culture en milieu solide

Ces valeurs sont proches de celles qui sont rapportées par plusieurs auteurs (Fonty & Forano, 1999; Krauz & Russell, 1999).

D'après la figure 2, l'évolution générale du nombre moyen de bactéries totales, obtenu aussi bien par microscopie qu'en culture, subit une légère diminution allant de H₀ (juste avant le repas) à 3 h après le repas. En effet, ce nombre passe de 1,2.10¹⁰ bactéries/ml à 7,7.10⁹ bactéries/ml dans le cas de la coloration à l'acridine orange et de 9,8.10⁸ bactéries/ml à 3,3.10⁸ bactéries/ml en culture. Une tendance à la stabilisation en fin de cinétique à 24 h est observée (9,4 10⁹ bactéries/ml pour l'acridine orange et 9,3 10⁸ bactéries/ml en culture.

Cette légère chute des bactéries dans le jus de rumen peut s'expliquer par la fixation d'un certain nombre parmi elles sur les particules végétales grâce à leur glycocalyx ou pili (Mosoni *et al.*, 1997; Forsberg *et al.*, 2000; Michalet-Doreau *et al.*, 2001; Rakotoarivonini *et al.*, 2002). Du coup, les bactéries peuvent être éliminées avec les grosses particules végétales lors des prélèvements du liquide ruminal.

L'attachement des bactéries sur les particules alimentaires dans les 15 minutes qui suivent la prise des repas a été démontré par Orpin (1980). Dans le même sens, Bryan & Robinson (1968) ont constaté que le nombre de bactéries dans la phase liquide ruminale atteint sa valeur minimale une heure après le repas. La stabilisation de ce nombre total de bactéries, dans le liquide ruminal, serait liée à une libération de sucre simple dans ce dernier par hydrolyse de la cellulose stimulant ainsi la croissance des bactéries fermentatives.

La figure 2 montre également qu'au cours du dénombrement, le nombre obtenu par la méthode microscopique à l'acridine orange a été significativement supérieur (p < 0.05) à celui qui a été obtenu par culture en milieu solide. Un tel

résultat est, en fait, prévisible et peut s'expliquer aisément par le fait que la méthode à l'acridine orange dénombre aussi bien les cellules viables que les cellules mortes.

Par contre, le dénombrement en milieu solide ne permet de quantifier que les cellules viables capables de former des colonies. Il apparaît donc clair que les dénombrements par coloration à l'acridine orange sont difficilement applicables à des études de contrôle de qualité des aliments qui nécessitent le comptage de bactéries viables.

Néanmoins, la technique par coloration à l'acridine orange offre une alternative avantageuse pour le suivi des bactéries anaérobies strictes du rumen en fonction des différents paramètres comme le régime alimentaire, l'effet d'un produit (ex. probiotiques) sur la population microbienne et l'étude des interactions microbiennes.

En effet, cette technique présente l'avantage d'être moins lourde à réaliser et plus rapide surtout pour les bactéries anaérobies du rumen dont la culture peut être compliquée et fastidieuse.

En outre, la fixation préalable des échantillons au formol, dans cette technique, permet de différer l'analyse microbiologique, surtout lorsque les échantillons doivent être transportés vers le laboratoire. Par contre, en culture, le dénombrement doit être fait aussitôt que possible après le prélèvement des échantillons.

4. Dénombrement des bactéries spécifiques

Les échantillons de jus de rumen ayant servi aux dénombrements de bactéries totales ont été également testés avec les différents sérums préparés. Les valeurs obtenues sont de l'ordre de 2.10^8 bactéries/ml pour *R. albus* 7 (Figure 3), de 3.10^6 bactéries/ml pour *E. limosum* (20543), de 8.10^5 bactéries/ml pour *F. succinogenes* (85) et de 3.10^5 bactéries/ml pour *Methanobrevibacter ruminantium* (Mr) et ce, pour toute la durée de la cinétique. Les six autres bactéries étudiées n'ont été détectées qu'en faible nombre.

Les souches bactériennes considérées comme majoritaires ne sont pas toutes présentes en grand nombre au même moment dans le rumen. Ceci suppose une sélection dépendant de plusieurs facteurs permettant la colonisation du rumen par une souche donnée à un moment précis (Klieve &



Figure 1. Cellules bactériennes du jus du rumen observées au microscope photonique (x 1000) après coloration à l'acridine orange

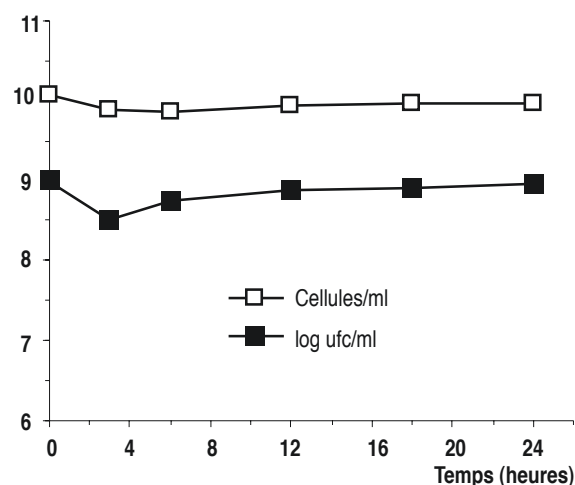


Figure 2. Dénombrement de la flore totale dans le jus du rumen de mouton par culture en milieu solide (carrés noirs) ou par microscopie après fixation et coloration à l'acridine orange (carrés blancs)

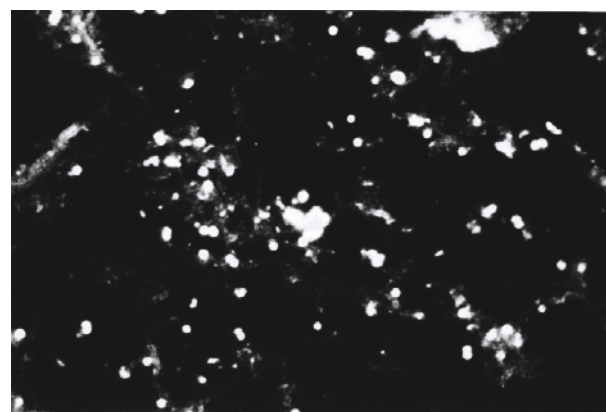


Figure 3. Observation au microscopique de *Ruminococcus albus* 7 (x 1000) dans le jus de rumen après traitement par immunofluorescence indirecte

Les cocci verts fluorescents correspondent aux cellules ayant fixé les anticorps marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine.

Bauchop, 1988), d'où l'intérêt de la technique immunologique développée dans cette étude. Ceci permet de suivre l'évolution d'une souche donnée dans l'écosystème complexe rumen en fonction de divers paramètres. Une telle approche est impossible avec la technique de culture faute de milieux sélectifs pour une souche précise et à cause de la lourdeur de sa mise en œuvre.

CONCLUSION

Les deux méthodes de dénombrement de bactéries du rumen mises au point dans ce travail peuvent présenter une bonne alternative aux dénombrements sur milieux de culture, généralement lourds à mettre en œuvre, en particulier, pour les bactéries anaérobies strictes comme celles du rumen. Elles peuvent également résoudre le problème du choix des milieux sélectifs pour certains types de bactéries, ce qui permettra de suivre aisément leur évolution et leur dénombrement à l'aide de sondes immunologiques.

En outre, les deux techniques peuvent être particulièrement utiles dans les études des interactions microbiennes dans le rumen, de l'effet des régimes alimentaires et de l'effet de certaines substances ou probiotiques sur les bactéries du rumen.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Bergstrom I, Heinanen A & Salonen K (1986) Comparison of acridine orange, acriflavine and bis benzimide stains for enumeration of bacteria in clear and humic waters. *Appl Environ Microbiol* 51: 664-667
- Bryan MP & Burkey LA (1953) Numbers and some predominant groups of bacteria in the rumen of cows fed different rations. *J Dairy Sci* 36: 218-224
- Bryan MP & Robinson IM (1968) Effects of diet, time after feeding, and position sampled on numbers of viable bacteria in the bovine rumen. *J Dairy Sci* 51: 1950-1955
- Conway De Macario E, Macario AJL & Wolin HJ (1982) Specific antised and immunological procedures for characterization of methanogenic bacteria. *J Bact* 149: 320-328
- Dehority BA & Grubb JA (1976) Basal medium for the selective enumeration of rumen bacteria utilizing specific energy sources. *Appl Environm Microbiol* 703-710
- Delatre JM (1986) Le contrôle bactérien rapide des eaux en épifluorescence. *J F. et Hydrobiol* 17(1): 59-70
- Fonty G (1984) Implantation de la microflore et des protozoaires ciliés dans le rumen d'agneaux holoxéniques et néo-holoxéniques. Facteurs écologiques déterminant l'implantation de *B. succinnogenes* (S 85) et des protozoaires ciliés dans le rumen d'agneaux gnotoxéniques. Évolution des principaux paramètres digestifs. Thèses N°3-337, Université de Clermont-Fd II, 235 p.
- Fonty G & Forano E (1999) Écologie de la dégradation et de la fermentation des polyholosides constitutifs des parois végétales dans le rumen. *Cahiers de l'agriculture* 8: 21-35
- Forsberg CW, Forano E & Chesson A (2000) Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. in "Ruminant Physiology" Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction edited by PB Crinje, CABI Publishing.
- Gouet Ph & Thivend P (1986) Le rumen : un fermenteur modèle. *Biofutur* 47-58
- Gouet Ph., Grain J, Dubourguier HC & Albagnac G (1986) Interactions entre espèces microbiennes anaérobies dans le rumen. *Reprod Nutri Dévelop* 26 (1B): 147-159
- Hungate RE (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobe. In "methods in Microbiology", Ed. by J.R. Norris and D.W. Gibbons, New-York and London, 3 B: 117-132
- Jouany JP (1978) Contribution à l'étude des protozoaires ciliés du rumen: leur dynamique, leur rôle dans la digestion et leur intérêt pour le rumen. Thèse Doctorat, Université de Clermont II, 1978, N° d'ordre 256, 2 vol. 195 p.
- Klieve AV & Bauchop T (1988) Morphological diversity of ruminal bacteriophages from sheep and cattle. *Appl Environm Microbiol* 54(6): 1637-1641
- Krauz DO & Russell JB (1999) How many ruminal bacteria are there? *J Dairy Sci* 79: 1467-1475
- Leedle JAZ, Bryant T & Hespell RB (1982) Diurnal variation in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low or high forage, diets. *Appl Environm Microbiol* 44(2): 402-412

- Lôber G (1982) The fluorescence of dye-nucleic acid complex. *J Lumin* 22: 221-265
- Orpin CG (1980) Quantitative aspects of the association of rumen bacteria with plant particles *in vitro*. *Soc Gen Microbiol Proc Quart* 7: 174-175
- Michalet-Doreau B, Fernandez I, Peyron C, Millet L, & G. Fonty G (2001) Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. *Reproduction Nutrition Development* 41: 187-194
- Rakotoarivonini H, Jubelin G, Hebraud M., Gaillard Martinie B, Forano E & Moson P (2002) Adhesion to cellulose of the Gram-Positive bacterium *Ruminococcus albus* involves type IV pili. *Microbiology SGM* 148: 1871-1880
- Mosoni P, Fonty G & Gouet P (1997) Competition between ruminal cellulolytic bacteria for adhesion to cellulose. *Curr Microbiol* 35: 44-57